

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS



Título:



“Establecimiento de las condiciones de fermentación de *Fusarium oxysporum* para la producción de Lacasas con potencial en la degradación de contaminantes fenólicos”

TESIS

Presenta:

Q.F.B. KATIA LIZBETH ALONSO HURTADO

Para obtener el título:

M.C. Biología Experimental

Asesor:

D.C. MAURO MANUEL MARTÍNEZ PACHECO

Morelia, Michoacán, abril 2022.

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. CONTAMINANTES ANTROPOGÉNICOS	4
1.2. LAS ENZIMAS EXTRACELULARES, SU MEDIO DE ADAPTACIÓN Y USO EN SECTORES INDUSTRIALES	7
1.3. LACASAS	8
1.4. EL PROCESO DE FERMENTACIÓN COMO MÉTODO DE PRODUCCIÓN DE ENZIMAS FÚNGICAS	10
1.5. HERRAMIENTAS PARA LA COMPRENSIÓN DE PROCESOS COMPLEJOS COMO LA FERMENTACIÓN MICROBIANA DE COMPUESTOS ANTROPOGÉNICOS.....	11
1.6. EL DESAFÍO QUE REPRESENTA LA ELIMINACIÓN DE CONTAMINANTES DEL AGUA	12
1.7. LA PRODUCCIÓN DE MEDICAMENTOS EN MÉXICO	16
1.8. LAS AFECCIONES QUE CAUSAN LOS COMPUESTOS FENÓLICOS EN EL MEDIO AMBIENTE	17
1.9. HERRAMIENTAS COMPUTACIONALES, REPOSITORIOS Y OTROS ASPECTOS BIOINFORMÁTICOS EN EL ESTUDIO DE LAS LACASAS FÚNGICAS.	18
1.10. <i>FUSARIUM</i>	18
1.11. ANÁLISIS COMPUTACIONAL DEL COMPLEJO ENZIMA-SUSTRATO.....	20
1.12. ACOPLAMIENTO MOLECULAR.....	20
1.13. DINÁMICA MOLECULAR	21
2. ANTECEDENTES	22
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
4. JUSTIFICACIÓN	24
5. HIPÓTESIS	25
6. OBJETIVO GENERAL	25
7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25

8.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	26
9.	MATERIALES Y MÉTODOS	27
9.1.	MICROORGANISMOS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO.....	27
9.2.	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS E6FO Y E13FO MEDIANTE EL FACTOR DE ELONGACIÓN 1A (<i>TEF-1A</i>).....	27
9.3.	CUSO TEMPORAL DE CRECIMIENTO EN MEDIO MÍNIMO	28
9.4.	ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACIÓN ÓPTIMAS PARA LA PRODUCCIÓN DE LACASAS FÚNGICAS EXTRACELULARES	28
9.5.	BOSQUES ALEATORIOS.....	30
9.6.	SELECCIÓN DE LA FUENTE DE CARBONO PARA LA OBTENCIÓN DE LACASAS DE <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i>	33
9.7.	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO	34
9.8.	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LACASAS.....	34
9.9.	ENSAYOS IN SILICO	34
9.9.1.	BÚSQUEDA DEL SITIO ACTIVO Y SU CONSERVACIÓN EN DISTINTAS LACASAS	34
9.9.2.	BÚSQUEDA DE SITIOS DE GLICOSILACIÓN EN LAS LACASAS DE <i>F. OXYSPORUM</i>	35
9.9.3.	ACOPLAMIENTO MOLECULAR.....	35
9.9.4.	DINÁMICA MOLECULAR	35
9.10.	EFFECTO DE LOS FENOLES CON <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> SC 33 Y <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> SC 22 EN MEDIO SÓLIDO	36
9.11.	INDUCCIÓN DE LACASAS CON FENOLES.....	36
9.12.	CARACTERIZACIÓN DE LAS LACASAS DE <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> SC 33.....	37
9.12.1.	CONCENTRACIÓN DE LAS LACASAS DE <i>F. OXYSPORUM</i> SC 33	37
9.12.2.	CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR DE LAS LACASAS DE <i>F. OXYSPORUM</i> SC 33 CON SEPHADEX G-100.....	37
9.12.3.	DESGlicosilación de las lacasas purificadas de <i>F. OXYSPORUM</i> SC 33	37
9.12.4.	ELECTROFORESIS (SDS-PAGE)	38
9.12.5.	TINCIÓN CON NITRATO DE PLATA.....	38
9.12.6.	PARÁMETROS BIOQUÍMICOS APARENTES DE LAS LACASAS DE <i>F. OXYSPORUM</i> SC 33	39

9.12.6.1. DETERMINACIÓN DE PH	39
9.12.6.2. DETERMINACIÓN DE TEMPERATURA	39
9.12.6.3. DETERMINACIÓN DE K_M Y V_{MAX}	39
9.13. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE LAS LACASAS DEL PROTEOMA EXTRACELULAR DE <i>F. OXYSPORUM</i> SC 33 EN LA DEGRADACIÓN DE ABTS, RBBR, ACETAMINOFÉN Y CARBAMAZEPINA	39
9.13.1. ANÁLISIS DE ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS EN LA REMOCIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS	39
9.13.2. ANÁLISIS DE ESPECTROFOTOMETRÍA INFRARROJA EN LA REMOCIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS	40
9.14. ANÁLISIS DE LOS DATOS	40
11. DISCUSIÓN	41
12. CONCLUSIÓN	49
13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

RESUMEN (Remoción, antropogénicos, Placket-Burman, purificación, fermentación).

Especies fúngicas jamás descritas o útiles para el hombre son temas de investigación vigente en el área biotecnológica. Su realización tiene como finalidad la construcción de un acervo de especies fúngicas que transformen alimentos, que favorezcan el ciclo biogeoquímico, que produzcan metabolitos bioactivos o que mitiguen la toxicidad de compuestos antropogénicos. Es en este último aspecto en el que se plantea esta investigación. *Fusarium* es una especie ubicua, compleja, originaria de suelo, proveniente de aislados saprófitos y patógenos. Las formas fitopatógenas de *Fusarium* se conocen por su capacidad para producir enzimas celulolíticas. Asimismo, en otras investigaciones se describió con capacidad para producir óxido-reductasas. Una de estas son las Lacasas (E.C. 1.10.3.2). Las cuales se conocen por su capacidad para catalizar una amplia variedad de sustratos fenólicos y no fenólicos. Los cuales son estructuras de diferentes compuestos antropogénicos. En la investigación se establecieron las condiciones de fermentación de dos cepas de *Fusarium oxysporum* para la producción de Lacasas. Con un modelo Placket-Burman se identificaron factores de interés en su producción tal como fuente de carbono y temperatura. Para continuar el estudio se purificaron parcialmente las Lacasas de *F. oxysporum* species complex 33 NRRL38515. Mediante precipitación con membranas de ultrafiltración y cromatografía de exclusión molecular se obtuvieron Lacasas de un peso molecular entre 50 kDa y 100 kDa. Este extracto purificado se evaluó con diferentes colorantes y fármacos de estructuras fenólicas y observamos modificaciones estructurales en los productos de reacción.

ABSTRACT

Fungal species never described or useful to man are current research topics in the biotechnological area. Its purpose is to build a collection of fungal species that transform food, that favor the biogeochemical cycle, that produce bioactive metabolites or that mitigate the toxicity of anthropogenic compounds. It is in this last aspect that this research is based. *Fusarium* is a ubiquitous, complex species, native to the soil, originating from isolated saprophytes and pathogens. Phytopathogenic forms of *Fusarium* are known for their ability to produce cellulolytic enzymes. Likewise, in other investigations it was described with the capacity to produce oxide-reductases. One of these is the Laccases (E.C. 1.10.3.2). Which are known for their ability to catalyze a wide variety of phenolic and non-phenolic substrates. Which are structures of different anthropogenic compounds. In the investigation, the fermentation conditions of two strains of *Fusarium oxysporum* for the production of Laccases can be produced. With a Plackett-Burman model, factors of interest in its production were identified, such as carbon source and temperature. To continue the study, the Laccases of *F. oxysporum* species complex 33 NRRL38515 were partially purified. By means of precipitation with ultrafiltration membranes and molecular exclusion chromatography, Laccases with a molecular weight between 50 kDa and 100 kDa were purchased. This purified extract was evaluated with different dyes and drugs with phenolic structures and we observed structural modifications in the reaction products.

1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día la cantidad de contaminantes antropogénicos en el ambiente es de interés para todas las sociedades mediante sus agencias gubernamentales (Y. Wang *et al.*, 2021). Debido a que el nivel de contaminación que ocasionan algunos residuos farmacéuticos, alimentarios, agrícolas, ganaderos, textiles y plásticos alcanzan concentraciones de ng/L a mg/L. Los cuales son detectables en cuerpos de agua, suelos y aire. El crecimiento de la población, el uso industrializado y la incapacidad de los organismos vivos para metabolizar perfectamente estos compuestos conduce a una mayor bioacumulación en el ecosistema (Polyethylenimine y Rysov, 2020). Los contaminantes antropogénicos que generan un problema de toxicidad son los productos farmacéuticos tales como el diclofenaco, paracetamol, ibuprofeno, carbamazepina, los derivados de la industria alimentaria tal como el bisfenol, los productos de cuidado personal como el triclosán, los productos agrícolas, pesticidas y narcóticos, de los cuales muchos son disruptores endocrinos (ATSDR, 2016; Zhu *et al.*, 2016; Polyethylenimine y Rysov, 2020). Los disruptores endocrinos se asocian con enfermedades hepáticas, pulmonares, cancerosas, problemas reproductivos y alteraciones endocrinas (Al Sharabati *et al.*, 2021).

Diversas organizaciones en diferentes países establecen restricciones y límites legales promedio de estos compuestos. En la tabla 1 se muestran las concentraciones máximas de contaminantes antropogénicos que se encuentran en diferentes ambientes acuáticos.

1.1. CONTAMINANTES ANTROPOGÉNICOS

Tabla 1. Concentraciones máximas de contaminantes antropogénicos que se encuentran en diferentes ambientes, modificado de López Pacheco *et al.*, 2019.

Concentraciones (ng/L)	Fármacos	Principio activo	Industria de la comida	Productos de cuidado personal	Agricultura
Reservorios de agua potable	10	28.3	683	50	-
Plantas de tratamiento de aguas industriales	1673000	1721	7630	-	78
Fuente de agua	276000	490	24961	-	25900
Océanos	129	-	7708	-	-
Aguas subterráneas	339	-	50.9	-	9.28

Los fenoles son la mayor parte de los contaminantes ambientales. Los cuales se definen como hidroxiderivados del benceno y sus núcleos condensados. Ellos están presentes en las aguas residuales domésticas e industriales, en las aguas naturales y en los suministros de agua potable (NMX-AA-050-SCFI-2001). Debido a su toxicidad, recalcitrancia y a sus propiedades bioacumulativas, diversas organizaciones establecen medidas para su eliminación y límites de concentraciones en diferentes ambientes (Rani y Shanker, 2018).

El Registro Estatal de Emisiones y Fuentes Contaminantes (PRTR) en España establece que las concentraciones de fenoles deben ser inferiores a 1 µg/L. la Administración de Salud y Seguridad Ocupacional (OSHA) establece que la exposición de por vida a concentraciones mayores a los 2 mg/L en agua potable podría generar daños a la salud humana. Asimismo, la FDA determinó que la

concentración de fenoles en aguas embotelladas no debe exceder los $\mu\text{g/L}$. Por otro lado, la OSHA estableció límites legales promedio de 5 parte por millón (ppm) de fenoles en el aire. En nuestro país la NMX-AA-050-SCFI-2001 establece el método para la determinación de fenoles en aguas naturales, residuales y residuales con tratamiento. Sin embargo, la información respecto a concentraciones límites en otros ambientes es escasa.

Los métodos de tratamiento para la eliminación de contaminantes tóxicos en aguas involucran tres etapas. Estas incluyen tratamientos primarios, secundarios y terciarios. La etapa de tratamiento primario es una etapa de cribado preliminar que depende del tamaño de los componentes para filtrarlos y separarlos. Luego sigue una etapa de tratamiento secundario para eliminar los sólidos en suspensión por descomposición microbiana. Finalmente, la etapa de tratamiento terciario tiene lugar para mejorar la calidad del agua antes de ser descargada en ambientes marinos o reciclada para ser utilizada para muchos propósitos, como riego de cultivos y jardines, lavandería, lavado de autos y en muchas otras industrias (Al Sharabati *et al.*, 2021; Singh, 2021).

Debido a que los fenoles y sus metabolitos son omnipresentes en el ambiente. Su eliminación efectiva consiste en técnicas basadas en baja energía. Las cuales son económicas y respetuosas con el ambiente. Sin embargo, la remoción de estos compuestos es un reto, ya que las tecnologías convencionales solo realizan remociones parciales (Rani y Shanker, 2018). Asimismo, la cantidad y diversidad de moléculas contaminantes es abundante. Por tanto, la investigación biotecnológica encuentra un área de oportunidad en la búsqueda de alternativas de eliminación de fenoles mediante organismos biológicos.

Una alternativa de tratamiento para eliminación de fenoles es el uso de enzimas fúngicas

Los hongos son omnipresentes y los principales responsables de la descomposición de materia orgánica, la liberación de fósforo, nitrógeno y carbono en la atmósfera y el suelo. Estos secretan una amplia variedad de enzimas y metabolitos secundarios

bioactivos. Algunas especies despiertan principal interés por su capacidad para adaptarse a condiciones extremas de la Tierra. Ya que, para su sobrevivencia a esta combinación de restricciones ambientales, tuvieron que desarrollar múltiples mecanismos de tolerancia al estrés (Zucconi *et al.*, 2020).

Un ejemplo son los hongos de pudrición blanca que degradan la lignina, estos se utilizan para transformar productos farmacéuticos como ibuprofeno, ketoprofeno, ácido clofibrico, atenolol, propranolol, diclofenaco y ácido mefenámico (Hata *et al.*, 2010; Cruz-Morato *et al.*, 2013; Haroune *et al.*, 2014). Mediante enzimas oxidativas y extracelulares, tales como, la Lacasa (EC 1.10.3.2), lignina peroxidasa (EC1.11.1.14) y manganeso peroxidasa (EC 1.11.1.13) los transforman. Un tópico relevante y novedoso para remover fármacos en ambientes contaminados (Rodarte-Morales *et al.*, 2011).

Por otro lado, los hongos filamentosos son uno de los organismos capaces de producir enzimas con utilidad, esto debido a la practicidad de la elaboración del cultivo y su producción de enzimas extracelulares con potencial aplicación industrial (Guimarães *et al.*, 2006).

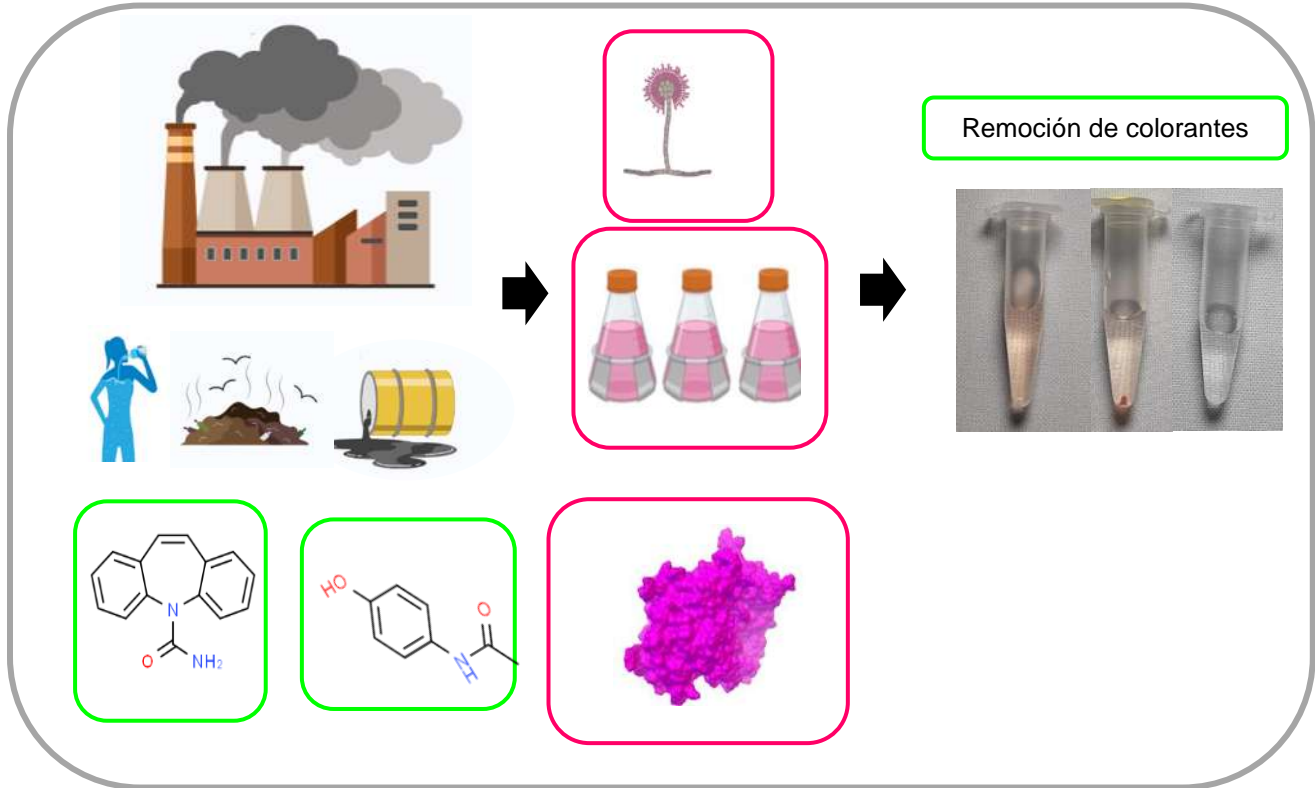


Figura 1. Fuente de contaminates y su biorremediación con Lacasas fúngicas. Los contaminantes emergentes como los antibióticos, los disruptores endocrinos, los contaminantes a base de colorantes y los medicamentos farmacéuticos a menudo se liberan en el medio ambiente, causan impactos dañinos y problemas de salud para los humanos y otros animales, el tratamiento del agua con Lacasas y sus enfoques biotecnológicos generan productos menos tóxicos, inertes o compuestos totalmente degradados. Modificado de Arregui *et al.*, 2019.

1.2. Las enzimas extracelulares, su medio de adaptación y uso en sectores industriales

Las enzimas extracelulares que son producidas por hongos son atractivas y de importancia para su aplicación en diferentes industrias tales como las relacionadas con los textiles, cuero, confitería, bebidas, alimentos, agricultura y la salud humana, esto por su estabilidad en condiciones extremas de temperatura y pH (Shubha J y Srinivas C, 2017). Guimarães *et al.*, 2006 estudiaron la producción de xilanasas,

glucosa-oxidasa, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, fitasa, pectinasa y amilasa, las cuales se extrajeron de *Aspergillus caespitosus*, *A. phoenicis*, *Rhizopus stolonifer*, *A. versicolor*, *Mucor rouxii*, *Paecilomyces variotii*, *A. phoenicis* y *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*. Martínez-Pacheco *et al.*, 2020 describieron la capacidad de *Fusarium solani* para producir xilanasas extracelulares.

El método de cultivo es una de las etapas críticas en la producción de enzimas extracelulares. Asimismo, varios parámetros lo son, tales como, el tiempo de cultivo, temperatura, nivel de inoculación, humedad, pH aireación, agitación (velocidad y duración de la mezcla) y tamaño de partícula. Sin embargo, uno de los factores con mayor importancia es la elección del sustrato ya que la elección de uno u otro sustrato induce la producción específica de una enzima (Steudler *et al.*, 2019).

Hoy en día, las enzimas se utilizan en más de 40 sectores industriales para fabricar más de 700 productos comerciales. En 2017, el mercado mundial de enzimas industriales fue de \$ 6 mil millones. La predicción es que el mercado crezca hasta un 6% en los próximos años (Arnau *et al.*, 2020). En paralelo con la creciente relevancia de las enzimas en la industria e investigación, así como en el costo-efecto y la presencia de nuevas o novedosas enzimas (Yazici *et al.*, 2020).

En todos los casos se demuestra la capacidad de los hongos para la producción de enzimas extracelulares. Asimismo, la variabilidad que existe entre cada especie o cepa fúngica. Lo cual sugiere un escrutinio a detalle de las condiciones óptimas de producción enzimática. En tal campo, las perspectivas son prometedoras ya que un número que asciende a 100 000 organismos es un universo de estudio amplio por explorar en los próximos años. En ello, el uso de enzimas óxido reductoras como Lacasas se propone para el tratamiento de los compuestos de desecho debido a que retienen o transforman estas moléculas en otras menos dañinas (Arregui *et al.*, 2019).

1.3. Lacasas

Las Lacasas (E.C. 1.10.3.2) son enzimas oxidativas que tienen un anillo trinuclear de cobre. Ellas destacan por sus propiedades para catalizar una amplia gama de sustratos fenólicos y no fenólicos (como materiales aromáticos, cancerígenos,

compuestos organofosforados y organometálicos) y la reducción de dioxígeno para producir agua sin cofactores ni subproductos tóxicos (Y. Wang *et al.*, 2021). La primera se descubrió en el árbol de la laca japonés *Rhus vernicifera*, hace más de cien años (Soden y Dobson, 2001).



Figura 2. Estructura tridimensional de la Lacasa de *Melanocarpus albomyces*. Las esferas de color naranja representan los átomos de cobre en el sitio activo de la Lacasa.

Durante la reacción, en el sitio T₁ se produce la oxidación del sustrato y el oxígeno molecular se reduce a dos moléculas de agua en el grupo trinuclear T₂ y T₃ (Novoa *et al.*, 2019), tal como se muestra en la figura 2 y 3.

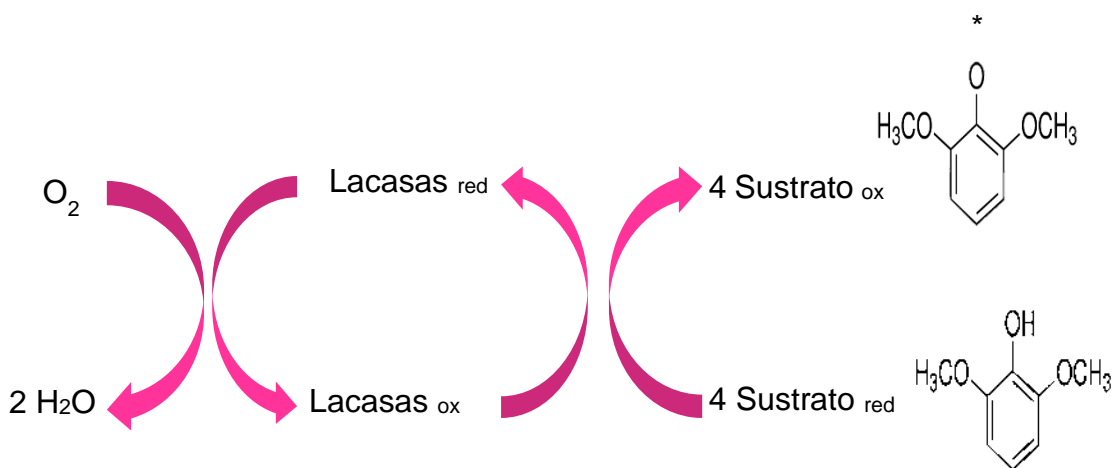


Figura 3. Representación general de la reacción de catálisis de Lacasas con 2,6- Dimetoxifenol (2,6-DMP) como sustrato.

Están relacionadas estructural y evolutivamente con el gran grupo de proteínas de cobre azul, que incluyen a las ascorbato oxidasas vegetales y a la proteína plasmática de mamíferos, la ceruloplasmina. Las Lacasas dependen de los cuatro iones de cobre, que se localizan entre tres sitios de unión diferentes, ampliamente conservados. Los cuales desempeñan una función importante en su actividad catalítica (Bhamare *et al.*, 2018).

Algunos reportes sugieren que la función de las Lacasas en los sistemas vivos es la protección contra factores ambientales adversos, incluido organismos competitivos o parásitos y compuestos tóxicos (Pawlik *et al.*, 2021). Fernández-Fueyo *et al.*, 2014 demostraron que las peroxidasas y las Lacasas fúngicas se regulan diferencialmente por el pH, la temperatura y por diferentes componentes del medio en *Pleurotus ostreatus*. Asimismo, Pawlik *et al.*, 2021, sugirieron que la síntesis de la Lacasa en *Cerrena unicolor* está regulada en las etapas transcripcional, traduccional y postranscripcional.

Por tanto, el establecimiento de las condiciones de producción de Lacasas específicas para cada especie fúngica es interesante para la mejora en la producción de la enzima detectada por su actividad específica.

1.4.El proceso de fermentación como método de producción de enzimas fúngicas

La fermentación es un método popular para la producción de proteínas, enzimas o de metabolitos con interés biotecnológico. En la realización y control de un proceso de fermentación es esencialmente importante la presencia de cultivos iniciadores. Diferentes microorganismos se emplean como cultivos iniciadores durante el proceso fermentativo. Además de bacterias y levaduras, los hongos filamentosos son organismos que se emplean como iniciadores de estos procesos (Sugiharto, 2019).

En los procesos fermentativos diversas condiciones influyen para la obtención de los productos de interés, tales como, las diferencias entre especies fúngicas, la naturaleza de los sustratos y las condiciones del cultivo.

1.5. Herramientas para la comprensión de procesos complejos como la fermentación microbiana de compuestos antropogénicos.

La fermentación microbiana es un proceso complejo en el que intervienen muchas variables a la vez. Donde se debe tener un control adecuado en la producción de algún producto deseado. Sin duda, la naturaleza biológica de este proceso implica que incidan sobre su desarrollo una gran cantidad de variables. Cuyos efectos combinados resultan de difícil interpretación. Las técnicas de análisis multivariante permiten obtener una mejor comprensión de procesos complejos. El **análisis multivariado** reúne métodos estadísticos que se enfocan en la observación y procesamiento simultáneo de diferentes variables estadísticas para obtener información relevante. Las dos categorías principales de métodos de análisis estadísticos multivariantes son los denominados métodos descriptivos y los métodos explicativos. Asimismo, **el procesamiento y la representación gráfica fueron diseñados para proporcionar la descripción general precisa de todos los datos analizados** y al mismo tiempo, minimizar la pérdida de información.

De tal manera que, la aplicación del análisis multivariado es variable con relación a lo que queremos conseguir con él en sus diferentes escenarios en los que se aplican. Por ejemplo, de gran ayuda son para **optimizar los datos o simplificar la estructura** sin sacrificar información valiosa y sirve para facilitar la explicación de datos. También, para **ordenar y agrupar**: cuando tengamos múltiples variables, se creará un conjunto de objetos o variables "similares" en función de las características medidas para ordenar y agrupar los datos. El análisis multivariado servirá para saber si todas las variables son independientes o dependientes entre sí. En el establecimiento de relaciones **predictivas entre variables** es de gran ayuda: Deben determinarse para predecir el valor de una o más variables a partir de observaciones de otras variables. O bien, auxilian en la **construcción y prueba de hipótesis**: hipótesis estadísticas específicas se prueban y expresan en parámetros

poblacionales multivariados: esto se hace en la aprobación de hipótesis o reafirmación de hipótesis previas.

Por último, el objetivo de su uso en mi investigación es para conocer **la influencia o la relación de dependencia entre variables nutrimentales y ambientales**. Para la identificación de los factores que contribuyan a incrementar los rendimientos de las Lacasas de *Fusarium oxysporum*.

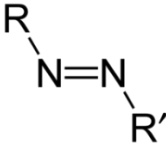
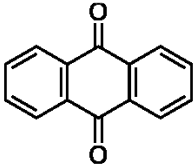
1.6. El desafío que representa la eliminación de contaminantes del agua

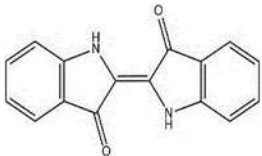
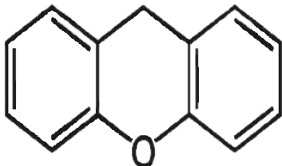
El desarrollo socioeconómico mundial genera una corriente de sustancias (algunas de ellas nuevas), que se producen casi inmediatamente en el medio ambiente. La estimación en la industria química es que se generan más de 70, 000 productos químicos diferentes, con un valor de ventas mundial estimado de \$ 5000 mil millones (Asthana 2014).

Los contaminantes tales como productos farmacéuticos, de cuidado personal, productos químicos industriales y pesticidas son omnipresentes. Por tal motivo es un desafío eliminarlos con eficiencia en las plantas de tratamiento de aguas residuales (EDAR) debido a su estabilidad y resistencia a la degradación fisicoquímica (Zdarta *et al.*, 2022).

Los colorantes son sustancias naturales o artificiales que aportan color a las diferentes fibras que se utilizan en las industrias textil, farmacéutica, alimentaria, cosmética, plástica, fotográfica y del papel. Los colorantes que más se utilizan a escala industrial son el azo, la antraquinona, el índigo, el xanteno y el triarilmetano. La mayoría de los tintes sintéticos se utilizan en las industrias textil y de curtidos para teñir una amplia variedad de productos. Asimismo, otras industrias, como la cosmética, papelera, alimenticia, farmacéutica y proveedores de servicios, utilizan colorantes sintéticos (Ardila-Leal *et al.*, 2021).

Tabla 2. Clasificación y estructura de los colorantes de acuerdo a su grupo cromóforo (Ardila-Leal *et al.*, 2021).

Tipos de colorantes químicos	Estructura del grupo cromóforo	Ejemplos de colorantes	Características
Azo		<p>Naranja de metilo</p> <p>Rojo Congo</p> <p>Naranja G</p>	<p>Estos colorantes tienen un grupo funcional (-N=N-) que une dos radicales alquilo o arilo, simétricos y/o asimétricos, idénticos o no azoicos.</p>
Antraquinona		<p>Azul brillante de remazol</p> <p>R</p> <p>Azul brillante</p> <p>Rojo Alizarina S</p>	<p>Los colorantes de antraquinona son de los más utilizados por su bajo precio, accesibilidad y rendimiento en el proceso de teñido. Tienen dos grupos carbonilo unido a cada lado de</p>

		un anillo de benceno.
Índigo	Carmín de índigo	El índigo sintético es el que más se utiliza en la industria textil a nivel mundial. Es resistente a la luz y a altas temperaturas.
	 Azul Ciba 2B	
Xanteno	Rodamina 6G Rodamina 123	Los xantenos se utilizan en alimentos, cosméticos, papel y tinta. Las industrias manufactureras los utilizan debido a sus propiedades superiores de teñido y coloración, pero son poco biodegradables y algunos de
	 Fluoresceína	

ellos son
tóxicos.

Un número significativo de estos compuestos está fuera de control debido a que las regulaciones son escasas. Desde el año 2000, la Unión Europea estableció una estrategia para definir las sustancias tóxicas y sus intermediarios en las aguas residuales. En 2015, la Comisión Europea publicó una lista de compuestos prioritarios de alto riesgo, que incluyen hormonas, productos farmacéuticos, productos de cuidado personal y aditivos alimentarios, que deben observarse y neutralizarse en un futuro próximo (Barbosa *et al.*, 2016; Rogowska *et al.*, 2020; Zdarta *et al.*, 2022).

Tabla 3. Las concentraciones de compuestos que se identificaron con frecuencia en los efluentes de las EDAR (Rogowska *et al.*, 2020).

Tipo de fármacos	Principio activo	Concentración (µg/L)	Referencias
Antidepresivos	Citalopram	840	Cunha <i>et al.</i> , 2019
Antiepilépticos	Gabapentina	79.86	Oliveira <i>et al.</i> , 2015
	Carbamazepina	3.58	Evgenidou <i>et al.</i> , 2015
Analgésicos/antiinflamatorios	Ibuprofeno	9.20	Gros <i>et al.</i> , 2017
	Diclofenaco	23.50	Madikizela y Chimuka., 2017
	Naproxeno	14.40	Petrie <i>et al.</i> , 2015
	Paracetamol	11.73	Deb <i>et al.</i> , 2017
Antibióticos	Cefalexina	5.07	Oliveira <i>et al.</i> , 2015
	Trimetoprima	2.40	
	Sulfametoxazol	3.25	

1.7. La producción de medicamentos en México

En 2015, la producción global del sector farmacéutico ascendió a 1,228 mmd y se espera que para el periodo 2015-2020 crezca un 8.3%. Los principales países productores por orden de importancia son: China, Estados Unidos, Suiza, Japón y

Reino Unido. En dicho estudio aseguran que el consumo de medicamentos crece cada vez más, en los países en desarrollo (PROFECO, 2017).

El sector farmacéutico mexicano ocupa el lugar 11 entre los 15 mercados más importantes del mundo y el segundo en América Latina, de acuerdo con la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS).

En nuestro país este sector es una de las actividades económicas más significativas por su aportación a la producción bruta de las industrias manufactureras. Además, en 2014 generó más de 83 mil empleos, según información de la Cámara Nacional de la Industria Farmacéutica (CANIFARMA, 2014).

1.8. Las afecciones que causan los compuestos fenólicos en el medio ambiente

La creciente cantidad de compuestos fenólicos en los ambientes acuáticos han atraído la atención de instituciones científicas y de protección ambiental debido a su potencial toxicidad en relación con sus propiedades carcinogénicas, teratogénicas y mutagénicas que generan efectos adversos en la salud humana (M. Zhou *et al.*, 2017). Los compuestos fenólicos que se encuentran inmersos en el agua entran en el organismo humano a través del agua potable y los que sedimentan ingresan a través de las cadenas alimentarias. Asimismo, en los organismos acuáticos a través de la cadena alimentaria. Debido a sus características persistentes y no biodegradables, estos se acumulan en el agua y los sedimentos. En donde, los organismos acuáticos cazan, se alimentan, lo cual representa una amenaza para los ecosistemas acuáticos. Este tipo de compuestos envenenan organismos acuáticos, contaminan productos agrícolas y afectan las funciones del sistema nervioso, urinario y digestivo humano (S. Wu *et al.*, 2020).

De las ramas tecnológicas en las que está involucrado el uso de compuestos fenólicos son: en la ingeniería petroquímica, la impresión, el teñido, el procesamiento de alimentos y la producción química. Cuando estos se desechan en el ambiente se convierten en extremadamente tóxicos con escasa biodegradabilidad.

Con el desarrollo industrial global y el crecimiento de la población se generó un incremento en la contaminación del ambiente. En ello, los tintes industriales son de

los agentes contaminantes más peligroso. Estos se utilizan en diversas industrias como la pulpa, papel, fotográfica, farmacéutica, pintura y cosmética.

1.9. Herramientas computacionales, repositorios y otros aspectos bioinformáticos en el estudio de las Lacasas fúngicas.

Sin duda alguna, la civilización ha generado una enorme cantidad de información y las ciencias químico-biológicas no son la excepción. Cada vez la comprensión de la complejidad biológica es mayor y ampliamente aceptada. En donde los estudios a nivel de tubo de ensaye son técnicamente insuficientes. Entonces, para analizar la enorme información de los sistemas biológicos se introducen herramientas computacionales que permitan plantear modelos y predecir comportamientos y funciones biológicas de interés. Por lo que disciplinas como la bioinformática; un área multidisciplinar relativamente nueva. Es una interface entre la biología y la informática que permite la aplicación de herramientas tecnológicas para responder a problemas biológicos y plantear soluciones. Un campo del trabajo científico con enorme potencial en un mundo en el que surge la necesidad de almacenar y procesar grandes cantidades de datos cada vez más complejos. En diferentes áreas como la genética, la biología celular y molecular, la genética evolutiva y la bioquímica de hongos que son disciplinas y ciencias en las que ayuda a satisfacer la necesidad de procesar grandes cantidades de datos. El contexto de este marco teórico en la obtención de Lacasas fúngicas de *Fusarium oxysporum*, con el objetivo de obtener resultados, predicciones precisas y robustas en las diferentes áreas de aplicación y cada vez cercanas a la realidad.

1.10. *Fusarium*

Fusarium es uno de los grupos importantes de hongos fitopatógenos que se conocen para la agricultura y la horticultura, que causan una variedad de enfermedades en innumerables cultivos (Summerell, 2019). Las cepas patógenas de plantas causan

marchitez vascular devastadora y enfermedades de pudrición por almacenamiento en una amplia gama de huéspedes y se encuentran entre los patógenos de plantas del suelo económicamente importantes en el mundo. Este complejo de especies está emergiendo como agentes clínicamente importantes de micosis humanas y animales. La taxonomía de *F. oxysporum* se ha definido históricamente por la morfología de las estructuras reproductivas asexuales. La escasez y variabilidad de estos caracteres llevó a una definición amplia de *F. oxysporum* que no describe la variabilidad inherente dentro de este complejo de especies.

Actualmente, hay más de 100 nombres válidos de especies de *Fusarium*. Los conflictos frecuentes y la inestabilidad en la sistemática de *Fusarium* han resultado en la ausencia de caracteres morfológicos claros para separar especies, asimismo, la existencia de la variación fenotípica entre los cultivos.

El complejo de especies de *Fusarium oxysporum* (FOOSC) comprende un grupo de hongos ascomicetos que se estudian intensamente debido a su capacidad para causar enfermedades tanto en plantas como en humanos (Laurence *et al.*, 2014).

Por otro lado, barreras de interesterilidad se detectaron en grupos pertenecientes a dicho género. Con ello, la identificación de especies sexuales de *Fusarium*. En este caso, especies para las que la reproducción sexual es difícil de inducir *in vitro*, el criterio de especie filogenética es informativo. El gen que más se utiliza para el reconocimiento de especies y el análisis filogenético en *Fusarium* es el gen del factor de elongación 1 α (*EF-1 α*). Otros *loci* útiles incluyen la región del espaciador transcrito interno (*ITS*) de la repetición del gen del ARNr y el gen de la β -tubulina (Cai *et al.*, 2011).

1.11. Análisis computacional del complejo enzima-sustrato

Actualmente, herramientas informáticas como el análisis *in silico* se utilizan para la extracción de información oculta y predecible de grandes bases de datos para encontrar información que un experto no determina rápidamente por métodos experimentales.

1.12. Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular es un método para predecir la posición y la afinidad de un ligando o sustrato en un sitio de unión del receptor (macromolécula). El proceso de acoplamiento implica principalmente la coincidencia espacial y la coincidencia de energía entre el ligando y el receptor para una conformación óptima. Además, durante el proceso de unión del ligando al receptor, la estructura del sitio de unión cambia constantemente hasta que se establece con éxito un enlace estable. Solo entonces se puede determinar la distribución de carga y la configuración del sistema de unión (Tao *et al.*, 2020).

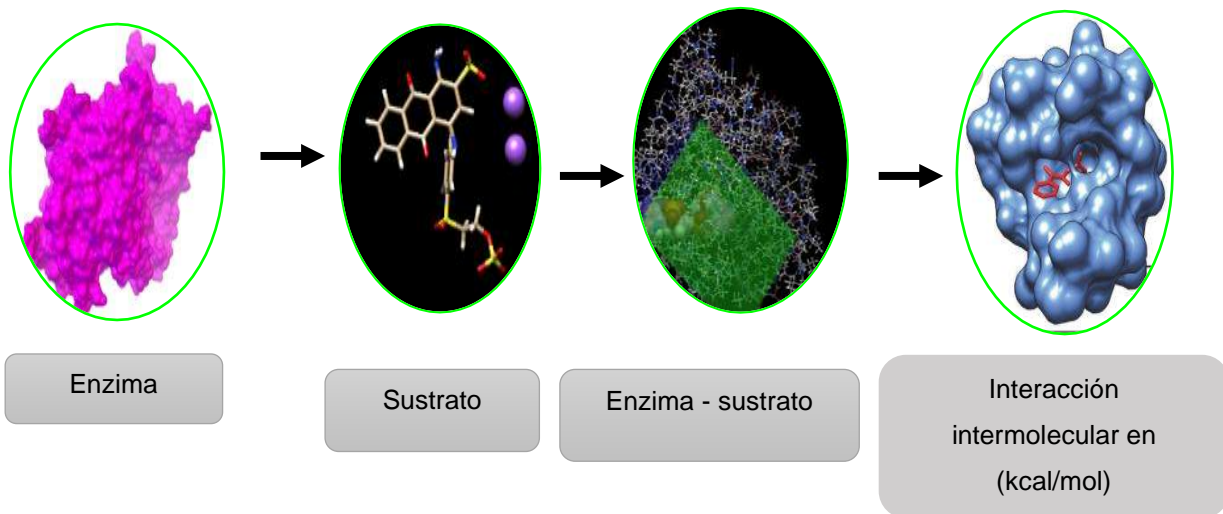


Figura 4. Acoplamiento molecular de una enzima y su sustrato.

1.13. Dinámica molecular

Las simulaciones de dinámica molecular proporcionan detalles sobre los movimientos de partículas individuales en función del tiempo. Con estas se abordan preguntas específicas de las propiedades de un sistema modelo que no son fáciles de evaluar en un sistema real (Singh *et al.*, 2010). Por ejemplo, ¿diferentes sustratos pueden interaccionar con la Lacasa?, ¿cómo pueden interaccionar?, ¿La interacción es estable?, ¿Son los aminoácidos del sitio activo los responsables de la interacción? Otro aspecto esencial es que las simulaciones son aproximaciones que deben corroborarse con datos experimentales, para tener una mejor precisión de los resultados y criterios metodológicos.

2. ANTECEDENTES

El aumento de la población, la urbanización y la industrialización ahora son un grave problema antropogénico que genera contaminación ambiental e.g. daño a los ecosistemas. Debido a que en sus procesos liberan en el ambiente diversas moléculas, entre ellas las recalcitrantes. En ello, la investigación biotecnológica se convierte en un área de oportunidad ya que mediante ésta se desarrollan herramientas innovadoras y procesos no contaminantes para corregir el efecto de la contaminación. Sin embargo, esto es un desafío debido a la cantidad y diversidad de moléculas contaminantes. Todas son importantes de por sí, sin embargo, los derivados fenólicos llaman poderosamente la atención debido a su recalcitrancia y corrosividad. Para una mejor comprensión de la emisión directa de fenoles reconocibles y sobre todo de su posible remediación. Entonces, en un trabajo previo 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 con relación 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 (Alonso-Hurtado, 2020).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad, en el medio ambiente se acumula una gran cantidad de fenólicos. Su presencia provoca toxicidad de los seres vivos. Particularmente, los fenólicos disueltos en cuerpos de agua que el hombre utiliza para su comodidad. Este desecho es un problema severo y que apremia su solución. Más allá de la voluntad política, en la solución del problema se involucra la dependencia tecnológica, el proceso de remediación y sus costos. Una alternativa es el uso de las enzimas con propiedades óxido reductoras para el procesamiento de fenólicos, así como, los microorganismos productores y su proceso de obtención de estas enzimas.

4. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad se genera y acumula una gran cantidad de fenólicos, este desecho es un problema severo y que apremia su solución. En donde las enzimas fúngicas con propiedades óxido reductoras tienen el potencial para el procesamiento de fenólicos. Por ello, las óxido reductasas (Lacasas, lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa) son interesantes ya que llevan a cabo la degradación de compuestos de desecho de naturaleza química fenólica y no fenólica. En específico, las Lacasas se consideran capaces de oxidar una gran cantidad de compuestos debido a su baja especificidad de sustrato. El aislado silvestre *Fusarium oxysporum* es un candidato con potencial para la producción del complejo óxido reductor que contiene Lacasas, lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa. Por ello, las propiedades adecuadas de fermentación, la actividad específica y las características bioquímicas del complejo se necesitan estudiar.

5. HIPÓTESIS

El establecimiento de las condiciones de fermentación de *F. oxysporum* genera Lacasas con potencial para la degradación de contaminantes fenólicos.

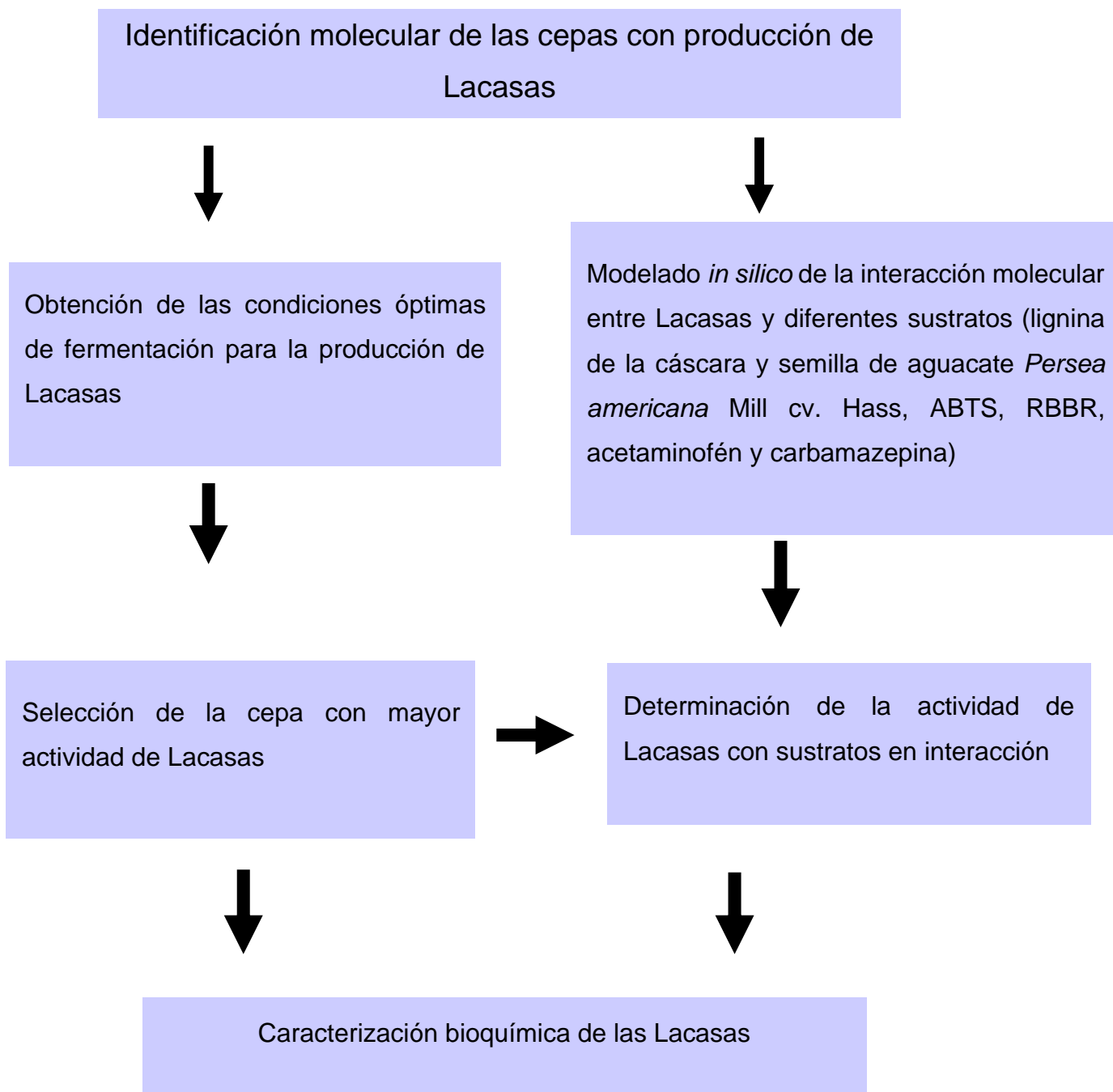
6. OBJETIVO GENERAL

Establecer las condiciones de fermentación de *F. oxysporum* para la producción de Lacasas con potencial en la degradación de contaminantes fenólicos.

7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar molecularmente la cepa fúngica productora de la actividad lacásica
2. Ensayar diferentes condiciones de fermentación de *F. oxysporum* tales como fuente de carbono, temperatura, pH, y tiempo para la producción de Lacasas.
3. Caracterización bioquímica de las Lacasas de *F. oxysporum*.
4. Determinar la capacidad de las Lacasas del proteoma extracelular de *F. oxysporum* en la degradación de lignina, ABTS, RBBR, acetaminofén y carbamazepina.

8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1. Microorganismos y condiciones de crecimiento

Las cepas fúngicas E6FO y E6F13 se aislaron y caracterizaron de plantas de frijol con signos de decaimiento del vigor, los cuales se colectaron del estado de Zacatecas, México. Los aislados se mantuvieron en agar papa dextrosa (APD) y se incubaron a 25 °C durante siete días para los procedimientos posteriores.

9.2. Identificación molecular de las cepas E6FO y E13FO mediante el Factor de Elongación 1 α (*TEF-1 α*).

Los aislados fúngicos se inocularon en agar papa dextrosa (APD) y se incubaron durante siete días a 25 °C. La extracción de ADN se realizó de acuerdo a una modificación del protocolo que reportó Orozco-Mosqueda *et al.* (2015). Para el ensayo, 100 mg de micelio de cada cepa se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 ml y se adicionaron perlas de vidrio. Después, en el tubo se agregaron 200 μ l de búfer de lisis y 200 μ l de la solución fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Al término, la disolución se agitó al máximo de velocidad en un vortex (VM-300) durante 6 min. Posteriormente, 300 μ l de la solución fenol:cloroformo:alcohol isoamílico(25:24:1) y 300 μ l de búfer de lisis se adicionaron y por último, se agitaron en un vortex (VM-300) por 30 segundos. Las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm durante 30 s. Finalmente, la extracción de la primera fase se realizó y se agregaron 300 μ l de la solución cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se agitaron en el vortex y se centrifugaron a 14 000 rpm durante 30 s. Finalmente, las fases acuosas de ambas muestras se tomaron y se colocaron en 2.5 volúmenes de isopropanol frío a - 20 °C, las mezclas se incubaron 30 min a -20 °C, se centrifugaron a 14 000 rpm por 5 min. El sobrenadante se retiró y el sedimento se lavó con 500 μ l de etanol al 70 %, la solución se agitó en un vortex hasta despegar el sedimento de DNA que se formó y posteriormente se centrifugó a 14 000 rpm durante 3 min. El sedimento se secó y se suspendió en 20 μ l de agua desionizada estéril. Al final, al residuo de DNA se le agregó 1 μ l RNAasa para eliminar el contenido de RNA y se agitó en vortex 15

min a temperatura ambiente. El DNA que se extrajo de cada cepa se cuantificó mediante las lecturas de absorbencia en un NanoDrop (Thermo Scientific), y la pureza de cada muestra se determinó con las relaciones 260/280 y 260/230 de absorbencias. Posteriormente, la amplificación de *TEF-1 α* se realizó con los iniciadores EF688 Y EF1251. Los productos de PCR se secuenciaron en la compañía Psomagen, USA. Las secuencias consenso se obtuvieron con el programa Chromas.Pro, Asimismo, las secuencias con mayor similitud se obtuvieron del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) y se alinearon mediante Clustal W con el programa MEGA-X. El árbol filogenético se construyó con el algoritmo del vecino más cercano.

9.3. Cuso temporal de crecimiento en medio mínimo

El cultivo fúngico se realizó en medio mínimo líquido (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. Los medios se filtraron y se recuperaron alícuotas del filtrado, las cuales se utilizaron para la determinación del contenido de proteína y la actividad específica durante 12 días a 25 °C a 120 rpm.

9.4. Establecimiento de las condiciones de fermentación óptimas para la producción de Lacasas fúngicas extracelulares

Para el escrutinio de los factores de interés en la fermentación de *Fusarium oxysporum* se utilizó un modelo factorial fraccionado $2k^p$ (modelo Plackett-Burman). El cual se generó en el programa Statistics 7.0 con la herramienta “*design of experiments projects in industry*”. El diseño se evaluó con dos niveles (-1 y +1) con la finalidad de filtrar "n" variables en experimentos "n+1". Las variables independientes seleccionadas para la presente investigación y sus valores decodificados (-1 y +1) se resumen en la Tabla 2 y 3. En el modelo se utilizaron tres diferentes fuentes de carbono (dextrosa, fructosa y sacarosa), temperatura (25 °C y

35 °C), pH (5 y 7) y tiempo de incubación (5 días y 7 días) para optimizar la producción de Lacasas en una fermentación líquida.

La ecuación lineal del modelo PB es la siguiente:

$$y = b_0X_0 + b_1X_1 + b_3X_3 + b_4X_4 + b_5X_5 \dots \dots \dots b_nX_n$$

Tabla 4. Factores y niveles de estudio del modelo Placket-Burman.

Factores	Niveles de estudio	
	-1	1
Dextrosa	10	20
Fructosa	10	20
Sacarosa	10	20
pH	5	7
Temperatura	25	35
Tiempo	5	7

Tabla 5. Matriz de datos del modelo Placket-Burman con los factores y niveles de estudio.

Corridas	Dextrosa (g/l)	Fructosa (g/l)	Sacarosa (g/l)	pH	Temperatura (°C)	Tiempo (d)
X1	20	20	20	7	35	7
X2	10	20	10	5	35	5
X3	10	10	20	7	25	5
X4	20	10	10	5	25	7
X5	10	10	10	7	35	7
X6	10	20	20	5	25	7
X7	20	10	20	5	25	5

X8 20 20 10 7 35 5

El cultivo se realizó 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. Los medios se filtraron y se recuperaron alícuotas del filtrado, las cuales se utilizaron para la determinación del contenido de proteína y la actividad específica de las enzimas.

9.5. Bosques aleatorios

El bosque aleatorio se realizó con 500 árboles completamente desarrollados. La puntuación de precisión del modelo de bosque aleatorio se ajustó a 70 % para el conjunto de datos de entrenamiento y 30 % para el conjunto de datos de prueba.

Tabla 6. Matriz de datos del modelo de bosques aleatorios de *F. oxysporum* species complex 33 NRRL38515.

Categoría	Dextrosa (g/l)	Fructosa (g/l)	Sacarosa (g/l)	pH	Temperatura (°C)	Tiempo (d)
a	20	20	10	7	25	5
a	20	20	10	7	25	5
a	10	20	20	5	25	7
a	20	20	10	7	25	5
a	20	20	10	7	25	5
a	20	20	10	7	25	5
a	20	10	10	5	25	7
a	10	20	20	5	25	7
a	10	20	20	5	25	7
a	20	20	10	7	25	5
a	20	10	10	5	25	7
a	20	10	10	5	25	7
a	20	10	20	5	35	5
a	20	10	20	5	35	5
a	10	20	20	5	25	7

a	20	10	20	5	30	5
a	10	20	20	5	25	7
a	20	10	20	5	30	5
a	10	10	20	7	25	5
a	20	20	20	7	30	7
a	10	10	20	7	25	5
a	20	20	20	7	30	7
a	20	10	20	5	30	5
a	10	10	10	7	30	7
b	10	10	10	7	30	7
b	10	10	10	7	30	7
b	20	20	20	7	30	7
b	20	10	10	5	25	7
b	10	20	10	5	30	5
b	10	20	10	5	30	5
b	10	10	20	7	25	5
b	10	20	10	5	30	5
b	10	10	20	7	25	5
b	20	10	10	5	25	7
b	20	20	20	7	30	7
b	10	20	10	5	30	5
b	10	10	20	7	25	5
b	20	10	10	5	25	7
b	20	20	20	7	30	7
b	10	10	20	7	25	5
b	20	20	20	7	30	7
b	10	20	10	5	30	5
b	10	20	20	5	25	7
b	20	10	20	5	30	5
b	10	20	10	5	30	5
b	10	10	10	7	30	7
b	10	10	10	7	30	7
b	10	10	10	7	30	7

Tabla 7. Matriz de datos del modelo de bosques aleatorios de *F. oxysporum* species complex 22 NRRL38608.

Categoría	Dextrosa (g/l)	Fructosa (g/l)	Sacarosa (g/l)	p H	Temperatura (°C)	Tiempo (d)
a	20	10	20	5	30	5
a	20	10	20	5	30	5
a	20	10	20	5	30	5

a	10	20	20	5	25	7
a	10	20	20	5	25	7
a	10	10	10	7	30	7
a	10	10	10	7	30	7
a	10	20	20	5	25	7
a	10	10	10	7	30	7
a	10	10	10	7	30	7
a	10	10	10	7	30	7
a	20	10	20	5	30	5
a	10	10	10	7	30	7
a	20	10	20	5	30	5
a	20	10	20	5	30	5
a	20	20	20	7	30	7
a	20	20	20	7	30	7
a	20	20	20	7	30	7
a	20	20	10	7	25	5
a	20	20	10	7	25	5
a	20	20	10	7	25	5
a	20	20	20	7	30	7
a	20	20	20	7	30	7
a	20	20	20	7	30	7
b	10	10	20	7	25	5
b	20	20	10	7	25	5
b	10	10	20	7	25	5
b	20	20	10	7	25	5
b	10	10	20	7	25	5
b	20	20	10	7	25	5
b	10	20	20	5	25	7
b	10	20	20	5	25	7
b	10	20	20	5	25	7
b	10	10	20	7	25	5
b	20	10	10	5	25	7
b	10	10	20	7	25	5
b	20	10	10	5	25	7
b	10	10	20	7	25	5
b	20	10	10	5	25	7
b	20	10	10	5	25	7
b	20	10	10	5	25	7
b	10	20	10	5	30	5
b	10	20	10	5	30	5
b	10	20	10	5	30	5

b	10	20	10	5	30	5
b	10	20	10	5	30	5
b	10	20	10	5	30	5

9.6. Selección de la fuente de carbono para la obtención de *Lacasas de Fusarium oxysporum*.

El medio mínimo se preparó con las cantidades que se especifican en la tabla 6. Para el experimento se utilizaron matraces Erlenmeyer de 125 ml. El volumen de medio que se seleccionó para cada matraz fue de 25 ml, con tres repeticiones para cada ensayo. Las fuentes de carbono se definieron como las variables dependientes del experimento, con ello, cada una se utilizó de forma independiente. La esterilización del medio se llevó a cabo por filtración. La inoculación de los medios se realizó con propágulos de 25 mm². Posteriormente, los medios se taparon con torundas de algodón y se dejaron en incubación a 120 rpm a 25 °C durante 5 días.

Tabla 8. Componentes del medio mínimo líquido, (Bartnicki- García y Nickerson, 1962).

Componentes del medio mínimo	g/l
Dextrosa/Fructosa/Sacarosa	20,0
Fosfato potásico monobásico (KH ₂ PO ₄)	3,0
Sulfato magnesio (MgSO ₄ * 7H ₂ O)	0,5
Nitrato de amonio (NH ₄ NO ₃)	0,5
Sulfato de zinc (ZnSO ₄ * 7H ₂ O)	1,8 x 10 ⁻³
Sulfato ferroso (FeSO ₄ * 7H ₂ O)	1 x 10 ⁻³
Tiamina	1 x 10 ⁻³
Ácido nicotínico	1 x 10 ⁻³
Sulfato cúprico (CuSO ₄ * 5H ₂ O)	4 x 10 ⁻⁴
Sulfato de manganeso (MnSO ₄ * H ₂ O)	3 x 10 ⁻⁴

9.7. Obtención del extracto

Las muestras de cada matraz se filtraron con papel filtro de poro medio. El filtrado se colocó en tubos Falcón de 50 ml y se utilizó para la cuantificación de proteína y actividad enzimática. Un análisis de una vía se realizó para determinar la fuente de carbono óptima.

9.8. Determinación de la actividad de Lacasas

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. La reacción se realizó en un espectrofotómetro a 420 nm durante un minuto. 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, con un coeficiente de extinción molar $\epsilon = 36,000 \text{ M}^{-1}$ (Papinutti *et al.*, 2003).

9.9. Ensayos in silico

9.9.1. Búsqueda del sitio activo y su conservación en distintas Lacasas

Primeramente, las estructuras cristalizadas de diferentes Lacasas se buscaron en el repositorio Protein Data Bank (PDB). El objetivo del ensayo fue la búsqueda del sitio activo y los aminoácidos ampliamente conservados en cada una de ellas. El alineamiento de las secuencias proteicas y el árbol filogenético se hizo con la herramienta CLUSTALO del repositorio Uniprot (www.uniprot.org). Con ello, la conservación del sitio activo y la cercanía al filo de las Lacasas de *Melanocarpus albomyces* se observó. Debido a que las Lacasas de los organismos que se eligieron para este estudio conservan los aminoácidos del sitio activo, el paso posterior se realizó solo con dos estructuras 1GYC (*Trametes versicolor*) y 3FU8 (*Melanocarpus albomyces*). Un alineamiento de ambas estructuras se llevó a cabo con la herramienta PDBeFold en el repositorio EMBL-EBI (www.ebi.ac.uk). Con esto, las partes de las estructuras que son similares se visualizaron. Por último, una simulación de los cristales de las Lacasas de *F. oxysporum* se realizó con la herramienta

swissmodel (swissmodel.expasy.org). Los modelos de las proteínas que se obtuvieron son similares a las Lacasas descritas en *M. albomyces*.

9.9.2. Búsqueda de sitios de glicosilación en las Lacasas de *F. oxysporum*

Los sitios potenciales de *N*-glicosilación de dos Lacasas de *F. oxysporum* fueron previstos con NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). Las secuencias proteicas de *Lcc2* y *Lcc5* de *F.oxysporum* se utilizaron para predecir los sitios de glicosilación.

9.9.3. Acoplamiento molecular

Las estructuras de los diferentes sustratos se obtuvieron del repositorio ChemSpider (www.chemspider.com) en formato PDB. Estas se ajustaron a su estado de mínima energía en el programa Maestro Elements (v.3.4) mediante el método semi-empírico AM1. La Lacasa de *Melanocarpus albomyces* se utilizó como modelo de la estructura proteica. La estructura se obtuvo del repositorio Protein Data Bank (código del PDB 3FU8). En el programa Auto Dock Tools (v. 1.5.6) se preparó la proteína. En el primer paso de la preparación, las moléculas del solvente se eliminaron y los átomos de hidrógeno faltantes se agregaron para después guardar el archivo con extensión .txt. En el archivo con extensión .txt se incluyeron los datos de las coordenadas específicas del sitio activo para la realización de la búsqueda de interacción en el programa. El acoplamiento molecular se realizó en el programa Auto Dock Vina (v. 1.1.2) y los resultados se visualizaron en el programa Discovery Studio 2019 Client. En este proceso se utilizó al sustrato co-cristalizado con la enzima, el 2,6-dimetoxifenol, como ensayo control.

9.9.4. Dinámica molecular

La proteína se preparó en la interfaz “maestro molecular modeling”. Las simulaciones de dinámica molecular se realizaron con el programa Desmond. En las simulaciones se utilizaron las conformaciones de menor energía de interacción como conformación inicial, las cuales se obtuvieron de los ensayos de acoplamiento molecular. El campo de fuerza que se utilizó es el OPLS2005, para las conformaciones iniciales se

consideraron células *orto* rómbicas, las cuales incluyen moléculas de agua dentro de una distancia de 10 Å y la concentración de sal fue de 0.15 M. Las simulaciones de producción se realizaron con ensambles NPT durante 2 nanosegundos (ns) con una trayectoria de 10 picosegundos (ps) a 300 K y 1,01325 psi. El termostato empleado durante la simulación fue Nose-Hoover con un tiempo de relajación de 1 ps. Además, el barostato isotrópico Martyna-Tobias-Klein se eligió en consideración al método de corte y rango corto de radios de 10 Å. La asignación de cargas y la optimización del pH se realizaron. Por último, las interacciones se visualizaron en la misma interfaz de maestro molecular modeling.

9.10. Efecto de los fenoles con *Fusarium oxysporum* SC 33 y *Fusarium oxysporum* SC 22 en medio sólido

El medio control del acondicionamiento se preparó 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 ($ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$) 1.8×10^{-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} . En el caso de los tratamientos la fuente de carbono se disminuyó a 10 y 2 g/l para enriquecerlo con 0.01% y 0.1 % de acetaminofén, carbamazepina y RBBR, respectivamente.

9.11. Inducción de Lacasas con fenoles

El medio de fermentación líquida se inoculó con propágulos de 25 mm² condicionados al crecimiento con acetaminofén al 0.1 %, para observar la inducción de la producción de Lacasas. El cultivo se incubó durante 5 días a 25 ° a 120 rpm. Después, la actividad específica de la Lacasa se determinó en una mezcla de reacción que se formó con 200 µl de extracto enzimático 0.01 mg/ml, 600 µl de búfer de citrato 0.1 M y 200 µl de ABTS 5 mM. La reacción se realizó en un espectrofotómetro a 420 nm durante dos min. La actividad enzimática se expresó en U/mg. En donde, una unidad enzimática (U) se define como la transformación de 1 µmol de sustrato por minuto.

9.12. Caracterización de las Lacasas de *Fusarium oxysporum* SC 33

9.12.1. Concentración de las Lacasas de *F. oxysporum* SC 33

Precipitación con acetona. Las proteínas presentes en el extracto crudo de la fermentación de *F. oxysporum* SC 33 se precipitaron con acetona en una proporción 1:1 (v/v) durante 12 h. Después, la mezcla se centrifugó a 10,000 rpm a 4°C durante 30 min y el precipitado se resuspendió en búfer de citrato 0.1 M, pH 5.

Concentración con ultrafiltración. El extracto crudo de la fermentación de *F. oxysporum* SC 33 se colocó en membranas de ultrafiltración de 100 kDa y se centrifugó a 4,500 rpm a 4 °C durante 30 min. Para el enriquecimiento posterior se utilizó el volumen retenido. Por otro lado, la fase no retenida se utilizó para fraccionamientos con membranas de ultrafiltración de 50 kDa y 10 kDa para la evaluación de actividad enzimática de Lacasas.

9.12.2. Cromatografía de exclusión molecular de las Lacasas de *F. oxysporum* SC 33 con sephadex G-100

El empaquetamiento de la columna se realizó con un volumen de 45 mililitros de fase estacionaria (sephadex G-100) con una dimensión de 15 cm de longitud x 2 cm de diámetro, el gel se equilibró con 45 ml de búfer de citrato 0.1 M a pH 5. El extracto ultrafiltrado con la membrana de 100 kDa se colocó en la columna y se eluyó con 45 ml del mismo búfer. Las fracciones que se colectaron fueron de 3 ml y estas se utilizaron para la determinación de proteína y actividad específica de Lacasas.

9.12.3. Desglicosilación de las Lacasas purificadas de *F. oxysporum* SC 33

Para la desglicosilación del extracto purificado de las Lacasas se utilizó a la enzima Endoglicosidasa H (Endo-H). La reacción de desglicosilación se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Promega, USA). En la reacción se colocaron 1-2 µg del extracto y la reacción se aforo a un volumen de 9 µl con agua. Posteriormente, 1 µl de solución desnaturizante se adicionó y se calentó por 5 min a 95 °C. Después, la muestra se dejó durante 5 min a temperatura ambiente y se adicionaron 2 µl de

búfer de reacción 10X y 1 μ l de Endo H, el volumen se aforó hasta 20 μ l. Posteriormente la reacción se dejó durante 2 h a 37 °C. El producto de la reacción se analizó por SDS-PAGE al 12 %.

9.12.4. Electroforesis (SDS-PAGE)

El extracto crudo y las fracciones se colocaron en un gel de electroforesis SDS-PAGE (5% gel concentrador y 12% gel separador) con un intervalo de concentración de proteína de 20-50 μ g. La electroforesis se realizó a 117 V durante 90 min.

9.12.5. Tinción con nitrato de plata

El gel se incubó durante 1 h en una solución de metanol, ácido acético y agua desionizada (40:10:50) para fijar las proteínas. El gel se enjuagó durante 24 h con diferentes cambios de agua desionizada y se incubó en una solución de tiosulfato de sodio al 0.02% (p/v) por 1 min. Posteriormente, el gel se lavó tres veces con agua desionizada, se incubó en una disolución de nitrato de plata al 0.1% (p/v) con formaldehído al 0.02% (v/v) a 4 °C por 20 min. Las señales electroforéticas se revelaron con una disolución de carbonato de sodio al 3% (p/v) con formaldehído al 0.05% (v/v), la reacción se detuvo con ácido acético al 5%.

9.12.6. Parámetros bioquímicos aparentes de las Lacasas de *F. oxysporum* SC 33

9.12.6.1. Determinación de pH

La actividad de las Lacasas se evaluó en un intervalo de pH de 3 a 6. Para el ensayo se utilizó un búfer de citrato y de fosfato. Las mezclas de reacción se formaron con 600 μ l de cada búfer y 200 μ l del extracto enzimático (0.01 mg/ml). Posteriormente, la reacción se incubó durante 1 h y la actividad se determinó en un espectrofotómetro al adicionar 200 μ l de ABTS 5 mM.

9.12.6.2. Determinación de temperatura

La actividad de las Lacasas se evaluó en un intervalo de 30 °C a 60 °C, para el ensayo se colocaron 600 μ l búfer de citrato pH 5 y 200 μ l del extracto enzimático (0.01 mg/ml). Posteriormente, la reacción se incubó durante 1 h en cada valor de temperatura y la actividad se determinó en un espectrofotómetro al adicionar 200 μ l de ABTS 5 mM.

9.12.6.3. Determinación de K_m y V_{max}

La afinidad de las Lacasas por los sustratos ABTS, Guaycol, acetaminofén, carbamazepina, rojo Congo y RBBR, se analizaron en un intervalo de concentración de 0.1 mM a 5 mM. Los resultados se ajustaron al modelo de Lineweaver-Burk.

9.13. Determinación de la capacidad de las Lacasas del proteoma extracelular de *F. oxysporum* SC 33 en la degradación de ABTS, RBBR, acetaminofén y carbamazepina

9.13.1. Análisis de espectrofotometría Uv-vis en la remoción de los compuestos fenólicos

Los colorantes se prepararon en una concentración de 10 mg/l. Posteriormente, en matraces de 25 ml se colocaron 2 ml de cada uno de los colorantes, 2 ml del extracto fúngico (0.01 mg/ml) y 6 ml de búfer de citrato 0.1 M, pH 5. Las muestras se dejaron en incubación durante 24 h para determinar el porcentaje de decoloración mediante espectrofotometría UV-vis. Las lecturas de absorbancia se realizaron a 250, 280 y 497 nm para acetaminofén, carbamazepina y rojo congo, respectivamente.

9.13.2. Análisis de espectrofotometría infrarroja en la remoción de los compuestos fenólicos

Los productos de reacción de la enzima con acetaminofén, carbamazepina, RBBR y rojo Congo se liofilizaron y se analizaron por espectrofotometría de infrarrojo con un espectrómetro Thermo Scientific FT-IR Nicolet™ iS™ 10 con la técnica de ATR. Los datos se expresan en números de onda ($\nu \text{ cm}^{-1}$) para los máximos principales de absorción.

9.14. Análisis de los datos

Los resultados de los experimentos se analizaron estadísticamente con el programa STATISTICA 10 y R. Para el análisis se emplearon pruebas univariadas y multivariadas.

10. DISCUSIÓN

Las Lacasas (E.C. 1.10.3.2) pertenecen al grupo de proteínas multicobre. Debido a su escasa especificidad de sustrato son interesantes para diferentes propósitos de transformación química que promueven diferentes organizaciones ambientales, industriales y sectores biotecnológicos (Agrawal *et al.*, 2019a). Estas se encuentran ampliamente distribuidas en plantas, hongos, bacterias e insectos. Entre los hongos que destacan por la producción de Lacasas están algunos basidiomicetos y ascomicetos (Huy *et al.*, 2020).

Al respecto, el número de especies fúngicas totales conocidos es un tema interesante con numerosos tópicos de debate, controversia y sin solución a lo largo del tiempo (Hyde *et al.*, 2020). Actualmente, más de 148.000 especies de hongos se reconocen (Species Fungorum, 2021; <http://www.speciesfungorum.org>). Con el desarrollo de nuevas tecnologías para su identificación, cada año se agrega un número creciente de nuevas especies al acervo fúngico (Maharachchikumbura *et al.*, 2021). La creencia es que el reino Fungi comprende entre 2,2 y 3,8 millones de especies, con 2 a 3 millones aún por descubrir. De los cinco órdenes principales en los que se encuentran la mayoría de las nuevas especies que se publicaron en 2019, cuatro (Hypocreales, Pleosporales, Lecanorales y Capnodiales) pertenecen a Ascomycota (Jayawardena *et al.*, 2021; Maharachchikumbura *et al.*, 2021).

Este modelo fúngico es interesante para nuestro estudio por la patogenicidad asociada a plantas. Asimismo, por su genoma y su rápida adaptación al medio ambiente hostil. Un organismo es excepcional por su genoma en constante evolución y su capacidad de adaptación a entornos hostiles en un tiempo corto (Deiulio *et al.*, 2018). Asimismo, en el genoma de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* 4287 se encontraron seis genes para la producción de Lacasas (*Lcc1*, *Lcc2*, *Lcc3*, *Lcc4*, *Lcc9*

y *Lcc5*) y cuatro secuencias proteicas que se identificaron como A7LBK7_FUSOX, A7LBK8_FUSOX, A7LBK6_FUSOX, A7LBK9_FUSOX (Alonso-Hurtado, 2020). Un antecedente para nuestra investigación que sirvió para desarrollar estrategias *in silico* e *in vitro* en la determinación y producción de Lacasas.

Para ello, una recopilación de cristales y secuencias proteicas de Lacasas en hongos basidiomicetos y ascomicetos se realizó en este trabajo. Cristales de Lacasas en *Fusarium oxysporum* no se encontraron. Sin embargo, en los repositorios de datos si se encontraron secuencias de Lacasas en su genoma. Por lo cual, el siguiente paso de la investigación *in silico* consistió en la búsqueda del sitio activo de las Lacasas. El cual se conforma por los aminoácidos: His 508, His 431, His 436, His 434, His 95, His 502, His 504, His 140, His 138 y His 93. Una de las preguntas por responder, es ¿este sitio activo se conserva indistintamente del filo al cual pertenecen los organismos productores de Lacasas? Esto se respondió con la coincidencia de los aminoácidos del sitio activo en el alineamiento que realizamos en Uniprot (www.uniprot.org). En donde se identificaron los residuos de Histidina presentes en las secuencias de *Fusarium*. Por tanto, la observación es que el sitio activo de las Lacasas es ampliamente conservado.

Asimismo, con la herramienta swissmodel (swissmodel.expasy.org)_se realizó una aproximación del cristal de Lacasas. Con esta herramienta se encontró coincidencia mayor del 90% con una Lacasa de *Melanocarpus albomyces*. Este ascomiceto es ampliamente descrito por su producción de Lacasas. En Protein Data Bank los cristales de *M. albomyces* existen desde el año 2002 hasta el 2021, es decir, la abundancia de cristales en este hongo es amplia. Por ello, de los diferentes cristales que se encontraron de *M. albomyces* un candidato para nuestros estudios *in silico* es 3FU8 debido a que tiene 1.8 Å de resolución, es una proteína sin mutaciones y se encuentra en interacción con 2,6-Dimetoxifenol (DMP). El 2,6-DMP, es un compuesto fenólico con el cuál la enzima interacciona en su sitio activo. Autores tales como, Agrawal *et al.*, (2020) y Liu *et al.*, (2021), incluyeron en sus investigaciones la implementación de este tipo de herramientas *in silico* debido a que la cristalización de enzimas es un proceso complicado. Asimismo, con cristales de enzimas de cada

organismo y con herramientas bioinformáticas conocer cada una de estas enzimas es posible. Los cristales de Lacasas de *M. albomyces* se tomaron como un modelo del cristal de las Lacasas para *Fusarium oxysporum*. Por tanto, la conservación del sitio catalítico es primordial para la inferencia del comportamiento de las Lacasas en cualquier organismo. En este caso se infiere que los residuos de Histidina unidos a los átomos de cobre son esenciales para la transferencia de electrones desde el sustrato a los sitios T₁, T₂ y T₃ del sitio catalítico. Asimismo, su reducción de oxígeno molecular a agua. Algunos autores tal como Rostami *et al.*, 2022 reportaron la participación de dichos aminoácidos en la transferencia electrones hasta el sitio trinuclear de cobre.

Los cuales reportaron a *Myrothecium verrucaria* ITCC-8447 con actividad de Lacasas en el intervalo de 6 d a 10 d. En el caso de Pinheiro *et al.*, (2020) la mayor actividad de Lacasas en *Trametes versicolor* se obtuvo a los 5 d. Por tanto, las dos cepas son modelos de estudio interesantes por la actividad que presentan, en un intervalo de tiempo amplio. Por ello, ambas cepas fúngicas se utilizaron para ensayos posteriores. En los cuales se evaluaron criterios de crecimiento óptimo e inducción de la enzima con fenoles.

En la producción de enzimas fúngicas, uno de los criterios es la elección de las condiciones óptimas del medio de producción de la enzima de interés. Con el desarrollo de técnicas estadísticas modernas, la optimización de un medio de cultivo para la producción enzimática es práctica, eficiente y económica. El diseño de Plackett-Burman es un método eficaz para evaluar la importancia relativa de los componentes del medio de producción enzimática, ya que significativamente reduce el número total de experimentos (Yan *et al.*, 2021). Para el caso del factor de pH en ambas cepas el pH óptimo del medio de producción de Lacasas es de 5. Othman *et al.*, (2021) reportaron el impacto del pH en el medio de producción de Lacasas en *Trichoderma harzianum* S7113, en su caso el pH óptimo es de 5. Por tanto, se infiere que para la producción de Lacasas el pH del medio es ácido.

El modelo Placket- Burman considera los efectos principales e ignora las interacciones entre las variables, por lo que generalmente se usa en combinación con otra metodología estadística robusta. En este caso, el modelo de bosques aleatorios se utilizó como complemento para el establecimiento de los factores de interés en la producción de Lacasas. Un modelo de bosques aleatorios es una técnica de aprendizaje automático que se construye a partir de una colección de árboles de decisión (X. Zhou *et al.*, 2020). Con este modelo, los factores determinantes en ambas cepas son la fuente de carbono y la temperatura. En el caso de la temperatura en FOSC 33 la temperatura de 25 °C y de FOSC 22 de 35 °C. Los resultados son similares a lo que reportaron Wang *et al.*, (n.d.) con *Auricularia cornea* donde el efecto de la temperatura en el medio de producción de Lacasas se encuentra en valores de 26 °C a 30 °C. Por tal motivo, el siguiente paso de esta investigación se basó en la dilucidación de la fuente de carbono. Ya que como los resultados lo muestran la fuente de carbono es determinante en la producción de Lacasas fúngicas y no fue claramente definida en los modelos estadísticos. Entonces, ambas cepas se crecieron en diferentes fuentes de carbono. Con ello, se determinó que la mejor fuente de carbono es la dextrosa para FOSC 33 y la sacarosa para FOSC22 en la producción de Lacasas. Estos resultados son similares a los que reportaron Othman *et al.*, (2021). Ellos determinaron que en el caso de *Trichoderma harzianum* S7113, la fuente de carbono óptima para la producción de Lacasas fue la dextrosa.

Mediante ensayos de acoplamiento molecular se realizó una aproximación para conocer los posibles compuestos fenólicos candidatos para su catálisis mediante las Lacasas fúngicas. La afinidad de unión se establece por las interacciones intermoleculares no covalentes, como los puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, fuerzas hidrofóbicas y de Van der Waals (Villacis- Perez, 2021). Por tanto, las interacciones o fuerzas intermoleculares son las responsables de las atracciones o repulsiones entre distintas moléculas o iones. En este caso, el acetaminofén, la carbamazepina y el azul brillante de remazol resultaron con mayor energía de afinidad en la interacción con -6.4 kcal/mol, -7.0 kcal/mol y -7.2 kcal/mol, respectivamente. En la visualización de las interacciones se observaron puentes de hidrógeno, fuerzas de van der waalls, enlace carbono-hidrógeno, pi-pi, pi-alkil y pi-

azufre. La importancia de estas interacciones a nivel energético se debe a la fuerza de cada interacción; puente de hidrogeno (P-H) -1 a -40 kcal/mol; interacciones hidrofóbicas -0.7 a -1.5 kcal/mol, interacciones aromáticas -1.6 a -2.5 kcal/mol y Pi-Anión -2 a -5 kcal/mol (Cambridge MedChem, 2020; Villacis- Perez, 2021). Mo *et al.*, (2018) establecieron en su trabajo que las interacciones de fenoles tales como el nonilfenol y el octilfenol lineales dependen tanto de los enlaces de hidrógeno como de los contactos hidrofóbicos. Entonces, la estabilidad de reacción con estos compuestos se debe a la participación de los puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals carbono-hidrógeno, pi-pi, pi-alkil y pi-azufre con aminoácidos cercanos al sitio activo y esencialmente con His 508, presente en el sitio activo. Por otro lado, Kameshwar *et al.*, (2018) evaluaron diferentes compuestos fenólicos (monómeros, dímeros y tetrámeros) y determinaron que las Lacasas tienen afinidad por estas moléculas en los mismos sitios de acoplamiento. Es decir, que las Lacasas tienen un gran potencial redox para catalizar sustratos de distinta composición estructural. Lo cual es similar con nuestros resultados ya que la Lacasa tuvo afinidad por los diferentes compuestos propuestos, en el mismo sitio de acoplamiento.

Posterior al acoplamiento se evaluó la estabilidad de reacción entre la Lacasa el acetaminofén, la carbamazepina y el azul brillante de remazol durante 2 nanosegundos. La estabilidad de la reacción del acetaminofén, la carbamazepina y el RBBR no superó los 2 Å, lo cual sugiere que los tres compuestos son candidatos para llevarse a cabo las reacciones *in vitro*. Debido a que con esto se infiere que en los primeros 2 ns de la reacción, los sustratos se unen al sitio T₁ para llevar a cabo la transferencia de electrones. Mehra *et al.*, (2018) determinaron que la estabilidad de reacción de las Lacasas se atribuye a la cercanía del sustrato al sitio T₁.

La tecnología de bioaumentación agrega principalmente microorganismos de cultivos enriquecidos que degradan de manera eficiente los contaminantes objetivo en el sistema de reacción, con el objetivo de mejorar la capacidad operativa del sistema de reacción de una manera específica y determinada (Wang *et al.*, 2019). Es por ello, que en la búsqueda de producción de Lacasas a partir de *F. oxysporum* lo primero que se realizó fue la determinación del efecto tóxico de los compuestos fenólicos sobre el crecimiento de FOSC 33 y FOSC 22. Con ello, cambios morfológicos se

observaron a nivel macroscópicos. Con concentraciones de 0.1% de fenoles, la coloración de ambas cepas se modificó, sin embargo, el crecimiento no se modificó. Por tal motivo, la utilización de un inóculo enriquecido con fenoles fue de interés para nuestra investigación ya que, con esto, la capacidad metabólica del hongo permanecería activa a la degradación de fenoles. Algunos autores tal como Jiang *et al.*, (2016) aislaron a un hongo halófilo JS4 de una fábrica farmacéutica, con capacidad de degradar 500 mg/L de fenol en 32 h en condiciones óptimas. En nuestra investigación se evaluó la capacidad de ambas cepas para la producción de Lacasas con un enriquecimiento previo con fenoles. En el primer paso de purificación de las Lacasas se realizaron dos métodos, la precipitación con acetona y la ultrafiltración con membranas de 100 kDa. Con este ensayo se determinó que la concentración de Lacasas es más efectiva con membranas de ultrafiltración.

Las Lacasas fúngicas extracelulares son glicoproteínas que están compuestas por *N*-glucanas con alto contenido de manosa. La glicosilación tiene una función esencial en la actividad, secreción, retención de cobre y estabilidad térmica de las Lacasas (Xu *et al.*, 2019). Entonces, para evaluar el efecto de desglicosilación en las proteínas del extracto purificado de FOSC 33 se utilizó la enzima Endo- H. Con ello, en el gel de electroforesis SDS-PAGE se observaron dos señales entre 75 y 100 kDa, en comparación con el control sin tratamiento con Endo-H se observó una disminución en los pesos moleculares, una de las señales en 150 kDa desapareció. En el caso de las Lacasas fúngicas es común encontrarlas glicosiladas, tal es el caso de *T. versicolor*, que al ser evaluada con enzimas de desglicosilación su peso molecular disminuye a 54 kDa (Iimura *et al.*, 2018). Otro caso es de las Lacasas que se obtuvieron a partir de *Madurella mycetomatis* (Tülek *et al.*, 2021). Por tanto, este resultado sugiere que el extracto contiene proteínas glicosiladas y una de ellas son las lacasas.

Las Lacasas fúngicas suelen existir como estructuras monoméricas, homodiméricas, heterodiméricas u otras estructuras oligoméricas (Shanmugam *et al.*, 2018). En este trabajo, las señales electroforéticas que se identificaron tuvieron un peso molecular de 100 kDa, el cual es consistente con el de las Lacasas fúngicas típicas, ya que se

reportan con un Intervalo de peso molecular entre 50-100 kDa. En este caso, el proceso de purificación coincide con el de otros hongos ascomicetos como *Thielavia sp.* en donde la mayor concentración de proteínas se obtiene con ultrafiltración (Mtibaà *et al.*, 2018). Sadhasivam *et al.* (2008) describieron una Lacasa monomérica purificada del hongo ascomiceto *T. harzianum* con un peso molecular de 79 kDa, mientras que la de *Sclerotinia sclerotiorum* es monomérica con un peso molecular de 65 kDa en su forma nativa.

En estudios anteriores, una amplia variedad de Lacasas fúngicas se purificaron con Sephadex G-100 tal es el caso de la Lacasa de *Aspergillus sp.* HB_RZ4 con un rendimiento de 6.21 % (Sayyed *et al.*, 2020) y la Lacasa de *Trichoderma asperellum* BPLMBT1 con un rendimiento de 1.8 % (Shanmugam *et al.*, 2018). Sin embargo, el rendimiento de purificación de la Lacasa de FOSC33 con Sephadex G-100 disminuyó la actividad específica en comparación con el paso de ultrafiltración. Lo cual indica que la enzima no se adsorbe perfectamente en el gel de dextrano y que requiere una cromatografía de intercambio iónico previo a la utilización de Sephadex G-100 como lo reportaron Olajuyigbe *et al.*, (2019) con la Lacasa de *Cyberlindnera fabianii*.

Para los parámetros bioquímicos aparentes de la Lacasa se evaluó el efecto del pH con ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) como sustrato. Por tanto, los resultados coinciden con los de otros hongos ascomicetos que se reportaron tal como *Thielavia sp.* (Mtibaà *et al.*, 2018) y *Scytalidium thermophilum* (Younes y Sayadi, 2011). Mientras que Othman *et al.* (2018) describieron a *Agaricus bisporus* AU13 y *Leptosphaerulina sp.* con resultados similares. Respecto al efecto de la temperatura, en el ensayo se observó que la Lacasa mostró estabilidad hasta los 60 °C. Este resultado se encuentra en un intervalo que muestran las Lacasas, ya que estas se caracterizan por tener temperaturas óptimas entre 50 y 80 °C. Estos resultados coinciden con los de Kiiskinen *et al.* (2002) y Mtibaà *et al.* (2017), quienes reportaron temperaturas óptimas entre 60 °C y 70 °C para *M. albomyces* y *Chaetomium sp.*, respectivamente.

Mientras que la oxidación del guaycol (8.67 mM) no fue tan eficiente respecto a los otros compuestos que se evaluaron. Por tanto, los valores de K_m de la Lacasa de FOSC 33 con los diferentes compuestos, muestran su amplia especificidad de sustrato. El ABTS es un sustrato que se reporta ampliamente para analizar el comportamiento cinético de las Lacasas. Es por ello, que en la búsqueda del comportamiento de otras Lacasas encontramos que los valores de K_m de la Lacasa de FOSC33 son menores respecto a los valores que se reportan para *Ganoderma lucidum* (3,7 mM) (Ko *et al.*, 2001). En el caso de los valores cinéticos con el acetaminofén y rojo Congo, observamos su especificidad por estos sustratos.

La decoloración y remoción de compuestos que se basa en el uso de métodos enzimáticos es una alternativa potencial para sustituir métodos químicos. Diferentes autores proponen el uso de Lacasas fúngicas como una herramienta prometedora (Mtibaà *et al.*, 2017; Manai *et al.*, 2016) para la remoción de colorantes y fármacos. Sin embargo, este último es poco explorado. En este trabajo observamos modificaciones estructurales en los compuestos propuestos. Mediante un análisis de espectroscopia de infrarojo, el acetaminofén presentó modificaciones en sus enlaces O-H que se encuentran a los 3160 cm^{-1} y en los enlaces C=C del anillo aromático que se encuentran entre los 1400 cm^{-1} y 1600 cm^{-1} . Las modificaciones espectrales en el intervalo de 3200 cm^{-1} a 3500 cm^{-1} muestran los cambios en la estructura del acetaminofén cuando se encuentra con el extracto de las Lacasas de *F. oxysporum* species complex 33. Asimismo, en el caso de la carbamazepina las señales características del enlace C-H del anillo aromático a los 3279 cm^{-1} y el enlace N-H que se encuentra en 3435 cm^{-1} se modificaron por la interacción con el extracto.

El rojo Congo mostró modificaciones en los enlaces azo N=N que se encuentran en los 1582 cm^{-1} (Figura 29). Estas señales se modificaron con el extracto de las Lacasas de *F. oxysporum* species complex 33. La falta de señales entre 3300 cm^{-1} y 3500 cm^{-1} se debe a la ausencia de enlaces O-H. Con lo cual se infiere que las Lacasas están llevando a cabo la catálisis de los compuestos propuestos. Estos resultados coinciden con los que reportaron Lallawmsanga *et al.*, (2019). Mediante la oxidación

de los mismos y la formación de radicales libres que se acoplan entre sí para formar polímeros que se disuelven en agua (E. Wu *et al.*, 2019).

11. CONCLUSIÓN

El aislado silvestre *F. oxysporum* exhibe capacidad para la producción de Lacasas. Con el uso de herramientas estadísticas y computacionales identificamos factores determinantes en la producción de Lacasas tales como la fuente de carbono y temperatura. Las Lacasas de *F. oxysporum* se identificaron con potencial en la remoción de fármacos y colorantes de naturaleza fenólica tales como acetaminofén, carbamazepina, rojo congo y azul brillante de remazol.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades. (2016). Resúmenes de salud pública-fenol. ATSDR: <https://www.atsdr.cdc.gov>.
- Agrawal, K., Bhardwaj, N., Kumar, B., Chaturvedi, V., y Verma, P. (2019a). Process optimization, purification and characterization of alkaline stable white laccase from *Myrothecium verrucaria* ITCC-8447 and its application in delignification of agroresidues. *International Journal of Biological Macromolecules*, 125, 1042–1055. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.108>.
- Agrawal, K., Bhardwaj, N., Kumar, B., Chaturvedi, V., y Verma, P. (2019b). Process optimization, purification and characterization of alkaline stable white laccase from *Myrothecium verrucaria* ITCC-8447 and its application in delignification of agroresidues. *International Journal of Biological Macromolecules*, 125, 1042–1055. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.108>.
- Agrawal, K., Shankar, J., y Verma, P. (2020). Multicopper oxidase (MCO) laccase from *Stropharia* sp. ITCC-8422: an apparent authentication using integrated experimental and in silico analysis. *3 Biotech*, 10(9), 1–18. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02399-8>.
- Al Sharabati, M., Abokwiek, R., Al-Othman, A., Tawalbeh, M., Karaman, C., Orooji, Y., y Karimi, F. (2021). Biodegradable polymers and their nano-composites for the removal of endocrine-disrupting chemicals (EDCs) from wastewater: A review. *Environmental Research*, 202(July), 111694. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111694>.
- Alonso-Hurtado, K. L. (2020). Obtención de los criterios para la selección de un ascomiceto productor de un complejo enzimático óxido reductor extracelular. Tesis de Licenciatura. Instituto de investigaciones químico-biológicas. UMSNH.
- Ardila-Leal, L. D., Poutou-Piñales, R. A., Pedroza-Rodríguez, A. M., y Quevedo-Hidalgo, B. E. (2021). A brief history of colour, the environmental impact of synthetic dyes and removal by using laccases. *Molecules*, 26(13).
- Arnau J, Yaver D, Hjort CM (2020) Strategies and challenges for the development of industrial enzymes using fungal cell factories. In: Nevalainen H (ed) Grand challenges in fungal biotechnology. Springer, Cham, pp 179–210.

- Arregui, L., Ayala, M., Gómez-Gil, X., Gutiérrez-Soto, G., Hernández-Luna, C. E., Herrera De Los Santos, M., Levin, L., Rojo-Domínguez, A., Romero-Martínez, D., Saparrat, M. C. N., Trujillo-Roldán, M. A., y Valdez-Cruz, N. A. (2019). Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 1–33. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1248-0>.
- Asthana, A. N. (2014). Thirty Years after the Cataclysm: Toxic Risk Management in the Chemical Industry. *Journal of Toxicological Sciences*, 6(1), 01–08. <https://doi.org/10.5829/idosi.ajejts.2014.6.1.660>.
- Barbosa, M.O., Moreira, N.F.F., Ribeiro, A.R., Pereira, M.F.R., Silva, A.M.T. (2016). Occurrence and removal of organic micropollutants: An overview of the watch list of EU Decision 2015/495. *Water Res.* 94, 257–279.
- 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.
- Bhamare, H. M., Jadhav, H. P., y Sayyed, R. Z. (2018). Statistical optimization for enhanced production of extracellular laccase from *Aspergillus* sp. HB_RZ4 isolated from bark scrapping. *Environmental Sustainability*, 1(2), 159–166. <https://doi.org/10.1007/s42398-018-0015-1>.
- Cai, L., Giraud, T., y Zhang, N. (2011). The evolution of species concepts and species recognition criteria in plant pathogenic fungi. 121–133. <https://doi.org/10.1007/s13225-011-0127-8>.
- Cámara Nacional de la Industria Farmacéutica. (2017). CANIFARMA: <http://www.canifarma.org.mx/funcionenlasociedad.html>.
- Cambridge MedChem consulting. (2020). Molecular interactions. CMC. https://www.cambridgemedchemconsulting.com/resources/molecular_interactions.html.
- Chehri, K. (2018). Molecular phylogeny of *Fusarium oxysporum* species complex isolated from agricultural soils in Iran. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 51(7–8), 359–372. <https://doi.org/10.1080/03235408.2018.1483183>.
- Chen, L., Wu, Q., He, W., He, T., Wu, Q., y Miao, Y. (2019). Combined de novo transcriptome and metabolome analysis of common bean response to *fusarium oxysporum* f. Sp. *phaseoli* infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24).

<https://doi.org/10.3390/ijms20246278>.

- Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. (2015). “Impulsa la COFEPRIS política farmacéutica competitiva”: <https://www.gob.mx/cofepris/prensa/impulsa-la-cofepris-politica-farmaceutica-competitiva?idiom=es>.
- Cunha, D.L., M.P. Mendes, y M. Marques. (2019). Environmental risk assessment of psychoactive drugs in the aquatic environment. *Environmental Science and Pollution Research* 26: 78–9.
- Deeb, A.A., S. Stephan, O.J. Schmitz, y T.C. Schmidt. (2017). Suspect screening of micropollutants and their transformation products in advanced wastewater treatment. *Science of the Total Environment* 601: 1247–1253.
- Deiulio, G. A., Guo, L., Zhang, Y., y Goldberg, J. M. (2018). Kinome Expansion in the *Fusarium oxysporum* Species. *MSphere*, 3(3), e00231-18.
- European Bioinformatics Institute. (2022). EMBL-EBI: <https://www.ebi.ac.uk>.
- Evgenidou, E.N., I.K. Konstantinou, and D.A. Lambropoulou. (2015). Occurrence and removal of transformation products of PPCPs and illicit drugs in wastewaters: A review. *Science of the Total Environment* 505: 905–926.
- Fernández-Fueyo, E., Castanera, R., Ruiz-Dueñas, F. J., López-Lucendo, M. F., Ramírez, L., Pisabarro, A. G., y Martínez, A. T. (2014). Ligninolytic peroxidase gene expression by *Pleurotus ostreatus*: Differential regulation in lignocellulose medium and effect of temperature and pH. *Fungal Genetics and Biology*, 72, 150–161. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.02.003>.
- Gros, M., K.M. Blum, H. Jernstedt, G. Renman, S. Rodríguez-Mozaz, P. Haglund, P.L. Andersson, K. Wiberg (2017). Screening and prioritization of micropollutants in wastewaters from on-site sewage treatment facilities. *Journal of Hazard Materials* 328: 37–45.
- Kameshwar, A. K. S., Barber, R., y Qin, W. (2018). Comparative modeling and molecular docking analysis of white, brown and soft rot fungal laccases using lignin model compounds for understanding the structural and functional properties of laccases. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 79, 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2017.10.019>.
-

- Kiiskinen, L. L., Viikari, L., y Kruus, K. (2002). Purification and characterisation of a novel laccase from the ascomycete *Melanocarpus albomyces*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(2–3), 198–204. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1012-x>.
- Ko, E. M., Leem, Y. E., y Choi, H. T. (2001). Purification and characterization of laccase isozymes from the white-rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(1–2), 98–102. <https://doi.org/10.1007/s002530100727>.
- Lallawmsanga, Leo, V. V., Passari, A. K., Muniraj, I. K., Uthandi, S., Hashem, A., Abd_Allah, E. F., Alqarawi, A. A., y Singh, B. P. (2019). Elevated levels of laccase synthesis by *Pleurotus pulmonarius* BPSM10 and its potential as a dye decolorizing agent. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(3), 464–468. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.10.006>.
- Laurence, M. H., Summerell, B. A., Burgess, L. W., y Liew, E. C. Y. (2014). Genealogical concordance phylogenetic species recognition in the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Biology*, 118(4), 374–384. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.02.002>.
- Liu, J., Chen, J., Zuo, K., Li, H., Peng, F., Ran, Q., Wang, R., Jiang, Z., y Song, H. (2021). Chemically induced oxidative stress improved bacterial laccase-mediated degradation and detoxification of the synthetic dyes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 226, 112823. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112823>.
- López-Pacheco, I. Y., Silva-Núñez, A., Salinas-Salazar, C., Arévalo-Gallegos, A., Lizarazo-Holguin, L. A., Barceló, D., Iqbal, H. M. N., y Parra-Saldívar, R. (2019). Anthropogenic contaminants of high concern: Existence in water resources and their adverse effects. *Science of the Total Environment*, 690, 1068–1088. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.052>.
- Madikizela, L.M., and L. Chimuka. (2017). Occurrence of naproxen, ibuprofen, and diclofenac residues in wastewater and river water of KwaZulu-Natal Province in South Africa. *Environmental Monitoring Assessment* 189: 348.
- Maharachchikumbura, S. S. N., Chen, Y., Ariyawansa, H. A., Hyde, K. D., Haelewaters, D., Perera, R. H., Samarakoon, M. C., Wanasinghe, D. N., Bustamante, D. E., Liu, J. K., Lawrence, D. P., Cheewangkoon, R., y Stadler, M. (2021). Integrative approaches for species delimitation in Ascomycota. *Fungal Diversity*, 109(1), 155–179.

<https://doi.org/10.1007/s13225-021-00486-6>.

- Manai, I., Miladi, B., El Mselmi, A., Smaali, I., Ben Hassen, A., Hamdi, M., y Bouallagui, H. (2016). Industrial textile effluent decolourization in stirred and static batch cultures of a new fungal strain *Chaetomium globosum* IMA1 KJ472923. *Journal of Environmental Management*, 170, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.12.038>.
- Martínez-Pacheco, M. M., Flores-García, A., Zamudio-Jaramillo, M. A., Chávez-Parga, M. C., y Alvarez-Navarrete, M. (2020). Optimization of production of xylanases with low cellulases in *Fusarium solani* by means of a solid state fermentation using statistical experimental design. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(4), 328–338. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.12.003>.
- Mehra, R., Meyer, A. S., y Kepp, K. P. (2018). Molecular dynamics derived life times of active substrate binding poses explain KM of laccase mutants. *RSC Advances*, 8(64), 36915–36926. <https://doi.org/10.1039/c8ra07138a>.
- Mo, D., Zeng, G., Yuan, X., Xingzhong, Chen, M., Liang Hu, L., Li, H., Wang, H., Xu, P., Lai, C., Wan, J., Zhang, C., y Cheng, M. (2018). Molecular docking simulation on the interactions of laccase from *Trametes versicolor* with nonylphenol and octylphenol isomers. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 41, 331–343. <https://doi.org/10.1007/s00449-017-1866-z>.
- Mo, D., Zeng, G., Yuan, X., Chen, M., Hu, L., Li, H., Wang, H., Xu, P., Lai, C., Wan, J., Zhang, C., y Cheng, M. (2018). Molecular docking simulation on the interactions of laccase from *Trametes versicolor* with nonylphenol and octylphenol isomers. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 41(3), 331–343. <https://doi.org/10.1007/s00449-017-1866-z>.
- Mtibaà, R., Barriuso, J., de Eugenio, L., Aranda, E., Belbahri, L., Nasri, M., Martínez, M. J., y Mechichi, T. (2018). Purification and characterization of a fungal laccase from the ascomycete *Thielavia* sp. and its role in the decolorization of a recalcitrant dye. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, 1744–1751. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.175>.
- Mtibaà, R., de Eugenio, L., Ghariani, B., Louati, I., Belbahri, L., Nasri, M., y Mechichi, T. (2017). A halotolerant laccase from *Chaetomium* strain isolated from desert soil and its ability for dye decolourization. *3 Biotech*, 7(5). <https://doi.org/10.1007/s13205-017->

0973-5.

- National Center for Biotechnology Information. (2022). NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Nirenberg, H. I., y O'Donnell, K. (1998). New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90(3), 434–458. <https://doi.org/10.1080/00275514.1998.12026929>.
- N-linked glycosylation sites in human proteins. (2022). The NetNGlyc server predicts N-Glycosylation sites in human proteins using artificial neural networks that examine the sequence context of Asn-Xaa-Ser/Thr sequons. *NetNGlyc - 1.0*: <https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetNGlyc-1.0>.
- Novoa, C., Dhoke, G. V., Mate, D. M., Martínez, R., Haarmann, T., Schreiter, M., Eidner, J., Schwerdtfeger, R., Lorenz, P., Davari, M. D., Jakob, F., y Schwaneberg, U. (2019). KnowVolution of a Fungal Laccase toward Alkaline pH. *ChemBioChem*, 20(11), 1458–1466. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800807>.
- Olajuyigbe, F. M., Adetuyi, O. Y., y Fatokun, C. O. (2019). Characterization of free and immobilized laccase from *Cyberlindnera fabianii* and application in degradation of bisphenol A. *International Journal of Biological Macromolecules*, 125, 856–864. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.106>.
- Oliveira, T.S., M. Murphy, N. Mendola, V. Wong, D. Carlson, and L. Waring. (2015). Characterization of pharmaceuticals and personal care products in hospital effluent and waste water influent/effluent by direct-injection LC-MS-MS. *Science of the Total Environment* 518–519: 459–478.
- Orozco-Mosqueda, M., Valencia-Cantero, E., López-Albarrán, P., Martínez-Pacheco, M., y Velázquez-Becerra, C. (2015). La bacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2 y diversas aminas inhiben el crecimiento in vitro de hongos destructores de madera. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(3), 219–228. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.06.005>.
- Othman, A. M., Elsayed, M. A., Elshafei, A. M., y Hassan, M. M. (2018). Purification and biochemical characterization of two isolated laccase isoforms from *Agaricus bisporus* CU13 and their potency in dye decolorization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 1142–1148. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.043>.
- Othman, A. M., Mahmoud, M., Abdelraof, M., Abdel Karim, G. S. A., y Elsayed, A. M. (2021).

- Enhancement of laccase production from a newly isolated *Trichoderma harzianum* S7113 using submerged fermentation: Optimization of production medium via central composite design and its application for hydroquinone degradation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 192(September), 219–231. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.207>.
- 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.
- Pawlik, A., Ciołek, B., Sulej, J., Mazur, A., Grela, P., Staszczak, M., Niścior, M., Jaszek, M., Matuszewska, A., Janusz, G., y Paszczyński, A. (2021). *Cerrena unicolor* laccases, genes expression and regulation of activity. *Biomolecules*, 11(3), 1–13. <https://doi.org/10.3390/biom11030468>.
- Petrie, B., K. Proctor, J. Youdan, R. Barden, and B. Kasprzyk- Hordern. (2017). Critical evaluation of monitoring strategy for the multi-residue determination of 90 chiral and achiral micropollutants in effluent wastewater. *Science of the Total Environment* 579: 569–578.
- Pinheiro, V. E., Michelin, M., Vici, A. C., de Almeida, P. Z., y Teixeira de Moraes Polizeli, M. de L. (2020). *Trametes versicolor* laccase production using agricultural wastes: a comparative study in Erlenmeyer flasks, bioreactor and tray. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 43(3), 507–514. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02245-z>.
- Polyethylenimine, P., y Rysov, M. (2020). Wastewater Treatment by Novel. *Water* 12 (2), 588. <https://doi.org/10.3390/w12020588>.
- Rani, M., y Shanker, U. (2018). Photocatalytic degradation of toxic phenols from water using bimetallic metal oxide nanostructures. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 553, 546–561. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.05.071>
- Rodrigues, E. M., Karp, S. G., Malucelli, L. C., Helm, C. V., y Alvarez, T. M. (2019). Evaluation of laccase production by *Ganoderma lucidum* in submerged and solid-state fermentation using different inducers. *Journal of Basic Microbiology*, 59(8), 784–791. <https://doi.org/10.1002/jobm.201900084>.
- Rogowska, J., Cieszyńska-Semenowicz, M., Ratajczyk, W., y Wolska, L. (2020).

- Micropollutants in treated wastewater. *Ambio*, 49(2), 487–503. <https://doi.org/10.1007/s13280-019-01219-5>.
- Rostami, A., Abdelrasoul, A., Shokri, Z., y Shirvandi, Z. (2022). Applications and mechanisms of free and immobilized laccase in detoxification of phenolic compounds A review. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 38(2), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11814-021-0984-0>.
- Royal society of chemistry. (2022). Chemspider: <http://www.chemspider.com>.
- Sadhasivam, S., Savitha, S., Swaminathan, K., y Lin, F. H. (2008). Production, purification and characterization of mid-redox potential laccase from a newly isolated *Trichoderma harzianum* WL1. *Process Biochemistry*, 43(7), 736–742. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.02.017>.
- Sayed, R. Z., Bhamare, H. M., Sapna, Marraiki, N., Elgorban, A. M., Syed, A., El-Enshasy, H. A., y Dailin, D. J. (2020). Tree bark scrape fungus: A potential source of laccase for application in bioremediation of non-textile dyes. *PLoS ONE*, 15(6), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229968>.
- Shanmugam, S., Hari, A., Ulaganathan, P., Yang, F., Krishnaswamy, S., y Wu, Y. R. (2018). Potential of biohydrogen generation using the delignified lignocellulosic biomass by a newly identified thermostable laccase from *Trichoderma asperellum* strain BPLMBT1. *International Journal of Hydrogen Energy*, 43(7), 3618–3628. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.01.016>.
- Shubha J, y Srinivas C. (2017). African Journal of Biotechnology Diversity and extracellular enzymes of endophytic fungi associated with *Cymbidium aloifolium* L. 16(48), 2248–2258. <https://doi.org/10.5897/AJB2017.16261>.
- Singh, P., Sharma, P., Bisetty, K., y Perez, J. J. (2010). Molecular dynamics simulations of Ac-3Aib-Cage-3Aib-NHMe. *Molecular Simulation*, 36(13), 1035–1044. <https://doi.org/10.1080/08927022.2010.501797>.
- Soden, D. M., y Dobson, A. D. W. (2001). Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. *Microbiology*, 147(7), 1755–1763. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-7-1755>.
- Stuedler, S., Werner, A., y Walther, T. (2019). It Is the Mix that Matters: Substrate-Specific Enzyme Production from Filamentous Fungi and Bacteria Through Solid-State

- Fermentation. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 169, 51–81. https://doi.org/10.1007/10_2019_85.
- Sugiharto, S. (2019). A review of filamentous fungi in broiler production. In *Annals of Agricultural Sciences* (Vol. 64, Issue 1, pp. 1–8). Faculty of Agriculture, Ain-Shams University. <https://doi.org/10.1016/j.aogas.2019.05.005>.
- Summerell, B. A. (2019). Resolving *Fusarium*: Current Status of the Genus. *Annual Review of Phytopathology*, 57, 323–339. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718-100204>.
- Swiss Institute of bioinformatics. (2021). Swissmodel: <https://swissmodel.expasy.org/>.
- Tao, X., Huang, Y., Wang, C., Chen, F., Yang, L., Ling, L., Che, Z., y Chen, X. (2020). Recent developments in molecular docking technology applied in food science: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 55(1), 33–45. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14325>.
- The Universal Protein resource. (2022). Uniprot: <https://www.uniprot.org>.
- Tülek, A., Karataş, E., Çakar, M. M., Aydın, D., Yılmazcan, Ö., y Binay, B. (2021). Optimisation of the Production and Bleaching Process for a New Laccase from *Madurella mycetomatis*, Expressed in *Pichia pastoris*: from Secretion to Yielding Prominent. *Molecular Biotechnology*, 63(1), 24–39. <https://doi.org/10.1007/s12033-020-00281-9>.
- Umar, A., y Ahmed, S. (2022). Optimization, purification and characterization of laccase from *Ganoderma leucocontextum* along with its phylogenetic relationship. *Scientific Reports*, 12(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06111-z>.
- Velarde-Félix, S., Garzón-Tiznado, J. A., Hernández-Verdugo, S., López-Orona, C. A., y Retes-Manjarrez, J. E. (2018). Occurrence of *Fusarium oxysporum* causing wilt on pepper in Mexico. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 40(2), 238–247. <https://doi.org/10.1080/07060661.2017.1420693>.
- Villacis-Pérez, N. A. (2021). Estudios bioinformáticos sobre la proteína Spike del SARS CoV-2 para el desarrollo de posibles inhibidores. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y biotecnología. Universidad Técnica de Ambato.
- Wang, F., Terry, N., Xu, L., Zhao, L., Ding, Z., y Ma, H. (2019). Fungal laccase production from lignocellulosic agricultural wastes by solid-state fermentation: A review. In

- Microorganisms (Vol. 7, Issue 12). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120665>.
- Wang, Q., Wang, L., y Wang, W. (n.d.). Optimizing Laccase Production in *Auricularia Cornea* by Submerged Fermentation With Wheat Bran Extract : Applications in Decolorization of Malachite Green Dy.
- Wang, X., Wang, Y., Zhang, A., Duo, C., Zhao, C., y Xie, F. (2019). Isolation of a highly efficient phenol-degrading fungus and the preparation of an effective microbial inoculum for activated sludge and its enhancement for hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(30), 16004–16014. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.10.154>.
- Wang, Y., Wu, N., y Chen, Z. H. (2021). Insight of the optical property of laccase during polymeric formation for application in real-time biosensing. *Journal of Materials Science*, 56(25), 14368–14380. <https://doi.org/10.1007/s10853-021-06186-5>.
- Wu, E., Li, Y., Huang, Q., Yang, Z., Wei, A., y Hu, Q. (2019). Laccase immobilization on amino-functionalized magnetic metal organic framework for phenolic compound removal. *Chemosphere*, 233, 327–335. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.150>.
- Wu, S., Guo, D., Xu, X., Pan, J., y Niu, X. (2020). Colorimetric quantification and discrimination of phenolic pollutants based on peroxidase-like Fe₃O₄ nanoparticles. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 303(July 2019), 127225. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.127225>.
- Xu, G., Wu, Y., Zhang, Y., Fang, W., Xiao, Y., y Fang, Z. (2019). Role of N-glycosylation on the specific activity of a *Coprinopsis cinerea* laccase Lcc9 expressed in *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 128(5), 518–524. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.05.004>.
- Yan, L., Zhang, Z., Zhang, Y., Yang, H., Qiu, G., Wang, D., y Lian, Y. (2021). Improvement of tacrolimus production in *Streptomyces tsukubaensis* by mutagenesis and optimization of fermentation medium using Plackett–Burman design combined with response surface methodology. *Biotechnology Letters*, 43(9), 1765–1778. <https://doi.org/10.1007/s10529-021-03144-8>.
- Yazici, S. O., Sahin, S., Biyik, H. H., Geroglu, Y., y Ozmen, I. (2020). Optimization of fermentation parameters for high-activity inulinase production and purification from

Rhizopus oryzae by Plackett–Burman and Box–Behnken. *Journal of Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04591-3>.

Younes SB y Sayadi S. (2011) Purification and characterization of a novel trimeric and thermotolerant laccase produced from the ascomycete *Scytalidium thermophilum* strain. *J Mol Catal B Enzym* 73:35–42.

Zdarta, J., Jesionowski, T., Pinelo, M., Meyer, A. S., Iqbal, H. M. N., Bilal, M., Nguyen, L. N., y Nghiem, L. D. (2022). Free and immobilized biocatalysts for removing micropollutants from water and wastewater: Recent progress and challenges. *Bioresource Technology*, 344(PB), 126201. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126201>.

Zhou, M., Zhang, J., y Sun, C. (2017). Occurrence, ecological and human health risks, and seasonal variations of phenolic compounds in surface water and sediment of a potential polluted river basin in China. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(10). <https://doi.org/10.3390/ijerph14101140>.

Zhou, X., Lu, P., Zheng, Z., Tolliver, D., y Keramati, A. (2020). Accident Prediction Accuracy Assessment for Highway-Rail Grade Crossings Using Random Forest Algorithm Compared with Decision Tree. *Reliability Engineering and System Safety*, 200(July 2019), 106931. <https://doi.org/10.1016/j.ress.2020.106931>.

Zhu, C., Bao, G., y Huang, S. (2016). Optimization of laccase production in the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* (ACCC 52857) induced through yeast extract and copper. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 30(2), 270–276. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1135081>.

Zucconi, L., Canini, F., Temporiti, M. E., y Tosi, S. (2020). Extracellular enzymes and bioactive compounds from antarctic terrestrial fungi for bioprospecting. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(18), 1–31. <https://doi.org/10.3390/ijerph17186459>.