

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO-FARMACOBIOLOGÍA



**“Obtención de los criterios para la selección
de un complejo **enzimático óxido
reductor extracelular**”**

TESIS

**Para obtener el grado de:
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

**Presenta:
KATIA LIZBETH ALONSO HURTADO**

**Asesor de Tesis:
D.C. MAURO MANUEL MARTÍNEZ PACHECO**

Morelia, Michoacán, Enero de 2020.

“NO TE RINDAS”

*No te rindas, aun estas a tiempo
de alcanzar y comenzar de nuevo,
aceptar tus sombras, enterrar tus miedos,
liberar el lastre, retomar el vuelo.*

*No te rindas que la vida es eso,
continuar el viaje,
perseguir tus sueños,
destrabar el tiempo,
correr los escombros y destapar el cielo.*

*No te rindas, por favor no cedas,
aunque el frio queme,
aunque el miedo muerda,
aunque el sol se esconda y se calle el viento,
aún hay fuego en tu alma,
aún hay vida en tus sueños,
porque la vida es tuya y tuyo también el deseo,
porque lo has querido y porque te quiero.*

*Porque existe el vino y el amor, es cierto,
porque no hay heridas que no cure el tiempo,
abrir las puertas quitar los cerrojos,
abandonar las murallas que te protegieron.*

*Vivir la vida y aceptar el reto,
recuperar la risa, ensayar el canto,
bajar la guardia y extender las manos,
desplegar las alas e intentar de nuevo,
celebrar la vida y retomar los cielos,*

*No te rindas por favor no cedas,
aunque el frio queme,
aunque el miedo muerda,
aunque el sol se ponga y se calle el viento,
aún hay fuego en tu alma,
aún hay vida en tus sueños,
porque cada día es un comienzo,
porque esta es la hora y el mejor momento,
porque no estás sola,
porque yo te quiero.*

Mario Benedetti.

AGRADECIMIENTOS

Durante este proceso viví muchas experiencias que me hicieron adquirir habilidades académicas, pero también aprendí muchas otras que me hicieron crecer como ser humano. A los que participaron en este proceso quiero agradecerles por el cariño y el apoyo que siempre me brindaron.

Gracias a Dios por permitirme la vida, por ser la luz que guía mi camino, mi consuelo en los momentos difíciles y la esperanza de todos mis días.

Gracias papás María y Rosendo por darme el privilegio de vivir en una familia llena de amor. Por darme el mejor ejemplo de que solo con esfuerzo y dedicación se pueden cumplir los sueños. Por apoyarme en todas mis decisiones y hacer de mí un ser humano con valores. Por enseñarme que la felicidad y otras cosas que son invisibles al ojo humano son lo verdaderamente esencial en la vida. Pero sobre todo por atreverse a soñar conmigo.

Gracias hermanas: Erika, Yesi y Sofy por su paciencia, solidaridad y amor en cualquiera de mis decisiones. Por siempre confiar en mí, tenerme paciencia y enseñarme a crecer en el valor del servicio. Ustedes son mi motivación y mi inspiración.

Gracias familia por ser un apoyo incondicional en cada paso de mi vida. Por llenarme de afecto cuando más lo necesito. A mis abuelitos (Rosendo y Antonio), abuelitas (Rosa y Susana) y bisabuelita (Antonia) por el afecto fiel de complicidad que jamás se cansaron de brindarme.

Gracias tías (Yolanda, Rosi, Chucha, Angela, Lety, Fer, Toña) y tíos (José, Beto, Gabi, Jorge, Cesaario y Pablo) por estar cerca de mí en cada una de las etapas de mi vida acompañándome y demostrándome siempre su amor incondicional igual que mis primos (Oscar, Paco, Lalito, Matías, Diego, lordy, Jorge) y primas (Monse, Yuri, Karla, Sami) que sin ellos mi sueño no se hubiera vuelto realidad. Cada uno preocupado por mi bienestar y felicidad.

Gracias a mis tíos Efrain, Marcos y Francisco porque al igual que los demás iniciaron conmigo este sueño y sé que hubieran deseado estar conmigo para cumplirlo.

Gracias amigos por el cariño que me mostraron durante los momentos difíciles. Liz, Brandon, Chucho, Eliel, Evelin y Brian por regalarme su compañía y acogerme con el mismo cariño que se acoge a un hermano. Mejor amiga Liz y mejor amigo Brandon espero que su corazón se llene de amor y felicidad eterna. Han sido luz en mi vida y el apoyo más fiel que eh encontrado después de mi familia. Los tengo en mi mente siempre que agradezco por algo que me pasa y este logro también es por ustedes.

Gracias amigas Sonia y Lesly que durante la carrera siempre me apoyaron y me dieron el ejemplo de que todo se puede lograr. Cada una de ustedes me enseñó lo difícil que es la vida para algunas personas, pero que no vale la pena quejarse solo nunca rendirse.

Gracias Maestra Judith y Paty por las herramientas de aprendizaje que me dieron durante la carrera y por su apoyo incondicional.

Gracias D.C. Crisanto Velásquez por haberme aconsejado iniciar esta etapa en el Laboratorio de Fisiología Celular. Ese consejo se convirtió en uno de los mejores de mi vida.

Gracias a mis amigos y compañeros del Laboratorio de Fisiología Celular Anita, Meli, Tañia, Rosi, Rita, Cintia, Jared, David, Aly, Normando, Wilbert y Héctor por todo el apoyo moral que siempre me brindaron para no desistir nunca en esta etapa, pero sobre todo por su incondicional solidaridad. Itzel y Meli bebé por su cariño y especial aprecio.

Gracias al técnico del Laboratorio de Fisiología Celular el M.C. Alberto Flores García por su apoyo académico, por asistir en días inhábiles para completar mis experimentos. Y al amigo que encontré en usted por mostrarme cariño, apoyo y solidaridad.

Gracias a mi asesor el D.C. Mauro Manuel Martínez Pacheco por darme la oportunidad de realizar este proyecto en el Laboratorio de Fisiología Celular, llenarme de enseñanzas y experiencias académicas únicas. Al ser humano que me brindo su amistad incondicional le agradezco su paciencia, apoyo, cariño y protección. Al amigo que en ninguna ocasión me negó su tiempo y me aconsejo con el corazón, le agradezco por hacerme creer en mí y hacerme perder el miedo al éxito. Al pedacito de familia que encontré en usted le agradezco por no abandonarme jamás.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y al Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas por las instalaciones y por fomentar la investigación científica.

DEDICATORIA

El trabajo de tesis que realicé es el cumulo de esfuerzos que varias personas realizaron conmigo académica y personalmente. Es por ello que el trabajo lo dedicó a cada una de las personas que me formaron e incentivaron a mejorar día con día durante este proceso. A mis papás, hermanas, familia y amigos.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
MARCO TEÓRICO	4
Aplicación industrial de las enzimas óxido-reductoras.....	4
Clasificación de las enzimas.....	5
Lacasas.....	6
Estructura de las lacasas.....	7
Mecanismo de reacción de lacasas	7
Manganeso Peroxidasa (MnP)	9
Lignina Peroxidasa (LiP).....	9
Material lignocelulósico.....	10
Hongos.....	11
Clasificación de los hongos	11
Análisis informático o análisis <i>in silico</i>	12
Enriquecimiento enzimático.....	14
JUSTIFICACIÓN	16
HIPÓTESIS	17
OBJETIVO GENERAL	18
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
Análisis <i>in silico</i> del gen de la lacasa, proteína y el acoplamiento enzima sustrato.	20

Determinación de la producción de proteína extracelular fúngica	21
Determinación de la concentración de proteína	23
Fraccionamiento de las proteínas con sulfato de amonio (NH ₄) ₂ SO ₄	24
Diálisis.....	25
Cuantificación de la actividad enzimática óxido-reductora ...	25
Actividad de la lacasa (Lac).....	25
Actividad de la manganeso peroxidasa (MnP).....	25
Actividad de lignina peroxidasa (LiP)	26
Análisis de los datos	27
DISCUSIÓN	28
CONCLUSIÓN.....	32
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

RESUMEN

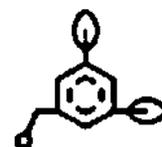
Los ascomicetos pueden degradar enzimáticamente la pared celular vegetal. El sistema de enzimas con capacidad óxido-reductora (lacasas, lignina y manganeso peroxidasas) tiene una función primordial en la degradación de lignina y polifenoles indeseables en procesos industriales. Estas intervienen en una serie de reacciones inespecíficas que originan la formación de radicales libres en el biopolímero, desestabilizan los enlaces y rompen la macromolécula. En las industrias es necesario disponer de proteínas purificadas para retener la mayor cantidad de proteínas funcionales con el menor número de contaminantes. Sin embargo, en ocasiones se colectan y refinan cantidades masivas de datos que complican la optimización de los tiempos experimentales. Actualmente herramientas informáticas como el análisis *in silico* se utilizan para la extracción de información oculta y predecible de grandes bases de datos encontrando información que un experto no puede llegar a encontrar rápidamente por métodos experimentales. Al respecto, en un trabajo previo, las especies *Fusarium oxysporum*, *Fusarium oxysporum* CH1P4-1 y *Alternaria* sp., se seleccionaron con actividad potencial óxido-reductora. En este trabajo se obtuvieron los criterios de selección de un ascomiceto con producción del complejo enzimático óxido reductor extracelular, el cual se conforma por lacasas, lignina y manganeso peroxidasas. Para ello se utilizaron herramientas computacionales en la búsqueda de información en repositorios de acceso libre de genes, proteínas y modelado molecular, así como de metodologías experimentales. Con las cuales se determinó al asilado silvestre de *Fusarium* como un candidato interesante para la producción del complejo óxido reductor.

PALABRAS CLAVE: (Ascomicetos, óxido-reductora, purificación, *in silico*)



ABSTRACT

Ascomycetes can enzymatically degrade the plant cell wall. The enzyme system with oxide-reducing capacity (lacases, lignin and manganese peroxidases) has a primary function in the degradation of lignin and undesirable polyphenols in industrial processes. These intervene in a series of nonspecific reactions that cause the formation of free radicals in the biopolymer, destabilize the bonds and break the macromolecule. In industries it is necessary to have purified proteins to retain the greatest amount of functional proteins with the least number of contaminants. However, sometimes massive amounts of data that complicate the optimization of experimental times are collected and refined. Currently, computer tools such as in silico analysis are used for the extraction of hidden and predictable information from large databases, finding information that an expert cannot quickly find by experimental methods. In this regard, in a previous work, the species *Fusarium oxysporum*, *Fusarium oxysporum* CH1P4-1 and *Alternaria* sp., were selected with potential oxide-reducing activity. Then in this work the selection criteria of an ascomycete with production of the extracellular reducing oxide enzyme complex were obtained, which is formed by lacases, lignin and manganese peroxidases. For this, computational tools were used in relation to the search for information in repositories with free access to genes, proteins and molecular docking, as well as experimental methodologies. With which the wild isolated of *Fusarium* was determined as an interesting candidate for the production of the reducing oxide complex.



INTRODUCCIÓN

La implementación de procesos amigables con el ambiente se convirtió en una meta para las industrias alimentarias, papeleras y cosmetológicas en este procedimiento la investigación biotecnológica resultó una herramienta útil.

Particularmente, en el uso de microorganismos y enzimas capaces de descomponer materiales lignocelulolíticos. Como es el caso de los hongos de la pudrición blanca de la madera, que se aplican tanto en procesos de producción como en el blanqueamiento de la pulpa de celulosa. Los hongos causantes de la pudrición blanca son en su mayoría basidiomicetos, los cuales en condiciones extremas de humedad provocan este tipo de pudrición en la madera. Estos organismos producen dichas enzimas hidrolíticas para descomponer polímeros de la pared celular vegetal y con sus monómeros alimentarse. Estos hongos producen enzimas óxido-reductasas e hidrolasas capaces de degradar lignina y polifenoles. Polímeros cuyo sillar de construcción son los alcoholes fenólicos y que muy pocos organismos son capaces de procesar (Quintero *et al.*, 2006).

En las reacciones de óxido-reducción, las oxidorreductasas catalizan reacciones en las cuales cambia el estado de oxidación de uno o de más átomos en una molécula. En sistemas biológicos implica una o dos reacciones de transferencia de electrones acompañadas del cambio compensatorio de la cantidad de hidrógeno y de oxígeno en la molécula (Mckee y Mckee, 2003).

En muchas aplicaciones experimentales es necesario disponer de proteínas purificadas e incluir estudios estructurales y ensayos bioquímicos *in vitro*, esto con el objetivo de retener la mayor cantidad de proteínas funcionales con el menor número de contaminantes. Asimismo, la utilización de repositorios de genes, proteínas y herramientas de modelado molecular facilitan la predicción de enzimas útiles en biotecnología de la degradación de polifenoles. La combinación de herramientas *in silico* con las herramientas de la fisiología celular clásica permite un avance veloz en la obtención de una enzima o complejo enzimático capaz de



degradar polifenoles. Un ejemplo de herramienta clásica es la precipitación que se utiliza como método de concentración de proteínas y es un paso de un proceso de purificación (Harris y Angal, 1995).

La utilización y aplicación de estas enzimas es diversa. Un ejemplo es su intervención en la manufactura de pulpas de papel. Los procesos de blanqueado utilizan productos poco amigables con el ambiente es conveniente sustituir estos productos por nuevas tecnologías que se basan en la utilización de enzimas con capacidad blanqueadora como lo son las enzimas con propiedad óxido-reductora.

MARCO TEÓRICO

Aplicación industrial de las enzimas óxido-reductoras

La introducción de la biotecnología en el procesamiento de lignina y polifenoles ofrece una fuente potencial para obtener procesos respetuosos con el ambiente. Además, un valor agregado de productos de desecho se consigue. Las enzimas ligninolíticas actualmente son una herramienta viable para la biodegradación de la lignina debido a su capacidad oxidativa. Ya que ellas, intervienen en una serie de reacciones inespecíficas que originan la formación de radicales libres en el biopolímero, desestabilizan los enlaces y rompen la macromolécula.

Las enzimas son moléculas de naturaleza proteica que catalizan reacciones químicas, estas, actúan sobre moléculas denominadas sustratos y los convierten en moléculas diferentes denominadas productos.



Clasificación de las enzimas

La Comisión de Enzimas (EC) de la Unión de Bioquímica (IUB) y la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) propusieron la clasificación de seis grupos de enzimas, cuyas diferencias se basan en la especificidad de reacción de las diversas enzimas. Dentro de cada uno de estos grupos se incluyen subgrupos y más subgrupos que se basan en la especificidad del grupo funcional. Los seis grupos de enzimas son:

1. Óxido-reductasas: Catalizan reacciones de óxido-reducción.
2. Transferasas: Catalizan transferencia de grupos químicos de un compuesto a otro.
3. Hidrolasas: Catalizan el desdoblamiento hidrolítico de determinados enlaces.
4. Liasas: Catalizan la ruptura no hidrolítica de determinados enlaces.
5. Isomerasas: Catalizan cambios geométricos o estructurales dentro de una molécula.
6. Ligasas: Catalizan la unión de dos moléculas en un proceso acoplado a la hidrólisis de un enlace pirofosfato del ATP o una molécula análoga (Teijón *et al.*, 2001).

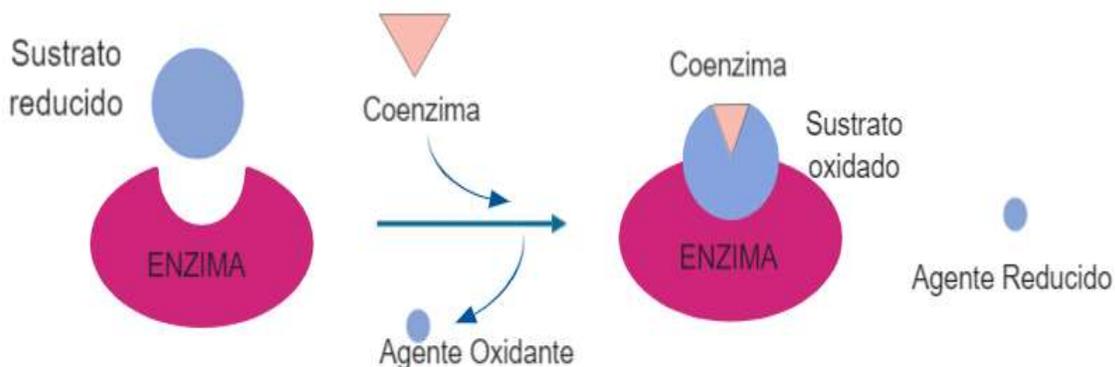


Figura 1: Modelo de una reacción de óxido-reducción. Modificado de (Castañeda-Uribe, R., 2017).



Las óxido-reductasas comprenden una amplia clase de enzimas que catalizan reacciones biológicas de oxidación-reducción, cuando intercambian electrones o equivalentes redox entre moléculas donadoras yceptoras. Para la realización de su función, las óxido-reductasas emplean varios centros activos redox. Los centros de reacción y regulación comunes incluyen a los residuos de aminoácidos como tirosina o cisteína, iones metálicos como cobre, hierro y molibdeno, centros hierro-azufre o grupos hemo, así como a las coenzimas FMN y FAD.

Las enzimas óxido-reductoras a su vez se subdividen en grupos de acuerdo al tipo de sustrato que utilizan: deshidrogenasas, oxidasas, peroxidasas, hidroxilasas, oxigenasas y reductasas.

Las principales enzimas de uso biotecnológico en el procesamiento de polifenoles son aquellas que tienen la capacidad de degradar a la lignina. Dentro de este grupo destacan la lacasa, lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y celobiosa deshidrogenasa (Castañeda-Urbe, R., 2017).

Lacasas

La enzima lacasa se aisló por primera vez del árbol japonés *Rhus venicifera* (Yoshida, 1883) y posteriormente se encontró en hongos; las lacasas mejor descritas son producidas por *Agaricus bisporus*, *Podospora anserina*, *Rhizoctonia praticola*, *Trametes* o *Polyporus versicolor*, *Pholiota aegerita*, *Pleurotus ostreatus*, *Coriolus hirsitus* y *Neurospora crassa* (Yaropolov *et al.*, 1994). Las lacasas fúngicas pueden ser inducibles o constitutivas y también, intracelulares o extracelulares (Sariaslani, 1989).



Estructura de las lacasas

La lacasa es una glicoproteína que contiene, por lo general, entre dos y cuatro átomos de cobre. Aunque algunas contienen tres o seis átomos, como es el caso de lacasas producidas por *Rhus vernicifera* y *Rhus succedanca* que contienen cuatro y seis átomos de cobre respectivamente (Reihammar y Oda, 1979). Los átomos de cobre que contiene la lacasa son: Cu tipo 1 (T_1), Cu tipo 2 (T_2) y dos iones Cu tipo 3 (T_3). En sus estados oxidados los cobres T_1 y T_2 exhiben señales específicas en espectros de resonancia paramagnética de electrones (EPR). Por el contrario, los dos iones cobre T_3 no son paramagnéticos. El cobre T_1 en su estado oxidado absorbe fuertemente la luz a 610 nm (Andreasson y Reinhammar, 1979).

El peso molecular de las lacasas extracelulares está entre 60 a 80 KDa; del cual corresponde de 15 al 20 % a carbohidratos (Thurston, 1994). La composición incluye a los carbohidratos tales como, hexosamina, glucosa, manosa, galactosa, fructosa y arabinosa (Yarolopov *et al.*, 1994).

Mecanismo de reacción de lacasas

Solomon y col. (1996) realizaron una revisión sobre el mecanismo catalítico de la enzima lacasa y propusieron que la velocidad de oxidación del sustrato depende del potencial reductor. Donde la transferencia de electrones del sustrato al sitio T_1 es la etapa que determina la velocidad en el número de recambio. Dos posibles mecanismos existen: A) El cobre T_1 transfiere su electrón al cobre T_2 y el Cu T_1 se reduce nuevamente; el Cu T_1 y Cu T_2 transfieren sus electrones a los Cu T_3 ; el Cu T_1 se vuelve a reducir y transfiere su electrón al Cu T_2 , el Cu T_1 se reduce nuevamente. Dando finalmente como resultando a una enzima en su forma totalmente reducida. B) El grupo trinuclear es reducido secuencialmente por etapas de la transferencia de electrones del sitio T_1 (el orden en que los tres átomos de cobre del sitio trinuclear son reducidos no se conoce aún).



Las lacasas son inespecíficas, por tal razón tienen un amplio intervalo de sustratos para oxidar entre una lacasa y otra (Thurston, 1994). Estas enzimas catalizan la oxidación de varios compuestos aromáticos entre los que se encuentran: mono, di y polifenoles; aminofenoles y diaminas, por la reducción de oxígeno molecular a agua (Giardina *et al.*, 1995). También, ellas son capaces de interactuar con un mediador (por ejemplo, ABTS) para oxidar compuestos no fenólicos del modelo de la lignina; los cuales, no son sustratos de las lacasas (Bourbonnais y Paice, 1990).

La lacasa es una polifenoloxidasas (*p*-difenoil oxidasa, E.C.1.10.3.2). La reducción de oxígeno a agua por esta enzima está acompañada por la oxidación de un sustrato fenólico. La reacción que lleva acabo la lacasa incluye la oxidación de un compuesto fenólico que genera un radical libre; este producto es típicamente inestable. Este puede experimentar una segunda oxidación por catálisis enzimática para formar quinonas. También, una reacción no enzimática tal como una hidratación o desprotonación puede ocurrir o podría participar en una reacción de polimerización, dando un compuesto amorfo insoluble como la melanina (Thurston, 1994). Las reacciones oxidativas que pueden llevar acabo las lacasas para despolimerizar la lignina incluyen: rompimiento entre enlaces Ca-Cb, hidroxilación, rompimiento de estructuras aromáticas y desmetilación (Sariaslani, 1989).

Las lacasas Bencenediol: oxígeno oxidoreductasa, (C.E. 1.10.3.2) son enzimas que forman parte del sistema ligninolítico producidas por varios hongos. Las enzimas son fenol-oxidasa con cobre que oxidan anillos de lignina en ausencia de lignina peroxidasa. Estas enzimas extracelulares poseen un grupo *N*-glicosilato que presenta en su estructura dos monosacáridos: Manosa y *N*-acetilglucosamina. Además, ellas contienen cadenas glicosídicas unidas a oxígeno y nitrógeno, cuyo peso molecular se encuentra aproximadamente entre 60-390 kDa (Widsten y Kandelbauer, 2008). Al oxígeno molecular lo reducen hasta agua y realizan simultáneamente la oxidación de un electrón de diversos sustratos, tales como, difenoles, monofenoles sustituido por metoxilos, aminas aromáticas y alifáticas. La catálisis se lleva a cabo mediante cuatro átomos de cobre (un átomo de cobre tipo



1, un cobre de tipo 2 y dos cobres de tipo 3) que forman parte del sitio activo de la enzima (Kudangaa *et al.*, 2011).

Manganeso Peroxidasa (MnP)

La enzima Manganeso Peroxidasa (C.E. 1.11.1.13) es una hemoproteína que cataliza la oxidación de Mn^{+2} a Mn^{+3} dependiente de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), presenta un potencial de oxidación suficiente para absorber electrones de estructuras fenólicas. El Mn^{+3} es quelado por diferentes ácidos orgánicos como glicolato y puede oxidar una amplia variedad de compuestos fenólicos (Ozturk y Kasikara, 2007). Además, por su pequeño tamaño, este ion podría actuar en zonas internas de la lignina, inaccesibles a un ataque enzimático directo.

Lignina Peroxidasa (LiP)

La actividad lignina peroxidasa (C.E. 1.11.1.14) se describió por primera vez en el basidiomiceto *Phanorachaete chrysosporium*. La LiP es una glicoproteína monomérica que contiene un grupo hemo (hierroprotoporfirina IX) como grupo prostético. La LiP tiene un peso molecular entre 38 y 46 KDa y un punto isoeléctrico (pI) que varía entre 3,2 y 4,7 (Wong, 2009). La actividad LiP es detectada en numerosos hongos de podredumbre blanca, tales como, *P. chrysosporium* y *Trametes versicolor*. Su actividad depende de la presencia de H_2O_2 y cataliza la oxidación de compuestos fenólicos y no fenólicos, hidrocarburos aromáticos policíclicos y otros compuestos que son resistentes al ataque microbiano, lo que demuestra su capacidad para oxidar una amplia variedad de compuestos fenólicos modelo (Carbajo, 2015).



Material lignocelulósico

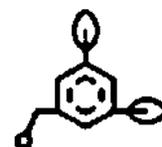
La biomasa lignocelulósica está compuesta principalmente por los polímeros de celulosa, hemicelulosa y lignina, que están asociados y sirven de soporte estructural a la pared celular de plantas (Rowell *et al.*, 2005).

La celulosa se forma por unidades de glucosa y se considera que es el compuesto químico orgánico más abundante en la tierra, que representa en promedio de 38 % a 49 % del peso seco de la madera y es la materia para la fabricación de papel, películas, explosivos, plásticos, combustibles, además de tener diversos usos y aplicaciones industriales (Fengel y Wegener, 2003; Rowell *et al.*, 2005).

Las hemicelulosas son polímeros heterogéneos cortos ramificados compuestos por pentosas, hexosas y diferentes tipos de ácidos urónicos. Estos compuestos representan un inmenso recurso renovable de biopolímeros que pueden usarse en la industria química, alimentaria, farmacéutica y cosmética (Rowell *et al.*, 2005).

La lignina es un polímero amorfo, constituido por tres tipos de monómeros básicos de fenilpropano y representa de 18 % a 35 % del peso seco de la madera. Este compuesto se obtiene principalmente como residuo de la industria de la celulosa y papel, es una materia prima abundante, por lo que en el futuro podría convertirse en el principal recurso sustituto de diversas sustancias derivadas del petróleo tales como combustible, resinas, aditivos, dispersantes, mezclas termoplásticas y productos farmacéuticos (Stewart, 2008).

Los hongos de pudrición blanca de la madera son un grupo de organismos capaces de degradar a los compuestos lignocelulósicos. La propiedad de degradarlos se debe a que estos hongos producen enzimas extracelulares con actividad óxido-reductora.



Hongos

Los hongos son organismos heterótrofos, para su crecimiento necesitan carbohidratos como fuente de carbono, sobre todo glucosa, sacarosa y maltosa; nitrógeno (proteínas o sales de nitrógeno) y H₂O. También, de los iones inorgánicos más comunes, en especial al: potasio, fósforo y magnesio, y como nutrientes menores al hierro, cobre, zinc y molibdeno. Las vitaminas necesarias para su crecimiento y reproducción las pueden sintetizar, pero hay especies que llegan a ser deficientes en éstas y requieren tomarlas del medio externo, sobre todo la tiamina y biotina. Los hongos necesitan que las moléculas orgánicas sean pequeñas, por ello, excretan enzimas extracelulares al medio para romper a las macromoléculas y reducirlas. El hongo absorbe a través de las paredes y membranas de las hifas las moléculas resultantes de la digestión externa y ya dentro de las células son metabolizadas (Lutzoni y Miadlikowska, 2009).

En el ciclo natural los hongos ligninolíticos atacan el material lignocelulósico por una combustión enzimática (Kirk y Farrel, 1987). El sistema incluye peroxidasas de elevado potencial redox, lacasas con actividad fenoloxidasa y oxidasas que aportan peróxido de hidrógeno, junto con mediadores redox de bajo peso molecular (Bajpai *et al.*, 2006; Tuomela *et al.*, 2000).

Clasificación de los hongos

Las dos divisiones principales de hongos son los ascomicetos (Ascomicota) y los basidiomicetos (Basidiomicota). Los cuales son llamados según las características de sus estructuras reproductivas. Los ascomicetos tienen como estructuras reproductivas a las ascas en forma de saco (Griego “askos”, saco), dichas estructuras se encuentran llenas de esporas. Los basidiomicetos en cambio tienen basidios como estructuras reproductivas (Griego “basidion”, base pequeña) (Lutzoni *et al.*, 2009).

Los hongos producen sustancias oxidantes que rompen los enlaces entre las diferentes subunidades y causan la despolimerización gradual de la molécula dando



como resultado sustancias fenólicas, ácidos aromáticos y alcoholes aromáticos. Finalmente, algunos residuos pueden terminar mineralizándose hasta CO₂ y agua. Otros forman compuestos húmicos (Castillo, 2005).

Los hongos de podredumbre blanda se caracterizan por su capacidad de producir enzimas oxidantes extracelulares. Los complejos de enzimas ligninolíticas de estos hongos difieren significativamente en su composición ya que secretan una o más de tres enzimas extracelulares que son esenciales para la degradación de la lignina (Songulashvili *et al.*, 2007). Los sistemas enzimáticos ligninolíticos trabajan con enzimas extracelulares sobre la heterogeneidad de la lignina. Este polímero no tiene enlaces hidrolizables, sino que las enzimas implicadas en la degradación son oxidativas y los ataques degradadores no son específicos ya que es una molécula irregular (Pérez *et al.*, 2002).

La aplicación potencial de las enzimas ligninolíticas en la biotecnología promueve la investigación de la fermentación de hongos de podredumbre blanca con el fin de seleccionar los productores de enzimas prometedoras (Songulashvili *et al.*, 2007).

Análisis informático o análisis *in silico*

El análisis *in silico* nos ayuda en la extracción de información oculta y predecible de grandes bases de datos. El cual, es una poderosa y nueva tecnología con gran potencial para ayudar a concentrar e integrar la información más importante de repositorios propios (Bases de Información o Data Warehouse), privados o de acceso libre. Este comportamiento de búsqueda de información es el básico. Puesto que estas herramientas son parte del Data Mining que ayudan en la predicción de futuras tendencias y comportamientos. Lo que en la búsqueda de respuestas permiten la toma de decisiones proactivas y conducidas por un conocimiento acabado de la información (knowledge-driven). Los análisis prospectivos automatizados ofrecidos por un repositorio o un software van más allá de los eventos pasados provistos por herramientas retrospectivas típicas de sistemas de soporte de decisión.

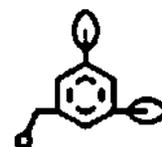


En este trabajo la herramienta tuvo su base en la búsqueda de información en repositorios de acceso libre relacionadas a genes, proteínas y modelado molecular. Aunque de manera simple estas herramientas pueden responder a preguntas de investigación que tradicionalmente consumen demasiado tiempo para que sean resueltas y a los cuales los usuarios de esta información casi no están dispuestos a aceptar.

Estas herramientas exploran las bases de datos en busca de patrones ocultos, encontrando información predecible que un experto no puede llegar a encontrar rápidamente por métodos experimentales porque se encuentra fuera de sus expectativas.

En ocasiones se colectan y refinan cantidades masivas de datos. En este contexto se pueden analizar bases de datos masivas para responder las preguntas tales como y en consideración del universo de estudio que es la colección propia de hongos y que está a resguardo en el Laboratorio de Fisiología del IIQB, "¿Cuál es el mejor ascomiceto que produce un interesante complejo enzimático óxido reductor: lacasa, lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa? y presentar los resultados en formas de tablas, con gráficos, reportes, texto, hipertexto, etc.

Por ejemplo, el docking molecular es un procedimiento *in silico* que sirve para simular si la interacción entre un receptor y un ligando es posible. Los programas de docking molecular realizan un algoritmo de búsqueda en el que la conformación del ligando se evalúa recursivamente hasta que se alcanza la energía mínima. Finalmente, una función de puntuación de afinidad (en kcal/mol) se emplea en la obtención de la suma de las energías de las interacciones intermoleculares para cada conformación (Beltrán *et al.*, 2018) y así identificar a la conformación del ligando que interacciona con la enzima.



Enriquecimiento enzimático

Actualmente, la precipitación se utiliza como un paso de separación en las primeras etapas de un proceso de purificación de proteínas y normalmente continua con otro tipo de separaciones, como la cromatografía.

La precipitación de proteínas se obtiene por la adición de sales. La cual se induce por el cambio de pH o potencial iónico mediante la adición de solventes ya sean orgánicos, inertes o polímeros. Los precipitados pueden ser recuperados por filtración o centrifugación, por lavado o por resuspensión en un buffer adecuado (Harris y Angal, 1995). La proteína no se desnaturaliza y la actividad enzimática se recupera mediante la resuspensión del pellet. Adicionalmente, las sales pueden estabilizar las proteínas contra la desnaturalización, la proteólisis o la contaminación bacteriana, características que hacen de este método una alternativa fácil y confiable para la separación de proteínas (Harris y Angal, 1995).

La purificación de las proteínas de interés se maximiza cuando se utilizan técnicas de precipitación. La causa de la precipitación por salado difiere a la causada por el ajuste del pH, lo que lleva a que estas técnicas sean usadas una tras otra con el fin de maximizar la purificación de las proteínas deseadas.

El salting-out depende de la naturaleza hidrofóbica de la superficie de la proteína. Los grupos hidrofóbicos predominan en el interior de ésta. Pero algunos se localizan en diferentes regiones de la superficie. El agua es puesta en contacto con la superficie lo que provoca que estas regiones no queden expuestas. Por otra parte, cuando la sal se agrega, el agua solvata los iones de la sal y mientras la concentración de sal se incrementa, el agua es removida de los alrededores de la proteína, eventualmente exponiendo las regiones hidrofóbicas. Dichas regiones en las proteínas pueden interactuar mutuamente o con las de otras moléculas, resultando en una aglomeración. De esta forma las proteínas con regiones hidrofóbicas más abundantes formarán agregados y se precipitarán más rápidamente que aquellas con pocas regiones resultando un fraccionamiento (Harris y Angal, 1995).



Las ventajas de utilizar sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para la precipitación de proteínas es que su solubilidad es de aproximadamente 4 M en agua pura y varía muy poco en el intervalo de temperaturas de 0 a 30°C. La densidad de una solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ es 1,235 g/cm³, con una diferencia suficiente a la densidad de los agregados de proteínas (1,29 g/cm³ aproximadamente), de ésta manera se genera la posibilidad de la diferenciación de fases después de una centrifugación. Otra ventaja de emplear $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ es que los precipitados de la proteína son a menudo muy estables durante años en disoluciones de sal 2 a 3 M; de hecho, muchas enzimas comerciales son normalmente vendidas en soluciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de alta molaridad. La única desventaja de la sal es que no debe ser utilizada por encima de un pH de 8,0 debido a la acción buffer del amoníaco.



JUSTIFICACIÓN

En nuestro grupo de trabajo se realizó un escrutinio de 126 aislados fúngicos, esto con la finalidad de observar la capacidad enzimática óxido-reductora. La actividad enzimática se determinó mediante el método de Czapek-Dox que se suplementó con 2,6-diclorofenolindofenol (DCFIF) en placas de medio sólido. Del cual, un total de 21 aislados fúngicos (denominado grupo M21) presentaron actividad enzimática óxido-reductora. Tres especies se identificaron: *F. oxysporum* sp., *F. oxysporum* CH1P1-1 y *Alternaria* sp. con propiedades óxido-reductoras. Por ello, criterios de selección del ámbito *in silico* y experimental permitirán la selección del mejor aislado fúngico con la mejor producción de un complejo óxido reductor.



HIPÓTESIS

La aplicación de criterios tanto *in silico* como experimentales permiten la mejor selección de un ascomiceto productor de un complejo enzimático óxido reductor extracelular.

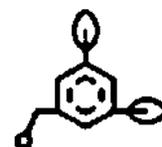


OBJETIVO GENERAL

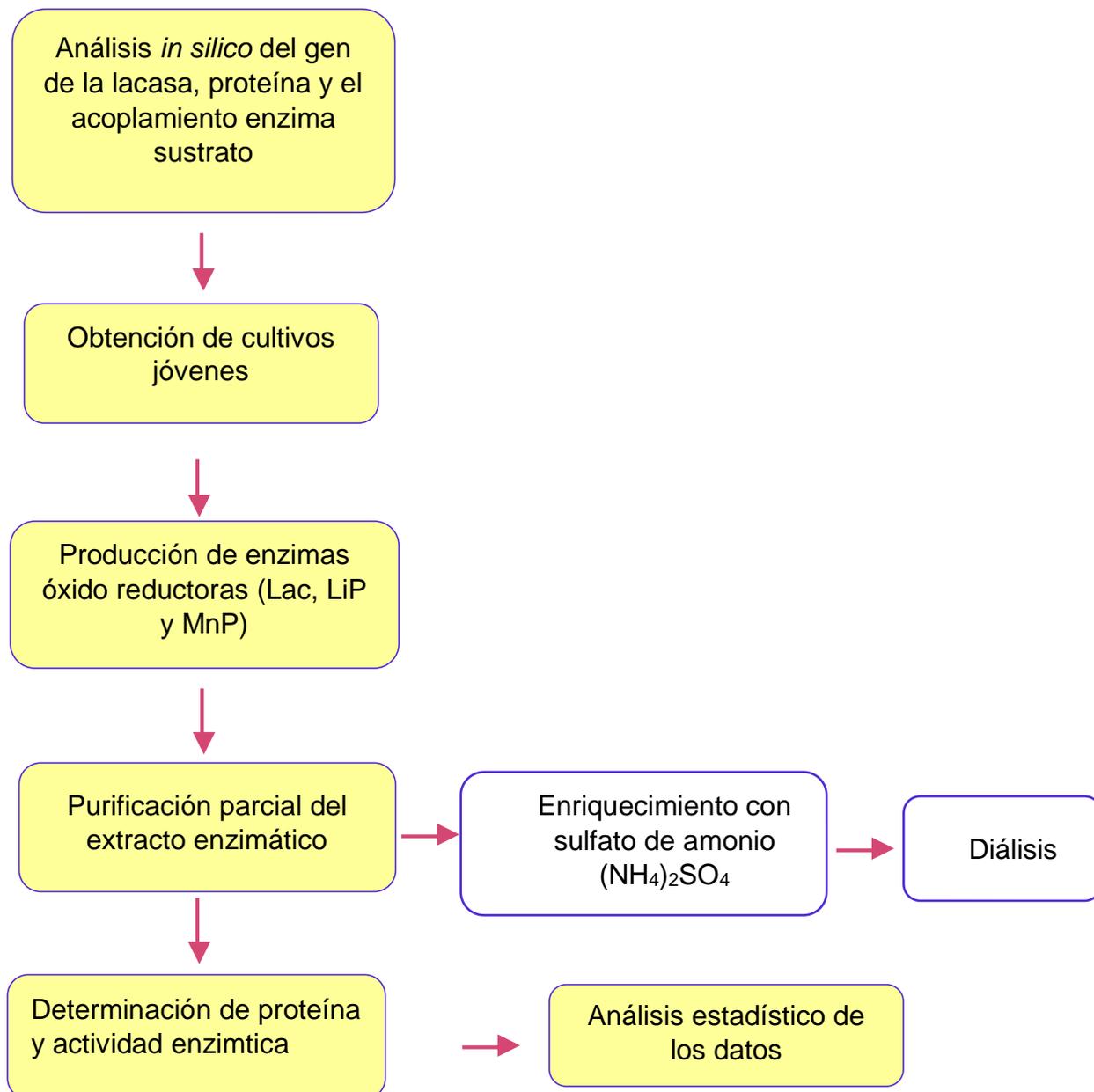
Obtener los criterios para la selección de un ascomiceto productor de un complejo óxido reductor extracelular.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Analizar *in silico* el gene de la lacasa, proteína y el acoplamiento enzima sustrato.
2. Determinar la producción de proteína extracelular fúngica.
3. Cuantificar la actividad enzimática del complejo óxido reductor.



ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis *in silico* del gen de la lacasa, proteína y el acoplamiento enzima sustrato.

Identificación de los genes de lacasas en *Fusarium oxysporum*

La búsqueda del genoma de *Fusarium oxysporum* se realizó en el repositorio de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Los genes de lacasas se buscaron en el repositorio de datos del Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL- EBI). El alineamiento de los genes de lacasas y el genoma se realizó en el NCBI, el porcentaje de similitud de los nucleótidos se obtuvo del alineamiento previo. El cual se realizó con la herramienta BLASTp (valor E: $1e^{-3}$; Matriz: BLOSUM 62; Filtro: Sí; Tipo de alineación: sin espacios) en la base de datos comparativa de NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Las secuencias de las lacasas descritas de *F. oxysporum* se buscaron en la base de datos Uniprot y se alinearon con lacasas de otras especies fúngicas. La secuencia de *Melanocarpus albomyces* se utilizó para el alineamiento.

ClustalW2 alineó las secuencias de aminoácidos (se usaron opciones pre-determinadas proporcionadas por el programa tanto en la alineación por pares como en la alineación de secuencias múltiples) (Chenna *et al.*, 2003) de la caja de herramientas del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI).

Modelaje *in silico* de la interacción de la lacasa con diferentes sustratos

Las estructuras de los diferentes sustratos se obtuvieron del repositorio ChemSpider. Las estructuras se modificaron en el programa Maestro Elements (v.3.4). Las moléculas que se diseñaron se ajustaron a su estado mínimo de energía (mediante el método semi-empírico AM1). La lacasa de *Melanocarpus albomyces* se utilizó como modelo de la estructura proteica. La estructura se obtuvo del Protein Data Bank (código del PDB 1GW0). Las moléculas del solvente se eliminaron para



realizar el docking y los átomos de hidrógeno faltantes se agregaron. El archivo *config.txt* se realizó, en el cual se incluyen los datos de las coordenadas específicas del sitio activo para la realización de la búsqueda de interacción en el programa. El docking molecular se realizó en el programa Auto Dock Vina (v. 1.1.2). Los resultados se visualizaron con el programa Auto Dock Tools (v. 1.5.6). El docking molecular entre la *N*-acetilglucosamina y la lacasa se realizó como control positivo del ensayo.

Determinación de la producción de proteína extracelular fúngica

Microorganismos y condiciones del cultivo

Las cepas *Fusarium oxysporum* CH1P4-1, *F. oxysporum* y *Alternaria* sp. se sembraron en agar papa dextrosa (APD) con la finalidad de obtener cultivos jóvenes. Las cepas se mantuvieron en agar papa dextrosa (APD) durante siete días a 25 °C. Posterior a ello, una curva de crecimiento temporal en placa se realizó para conocer el crecimiento de los tres microorganismos. El ensayo se realizó durante 10 días a 25 °C. El diámetro de crecimiento del micelio se midió cada 24 horas con ayuda de un vernier, hasta que el crecimiento completo el área de las cajas.

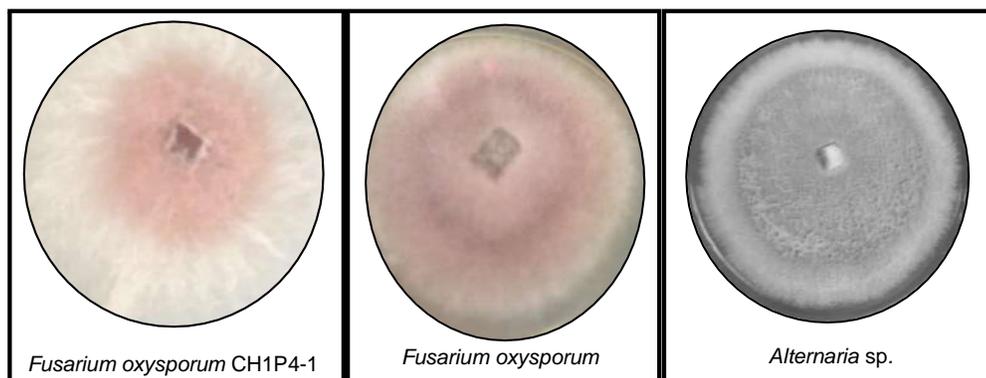


Figura 2: Obtención de cultivos jóvenes en agar papa dextrosa.



Producción del extracto enzimático

Los aislados fúngicos *F. oxysporum*, *Fusarium oxysporum* CH1P4-1 y *Alternaria* sp. se cultivaron en medio mínimo líquido mínimo (Bartnicki- García y Nickerson, 1962), con la siguiente composición (g/L): dextrosa 20, fosfato potásico monobásico (K_2HPO_4) 3,0, sulfato de magnesio ($MgSO_4 \cdot 7 H_2O$) 0,5; nitrato de amonio (NH_4NO_3) 0,5, sulfato de zinc ($ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$) $1,8 \times 10^{-3}$, sulfato ferroso ($FeSO_4$) 1×10^{-3} , tiamina 1×10^{-3} ; ácido nicotínico 1×10^{-3} , sulfato cúprico ($CuSO_4 \cdot 5 H_2O$) 4×10^{-4} , sulfato de magnesio ($MnSO_4 \cdot H_2O$) 3×10^{-4} . La inoculación se realizó con propágulos de 25 mm² por cada 10 ml de medio. Posteriormente, los medios se dejaron en incubación durante 6 días a 25 °C a 120 rpm. A los seis días de incubación, los medios se filtraron y recuperaron. Las alícuotas del filtrado se utilizaron para la determinación del contenido de proteína y la actividad específica.



Figura 4: Medios de fermentación líquida.

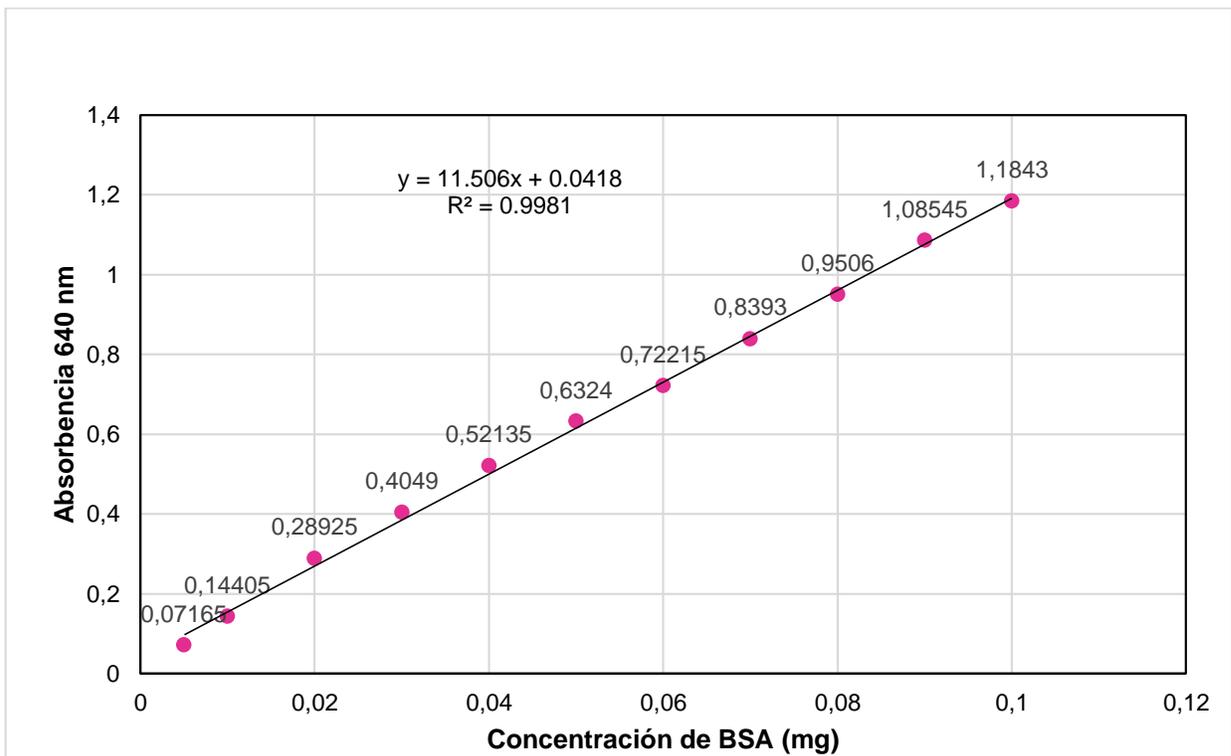


Figura 3: Filtrado enzimático.



Determinación de la concentración de proteína

La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry *et al.*, 1951. La curva de concentración de BSA (Albúmina de suero bovino) se utilizó como curva de concentración patrón.



Gráfica 1: Curva de concentración de proteína estándar con BSA.



Fraccionamiento de las proteínas con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

El filtrado se saturó con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en un intervalo de concentración del 10, 20, 40, 60 y 80 %. Posteriormente, las fracciones se centrifugaron a 4 500 rpm a 4 °C durante 30 min. El precipitado de cada fraccionamiento se recuperó y se resuspendió en búfer de fosfato de potasio 0,1 M, pH 6,8.

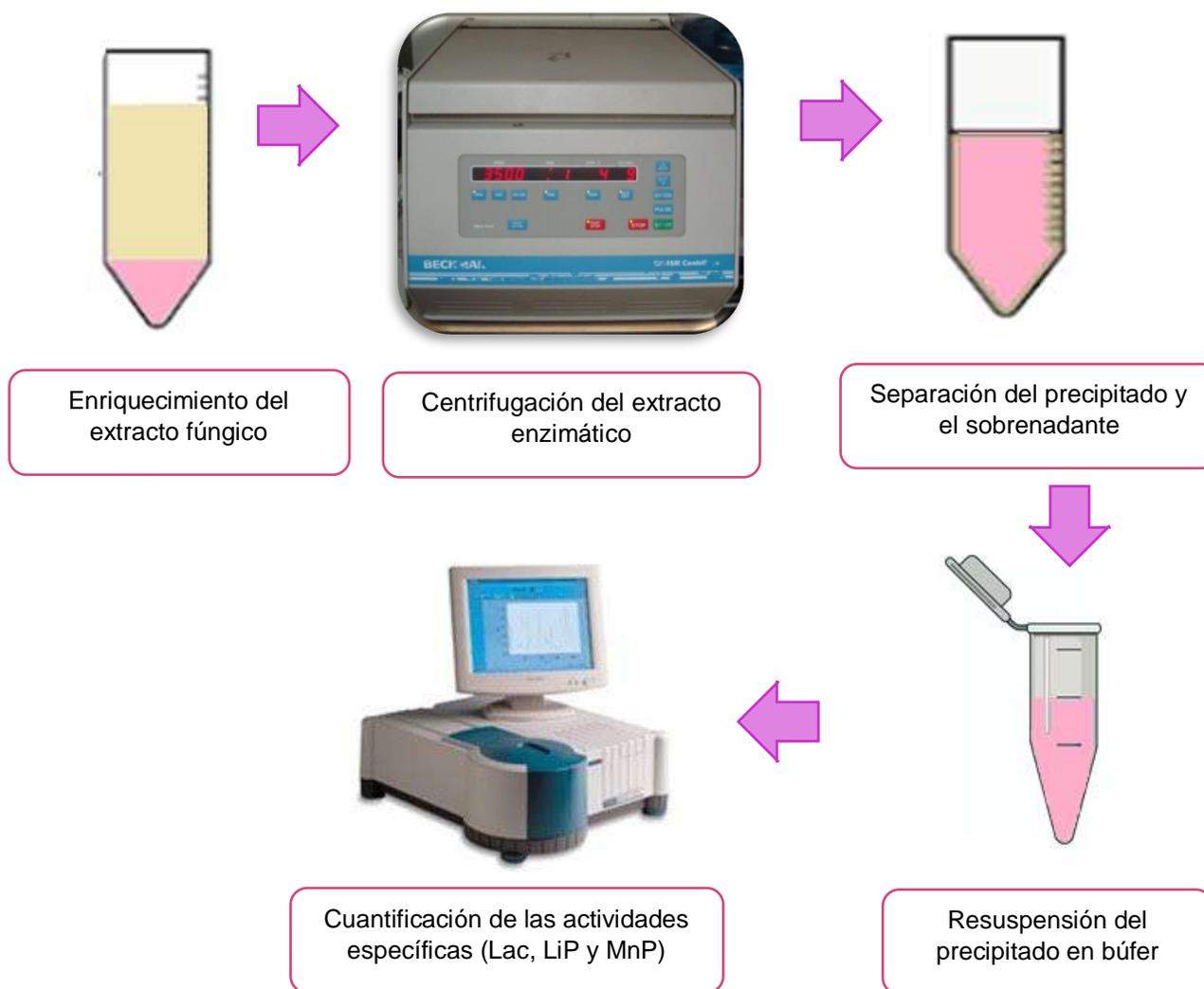


Figura 5: Proceso de enriquecimiento y obtención de las fracciones del extracto crudo de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium oxysporum* CH1P4-1, *Alternaria* sp., con sulfato de amonio.



Diálisis

Las fracciones que se recuperaron se dializaron a través de una membrana de celulosa con un tamaño de exclusión molecular de 12 kDa (Sigma) en búfer de fosfato de potasio 0,1 M, pH 6,8. El proceso se realizó a 4 °C durante 48 h con dos cambios de búfer cada 24 h. El dializado se utilizó para la cuantificación de proteína y la actividad específica del complejo óxido reductor (Lac, LiP, MnP).

Cuantificación de la actividad enzimática óxido-reductora

Actividad de la lacasa (Lac)

La actividad específica de la enzima lacasa se determinó en una mezcla de reacción que se formó con 200 μ l de extracto enzimático 0.01 mg/ml, 600 μ l de búfer de citrato 0.1 M y 200 μ l de ABTS 5 mM. El blanco de reacción se realizó con 200 μ l agua desionizada. La reacción se realizó en un espectrofotómetro a 436 nm durante dos minutos. La actividad enzimática se expresó en U/ml. Una unidad (U) se define como la cantidad de actividad enzimática que cataliza la transformación de 1 μ mol de sustrato por minuto (Papinutti *et al.*, 2003). $\epsilon = 36\ 000$. El coeficiente de extinción molar o absortividad molar, ϵ , es una constante característica del sistema soluto-solvente en estudio. La magnitud de este término varía con la longitud de onda (Pickering, 1980).

Actividad de la manganeso peroxidasa (MnP)

La actividad de la manganeso peroxidasa se determinó en una mezcla de reacción que contuvo: 250 μ l extracto enzimático 0.01 mg/ml, 50 μ l de rojo de fenol al 1 % (p/v), 100 μ l de lactato de sodio 250 mM, 25 μ l de sulfato de manganeso 2 mM, 100 μ l de albúmina de suero bovino (BSA) al 0,5 % (p/v), 25 μ l de H₂O₂ 0,2 mM y 500 μ l búfer de citrato 0,1 M a pH 5. El ensayo se basó en la oxidación del rojo fenol por la acción de la enzima a 610 nm durante 2 min. La actividad enzimática se expresó en U/ml. Una unidad (U) se define como la cantidad de actividad enzimática que cataliza la transformación de 1 μ mol de sustrato por minuto (Papinutti *et al.*, 2003). $\epsilon = 11\ 590$.



Actividad de lignina peroxidasa (LiP)

El ensayo se realizó en una mezcla de reacción con 250 μ l de extracto enzimático 0.01 mg/ml, 250 μ l de alcohol veratrílico (alcohol 3,4-dimetoxibencilo) 1 mM, 25 μ l de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 0,2 mM y 500 μ l de búfer de citrato 0.1 M a pH 5. El ensayo se basó en la oxidación del alcohol veratrílico a veratrilaldehído en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La reacción se realizó en un espectrofotómetro a 310 nm durante dos minutos. La actividad enzimática se expresó en U/ml. Una unidad (U) se define como la cantidad de actividad enzimática que cataliza la transformación de 1 μ mol de sustrato por minuto (Tien y Kirk, 1983). $\epsilon = 9\ 300$.

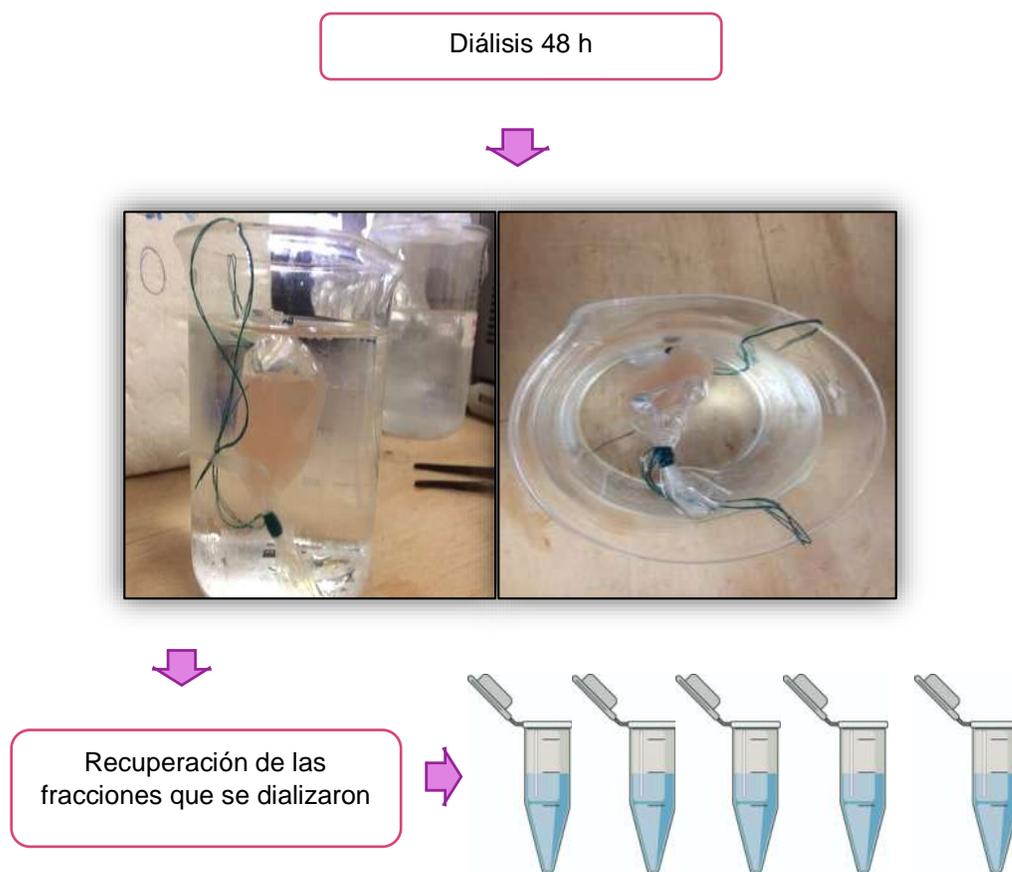
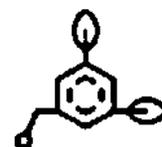


Figura 6: Representación de las fracciones que se dializaron con búfer de fosfato de potasio a pH 6,8.



Análisis de los datos

Los resultados de los experimentos de diferentes bioensayos se analizaron estadísticamente con el programa STATISTICA 7. Para el análisis se emplearon pruebas univariados y multivariados, la prueba post hoc de Tukey y *t*-Student. Las diferentes letras se utilizan para indicar los tratamientos que difieren significativamente ($p < 0,05$).

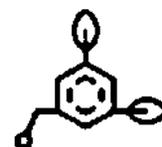


DISCUSIÓN

En 2017 se describieron 2,189 especies fúngicas. El grupo es integrado por macro hongos como las setas y los polipores; otros de estructuras pequeñas y discretas portadoras de esporas, como lo mohos. Los nuevos descubrimientos predominantemente son del filo Ascomycota, que representan el 68 % (1, 481 especies) de hongos nuevos. En orden de importancia le siguen los Basidiomycota que representaron el 31 % (684 especies). Otros phyla están mal representados, constituyendo el 1 % final (24 especies) (Willis, 2018). Por lo que, el número de especies fúngicas que habitan el planeta es desconocido.

Por otra parte, los organismos degradadores, tal como los hongos polipores y corticioides, que a menudo producen grandes estructuras conspicuas de esporas, pueden ser recicladores extremadamente importantes de material leñoso. Interesantemente, en 2017 se describieron más de 70 nuevas especies de 38 géneros de hongos de soporte y corteza, incluidas ocho nuevas especies de hongos de podredumbre parda en *Antrodia*, pólipos de podredumbre blanca en *Polyporus*, *Fomitiporia* y *Fomitiporella*, y hongos de corteza en el género *Lyomyces* (Willis, 2018). Asimismo, una estimación conservadora ampliamente aceptada es que sólo el 5 % de los hongos son conocidos. Entonces de forma natural se establece el objetivo de dilucidar la composición del secretoma enzimático de hongos de linaje temprano zoospóricos, en todos los filos (James *et al.*, 2006, Kämper *et al.*, 2006, Powell y Letcher, 2014); para contribuir a resolver la parte basal del árbol fúngico de la vida y allanar el camino para el uso industrial de sus enzimas únicas mediante el desarrollo de métodos para la clonación, expresión y caracterización de proteínas de enzimas de tales hongos.

En los últimos años la implementación de procesos tecnológicos amigables con el ambiente se convirtió en una meta para las industrias y población en general. Debido a que muchas de ellas generan durante sus procesos compuestos de desechos de difícil degradación. Estos compuestos son generalmente de naturaleza



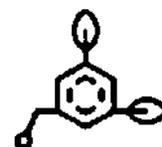
polifenólica. Actualmente, las industrias realizan tratamientos donde se utilizan agentes químicos que resultan tóxicos para el ambiente. Por ello, la iniciativa de buscar alternativas que sean amigables con el ambiente.

En esta búsqueda la investigación biotecnológica se considera con potencial, ya que es una herramienta que promueve el uso de microorganismos o una parte de ellos para la remediación de estos compuestos de desecho. El uso de los hongos basidiomicetos es un campo ampliamente conocido por su capacidad para degradar a compuestos policíclicos, inorgánicos y recalcitrantes como la lignina. Pero el uso de hongos ascomicetos es un campo que aún queda por explorar. Para las industrias papeleras es de interés el uso de estos microorganismos ya que por medio de ellos se degradan compuestos recalcitrantes como lo es la lignina. Esta es un polímero aromático complejo que es abundante en la naturaleza, constituye el 15 % de la biomasa terrestre (Quintero, J., y Gumersindo, F., 2006). Lo cual hace de interés el estudio de alternativas biotecnológicas como lo son el uso de enzimas con potencial óxido-reductor.

Los hongos de podredumbre blanda son conocidos por la producción de enzimas extracelulares con potencial óxido-reductor. Sin embargo, el uso de algunos géneros de ascomicetos es poco conocido por lo que su estudio es de interés.

Entre las enzimas fúngicas del complejo óxido reductor, las lacasas son de particular interés por su versatilidad y porque sólo requieren oxígeno molecular como co-sustrato (Strong y Claus, 2011). Los hongos que degradan la madera son productores de estas enzimas (Shi *et al.*, 2014). Recientemente, los hongos de pudrición blanca *Trametes hirsuta* se describieron como un prometedor productor de lacasas (Martin-Sampedro *et al.*, 2013).

Los escasos caracteres morfológicos y bioquímicos que presentan los hongos no permitieron determinar su diversidad. Sin embargo, con la tecnología del DNA se puso de manifiesto la gran diversidad que presentan los hongos. Este es uno de los antecedentes que motivaron la obtención de criterios de selección de un hongo productor del complejo óxido reductor. Tres aislados fúngicos silvestres se obtuvieron en una tercera selección. Ellos exhibieron características similares, por lo que se requirieron criterios de discriminación. Para ello, buscamos genomas

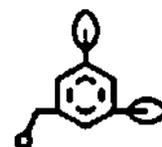


secuenciados de *Fusarium*. En sus genomas buscamos genes para la lacasa y por correlación asumimos que los aislados silvestres poseían estas enzimas. Con esta inferencia supusimos que los tres aislados poseen las enzimas del complejo óxido reductor. Aunque no determinamos el número de genes que codifican para las oxidasas y reductasas. En seguida, un modelado molecular para determinar las interacciones entre el sustrato y la enzima se realizó. Encontramos que *in silico*, la enzima fúngica se comporta como lo hace experimentalmente la de *Fusarium* sp. entonces este fue el primer criterio de selección.

En los tres aislados fúngicos se exploró su capacidad de producir proteína extracelular. Encontramos que las tres cepas produjeron interesante cantidad de proteína extracelular y adicionalmente crecieron abundantemente en los medios de crecimiento que se ensayaron. Asimismo, del proteoma extracelular se realizó un fraccionamiento salino para determinar el contenido de proteína por fracción salina y que nos sirviera de criterio de selección. Una vez más se observó que el aislado de *Fusarium* fue el interesante.

Un tercer criterio de selección se requirió y este fue el de la actividad del complejo óxido reducción. Las tres enzimas se midieron en los tres aislados fúngicos. La lacasa, lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa. Como resultado se observó que todos los aislados fueron interesantes, pero notablemente el aislado de *Fusarium* fue el que destacó entre ellos.

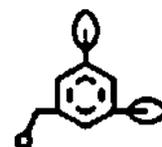
Este aislado de *Fusarium* es un candidato interesante para continuar con el estudio de la producción del complejo óxido reductor. El tipo y condiciones de fermentación en un futuro se establecerán. Asimismo, la inducción de la producción de enzimas extracelulares se tendrá que determinar. No está por demás hacer la mención de la importancia biotecnológica de las enzimas que integran el complejo óxido-reductor de *Fusarium*. Para ello, la utilización de investigaciones recientes haré.



Perspectivas

Los productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCP) son contaminantes bioactivos y se desarrolló una creciente atención en los últimos años por sus posibles amenazas a los ambientes acuáticos (Liu y Wong 2013). Estos contaminantes son parcialmente o en absoluto eliminados por los tratamientos convencionales plantas de aguas residuales (PTAR) (Liu y Wong 2013; Kosma *et al.*, 2014). PPCP comunes incluyen al paracetamol y carbamazepina (Aksu y Tunc, 2005). El acetaminofén es un analgésico que se detecta con frecuencia en aguas residuales; su concentración puede superar los 150 mg/l (Wu *et al.*, 2012). La carbamazepina es un anticonvulsivo y fármaco estabilizador del estado de ánimo, su eliminación es poco eficiente lo describe EDAR (Fent *et al.*, 2006). Esta se detectó en concentraciones superiores a 3 mg/l en efluentes de PTAR (Zhang *et al.* 2008). Durante los últimos años se propusieron varias tecnologías para la eliminación de ambos productos farmacéuticos. Éstos incluyen ozonización, oxidación avanzada y procesos de filtración con membrana (Hai *et al.*, 2011; Tabassum *et al.*, 2011; Domínguez *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015). En muchos casos, estas tecnologías proporcionan eficiencia de eliminación farmacéutica. Sin embargo, estos procesos no son económicamente viables en concentraciones pequeñas de fármacos (Touahar *et al.*, 2014). Además, los procesos químicos pueden generar subproductos de efectos desconocidos que pueden generar un riesgo de toxicidad mayor que el de sus compuestos iniciales (Illes *et al.*, 2014).

La transformación enzimática es una alternativa atractiva para reemplazar o complementar las tecnologías convencionales que se utilizan en los tratamientos de aguas residuales (PTAR). Las principales ventajas de estos sistemas son los rendimientos de eliminación de PPCP, la inversión reducida en costos iniciales, flexibilidad, simplicidad de diseño y biocompatibilidad (Vijayaraghavan y Yun 2008). Los productos de transformación que se generan por la acción enzimática son menos tóxicos para los organismos o muestran una menor actividad biológica que los compuestos iniciales (Arboleda *et al.*, 2013). Estudios recientes confirman la capacidad de los hongos de pudrición blanca que degradan la lignina para transformar productos farmacéuticos como ibuprofeno, ketoprofeno, ácido



clofibrato, atenolol, propranolol, diclofenaco y ácido mefenámico (Hata *et al.*, 2010; Cruz-Morato *et al.*, 2013; Haroune *et al.*, 2014). Esta capacidad se relaciona en parte con la secreción de enzimas oxidativas, como lacasa (EC 1.10.3.2), lignina peroxidasa (EC1.11.1.14), manganeso peroxidasa (EC 1.11.1.13) y peroxidasa versátil (EC 1.11.1.16) (Rodarte-Morales *et al.*, 2011). La eliminación completa de carbamazepina sólo por lacasa, MnP o LiP no se ha observado (Marco-Urrea *et al.*, 2009; Rodarte-Morales *et al.*, 2011). Sin embargo, se observó una eliminación significativa de carbamazepina en soluciones de cócteles de productos farmacéuticos (Haroune *et al.*, 2014; Touahar *et al.*, 2014). Hasta donde sabemos, las vías de reacción involucradas en la transformación de tales contaminantes en una solución mixta aún no se han explorado.

CONCLUSIÓN

Los criterios de selección que se determinaron en este trabajo permitieron distinguir al asilado silvestre de *Fusarium* como un candidato interesante para la producción del complejo óxido reductor que contiene lacasa, lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aksu Z, Tunc, O. **(2005)**. Application of biosorption for penicillin G removal: comparison with activated carbon. *Process biochem.* Vol. 40, no. 2, p: 831–847.
- Andreasson, L. E., y Reinhammar, B. **(1979)**. The mechanism of electron transfer in laccase-catalysed reactions. *Biochimica et biophysica acta.* Vol. 568, no. 1, p:145-156.
- Arboleda, C., Cabana, H., De Pril, E., Jones, JP., Jiménez, G.A., Mejía, A.L., Agathos, S.N., Penninckx, M.J. **(2013)**. Elimination of bisphenol A and triclosan using the enzymatic system of autochthonous Colombian forest fungi. *ISRN Biotechnol.* Vol. 2013, no.1, p: 1-12.
- Bajpai, P., Anand A., y Bajpai P. K. **(2007)**. Bleaching with lignin-oxidizing enzymes. *Biotechnol Ann Rev.* Vol. 12, no.1, p: 349-378.
- Bartnicki-Garcia, S. y Nickerson, W. J. **(1962)**. Nutrition, growth and morphogenesis of *Mucor rouxii*. *Journal of bacteriology.* Vol. 84, no.4, p: 841-858.
- Beltrán, R., Del Río, R., Hernández, Z., Martínez, M. **(2018)**. Docking Molecular de complejos formados entre el compuesto UMSNH2014 y ciclodextrinas. UMSNH. Morelia, Mich.
- Bonifaz, A. **(2012)**. *Micología Médica Básica.* México, D.F: McGraw-Hill Interamericana. Vol. 2, p:10 -32.
- Bourbonnais, R., y Paice, M. G. **(1990)**. Oxidation of non-phenolic substrates. *FEBS letters.* Vol. 267, no.1, p: 99-102.
- Carbajo, G. J. M. **(2015)**. Utilización de hongos de podredumbre blanca en la producción de pasta de celulosa de alto rendimiento. Tesis Doctoral. Madrid, España. Universidad Complutense de Madrid.
- Castañeda-Uribe, R. **(2017)**. Escrutinio de hongos con actividad enzimática óxido-reductora. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. UMSNH.
- Castillo, F. **(2005)**. *Biotecnología ambiental.* Madrid, España. Editorial Tebar, S.L.
- ChemSpider: <http://www.chemspider.com>



- Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T., J., Higgins, DG., Thompson, J., D. **(2003)**. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res.* Vol. 3, no.3, p: 497-3500.
- Cruz-Morató, C., Ferrando-Climent, L., Rodriguez-Mozaz, S., Barceló, D., Marco-Urrea, E., Vicent, T., y Sarrà, M. **(2013)**. Degradation of pharmaceuticals in non-sterile urban wastewater by *Trametes versicolor* in a fluidized bed bioreactor. *Water research.* Vol. 47, no. 14, p: 5200-5210.
- Dolphin, D., Nakano, T., Maione, T. E., Kirk, T. K., y Farrel, R. **(1987)**. Lignin enzymic and microbial degradation. *Paris. EMBL- EBI.* Vol. 41, no. 1, p: 157-162.
- Dominguez JR, Gonzalez T, Palo P, Cuerda-Correa EM. **(2014)**. Advanced photochemical oxidation of emergent micropollutants: carbamazepine. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* Vol. 49, p: 988–997.
- Faraco, V., Piscitelli, A., Sannia, G., y Giardina, P. **(2007)**. Identification of a new member of the dye-decolorizing peroxidase family from *Pleurotus ostreatus*. *World journal of microbiology and biotechnology.* Vol. 23, no.6, p: 889-893.
- Fengel, D., y Wegener, G. **(2003)**. Lignin–polysaccharide complexes. *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions.* Vol. 91, no. 1, p: 167-174.
- Fent, K., Weston, A. A., y Caminada, D. **(2006)**. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic toxicology.* Vol. 76, no. 2, p: 122-159.
- Giardina, P., Cannio, R., Martirani, L., Marzullo, L., Palmieri, G., y Sannia, G. **(1995)**. Cloning and sequencing of a laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology.* Vol 61, no. 6, p: 2408-2413.
- Hai, F. I., Li, X., Price, W. E., Nghiem, L. D. **(2011)**. Removal of carbamazepine and sulfamethoxazole by MBR under anoxic and aerobic conditions. *Bioresour Technol.* Vol. 102, p: 10386–10390.
- Haroune, L., Saibi, S., Bellenger, J.P., Cabana, H. **(2014)**. Evaluation of the efficiency of *Trametes hirsuta* for the removal of multiple pharmaceutical compounds under low concentrations relevant to the environment. *Bioresour Technol.* Vol. 171, p: 199–202.



- Harris, E. L. V., y AngaL, S. **(1995)**. Protein purification methods. A practical approach. 6th edition, Oxford University Press, New York. p. 151-156.
- Hata, T., Kawai, S., Okamura, H., Nishida, T. **(2010)**. Removal of diclofenac and mefenamic acid by the white rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624 and identification of their metabolites after fungal transformation. Biodegradation. Vol. 21, p: 681–689.
- He, Z., Zhong, C., Su, S., Xu, M., Wu, H., y Cao, Y. **(2012)**. Enhanced power-conversion efficiency in polymer solar cells using an inverted device structure. Nature photonics. Vol. 6, no. 9, p: 591.
- Illés, E., Szabó, E., Takács, E., Wojnárovits, L., Dombi, A., y Gajda-Schranz, K. **(2014)**. Ketoprofen removal by O₃ and O₃/UV processes: Kinetics, transformation products and ecotoxicity. Science of the total environment. Vol. 472, p: 178-184.
- James, T.Y., Letcher, P., M., Longcore, J., E., Mozley-Standridge, S., E., Porter, D., Powell, M., J., Griffith, G., W., Vilgalys, R. **(2006)**. A molecular phylogeny of the flagellated fungi (Chytridiomycota) and description of a new phylum (Blastocladiomycota). Mycologia. Vol. 98, p: 860 y 871.
- Kamper, J., Kahmann, R., Bolker, M., et al., Birren, B.W. **(2006)**. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. Nature. Vol. 444, p: 97-101.
- Kirk T. K. y Farrell R. L. **(1987)**. Enzymatic “combustion”: The microbial degradation the lignin. Annu. Rev. Microbiol. Vol. 41, p:465-505.
- Kudangaa, T., Nyanhongob, G. S., Guebitzb, G.M., Burtona, S. **(2011)**. Potential applicationsnof laccase-mediated coupling and grafting reactions: a review. Enz. Microb. Technol. Vol. 48, p: 195-208.
- Laemmli, U. K. **(1970)**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. Vol. 227, no. 5259, p: 680.
- Liu, J. L., y Wong, M. H. **(2013)**. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs): a review on environmental contamination in China. Environment international, Vol. 59, p: 208-224.



- Lowry D. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. y Randall R. J. **(1951)**. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 193, p :268-275.
- Lutzoni F., y Miadlikowska J. **(2009)**. Lichens. *Current biology*. Vol. 19, p: 502-503.
- Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Vicent, T., y Caminal, G. **(2009)**. Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. *Chemosphere*. Vol. 74, no. 6, p: 765-772.
- Martin-Sampedro R., Miranda, J., Villar, J.C., Eugenio, M. E. **(2013)**. Laccase from *Trametes* sp. I-62: production, characterization, and application as a new laccase foreucalyptus globuluskraft pulp biobleaching. *Ind Eng Chem Res*. Vol. 52, p: 15533–15540.
- Mckee, T., y Mckee, J. R. **(2003)**. *Bioquímica: la base molecular de la vida*, Aravaca, Madrid: McGraw-Hill/Interamericana de España, S. A, U.
- Monterola N. K. Y. **(2013)**. Actividad de un disacárido óxido-reductasa en un aislado fúngico silvestre. Tesis Licenciatura. Universidad del Mar, Campus Puerto Escondido, Oaxaca.
- NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- Ozturk U. R., y Kasikara P. N. **(2007)**. Enhanced Production of Manganese Peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*. *Brazilian archives of biology and technology*. Vol. 50, p: 913-920.
- Papinutti V.L. Diorio L.A. y Forchiassin F. 2003. Production of laccase and manganese peroxidase by *Fomes sclerodermeus* grown on wheat bran. *J. Ind. Microbiol*. Vol. 30, p: 157-160.
- Pérez, C., De Jesús, P., y Griebenow, K. **(2002)**. Preservation of lysozyme structure and function upon encapsulation and release from poly (lactic-co-glycolic) acid microspheres prepared by the water-in-oil-in-water method. *International journal of pharmaceutics*. Vol. 248, no. 1-2, p: 193-206.
- Pickering, W.F. **(1980)**. *Química analítica*. Barcelona, España. Reverte, S.A. p: 143.



Powell, M.J., Letcher, P.M., **(2014)**. Chytridiomycota, Monoblepharidomycota, and Neocallimastigomycota. In: McLaughlin, D.J., Spatafora, J.W. (Eds.), *The Mycota*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. p: 141 y 175.

Protein Data Bank: <https://www.rcsb.org>.

QUINTERO, J. C., y Gumersindo, F. C. **(2006)**. Producción de enzimas ligninolíticas con hongos basidiomicetos cultivados sobre materiales lignocelulósicos. *Vitae*, Vol. 13, no. 2, p: 61-67.

Reihammar, B. y Oda, Y. **(1979)**. Spectroscopic and analytic properties of *Rhus vernicifera* laccase depleted in type 2 copper. *Inorganic Chemistry*. Vol.11, p: 115.

Rodarte-Morales, A. I., Feijoo, G., Moreira, M. T., y Lema, J. M. **(2011)**. Degradation of selected pharmaceutical and personal care products (PPCPs) by white-rot fungi. *World Journal of Microbiology and biotechnology*. Vol. 27, no. 8, p: 1839-1846.

Rowell, R. M., Pettersen, R., Han, J. S., Rowell, J. S. y Tshabalala, M. A. **(2005)**. Cell Wall Chemistry. En R. M. Rowell (Ed.), *Handbook of wood chemistry and wood composites*. Boca Raton, Florida, EUA: CRC Press. p: 35-74.

Sariaslani, F. S. **(1989)**. Microbial enzymes for oxidation of organic molecules. *Critical Reviews in Biotechnology*. Vol. 9, p: 171-257.

Shi, J., y Vakoc, C. R. **(2014)**. The mechanisms behind the therapeutic activity of BET bromodomain inhibition. *Molecular cell*, Vol. 54, no. 5, p: 728-736.

Solomon, E.I., Sundaram, U.M., Machonkin, T. E. **(1996)**. Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chem Rev*. Vol. 96, no.7, p: 2563-2606.

Songulashvili, G., Elisashvili, V., Wasser, S. P., Nevo, E., y Hadar, Y. **(2007)**. Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 41, no. 1-2, p: 57-61.

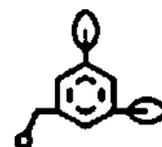
Stewart, D. **(2008)**. Lignin as a base material for materials applications: Chemistry, application and economics. *Industrial Crops and Products*. Vol. 27, p: 202-207.

Strong, P. J., y Claus, H. **(2011)**. Laccase: a review of its past and its future in bioremediation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, Vol. 41, no. 4, p: 373-434.



- Tabassum S, Sabir S, Sulaiman O, Rafatullah M, Khan I, Hashim R. **(2011)**. Oxidative degradation of acetaminophen by permanganate in neutral medium-A kinetic and mechanistic pathway. *J Dispersion Sci Technol*. Vol. 32, p: 217–223.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S: MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*. **(2007)**. Vol. 24, p: 1596-1599.
- Teijón-Rivera, J.M., Blanco-Gaitán, M.D., Agrasal-Aragón, C., Olmo-López, R. **(2001)**. Bioquímica estructural: conceptos y tests. Madrid, España. Tebar, Mares, S.L. p: 280.
- Thurston, C. F. **(1994)**. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, Vol.140, no.1, p: 19-26.
- Tien M. y Kirk T. K. **(1983)**. Lignin-Degrading Enzyme from the Hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *SCIENCE*. Vol. 221, p: 661-663.
- Touahar IE, Haroune L, Ba S, Bellenger JP, Cabana H. **(2014)**. Characterization of combined cross-linked enzyme aggregates from laccase, versatile peroxidase and glucose oxidase, and their utilization for the elimination of pharmaceuticals. *Sci Total Environ*. Vol. 481, p: 90–99.
- Touahar, I. E., Haroune, L., Ba, S., Bellenger, J. P., y Cabana, H. **(2014)**. Characterization of combined cross-linked enzyme aggregates from laccase, versatile peroxidase and glucose oxidase, and their utilization for the elimination of pharmaceuticals. *Science of the total environment*. Vol. 481, p: 90-99.
- Trott, O., Olson A. J. **(2010)**. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, *Journal of Computational Chemistry*. Vol. 31, p: 455-461.
- Trower, M. K., Sariaslani, F. S., y O'Keefe, D. P. **(1989)**. Purification and characterization of a soybean flour-induced cytochrome P-450 from *Streptomyces griseus*. *Journal of bacteriology*. Vol. 171, no.4, p: 1781-1787.
- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A., y Itävaara, M. **(2000)**. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource technology*. Vol. 72, no.2, p: 169-183.

Uniprot: <https://www.uniprot.org/>



- Urek, R. O., y Pazarlioglu, N. K. **(2007)**. Enhanced production of manganese peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*. Brazilian Archives of Biology and Technology. Vol. 50, no. 6, p: 913-920.
- Vijayaraghavan, K., y Yun, Y. S. **(2008)**. Bacterial biosorbents and biosorption. Biotechnology advances. Vol. 26, no. 3, p: 266-291.
- Widsten, P., y Kandelbauer, A. **(2008)**. Laccase applications in the forest products industry: a review. Enzyme and microbial technology. Vol. 42, no. 4, p: 293-307.
- Willis, K. J. **(2018)**. State of the World's Fungi. Report. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Wong D. W. S. **(2009)**. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. Appl. Biochem. Biotechnol. Vol. 157, p :174-209.
- Wu, S., Zhang, L., Chen, J. **(2012)**. Paracetamol in the environment and its degradation by microorganisms. Appl Microbiol Biotechnol. Vol. 96, p: 875–884.
- Yaropolov, A. T., Skorobogat'ko, O. V., Vartanov, S. S., y Varfolomeyev, S. D. **(1994)**. Laccase. Properties, catalytic mechanism, and applicability. Applied Biochemistry and Biotechnology. Vol. 49, p: 257-280.
- Yoshida, H. **(1883)**. LXIII chemistry of lacquer (Urushi). Part I. communication from the chemical society of Tokio. Journal of the Chemical Society, Transactions. Vol. 43, p: 472-486.
- Zhang, H., Zhang, J., Zhang, X., Geng, A. **(2018)**. Purification and characterization of a novel manganese peroxidase from white-rot fungus *Cerrena unicolor* BBP6 and its application in dye decolorization and denim bleaching. Process Biochemistry. Vol. 66, p: 222-229.
- Zhang, S. Zhang, F. He, X. Qin, X. Zhang Y. Yang Y. **(2016)**. Characterization of a manganese peroxidase from white-rot fungus *Trametes* sp. 48424 with strong ability of degrading different types of dyes and polycyclic aromatic hydrocarbons, J. Hazard. Mater. Vol. 320, p: 265–277.
- Zhang, Y., Geissen, S.U., y Gal, C. **(2008)**. Carbamazepine and diclofenac: removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. Chemosphere Vol. 73, p:1151–1161.

