



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA  
TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO  
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MÉRIDA

**ITM**

**“Caracterización del extracto proteico extracelular del hongo  
*Phlebia floridensis* con potencial biotecnológico”**

PARA OPTAR AL GRADO DE:

Maestro en Ciencias de los Alimentos y Biotecnología

PRESENTA:

Roberto Ariel Amézquita Novelo

ASESOR:

Dr. Denis Israel Magaña Ortiz

Mérida, Yucatán, México

28/06/2019





**SEP**  
SECRETARÍA DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MEXICO

Instituto Tecnológico de Mérida

"2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

**DEPENDENCIA:** DIV. DE EST. DE POSG. E INV.  
**No. DE OFICIO:** X-289/19

**ASUNTO:** AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Mérida, Yucatán, 20/junio/2019

**C. AMEZQUITA NOVELO ROBERTO ARIEL**  
Pasante de la Maestría en Ciencias de los  
Alimentos y Biotecnología  
**PRESENTE**

De acuerdo al fallo emitido por su director el **Dr. Denis Israel Magaña Ortíz**, y la co-directora la **Dra. Elizabeth de la Luz Ortiz Vázquez**, y la comisión revisora integrada por la Dra. Laura Margarita López Castillo, y el M.C. Jesús Manuel Ramón Sierra, considerando que cubre los requisitos establecidos en el Reglamento de Titulación de los Institutos Tecnológicos le autorizamos la impresión de su trabajo profesional con la TESIS:

**"CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO PROTEICO EXTRACELULAR DEL HONGO *Phlebia floridensis* CON POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO"**

**ATENTAMENTE**

Experiencia en Educación Tecnológica

**M.C. DANIEL ARCÁNGEL LOPEZ SAURI**  
**JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE**  
**POSGRADO E INVESTIGACIÓN**



S.E.P.  
INSTITUTO TECNOLÓGICO  
DE MERIDA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE  
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

C.p. Archivo  
DALS/fja



SEP Instituto Tecnológico de Mérida, Km.5 Carretera Mérida-Progreso A.P 911  
CP 97118 Mérida Yucatán, México, Tels. 964-50-00, Ext. 10001, 10401  
10601, 10201 e-mail: itm@itmerida.mx http://www.itmerida.mx



## ÍNDICE DE CONTENIDO

INDICE DE TABLAS .....	v
CAPÍTULO I .....	6
1.1. RESUMEN.....	6
1.1. ABSTRACT .....	7
1.2. INTRODUCCIÓN.....	8
CAPÍTULO II .....	9
2.1. FUNDAMENTO TEÓRICO Y ANTECEDENTES.....	9
2.1.1. Biodiversidad de la Península de Yucatán .....	9
2.1.2. Características del suelo en la Península de Yucatán.....	9
2.1.3. Hongos ligninocelulósicos .....	11
2.1.4. El género Phlebia .....	13
2.1.5. Enzimas de los hongos ligninocelulósicos.....	14
2.1.6. Peroxidasas.....	15
2.1.6.1. Lignin Peroxidasa (EC 1.11.1.14) .....	18
2.1.6.2. Manganeso Peroxidasa (EC 1.11.1.13) .....	21
2.1.6.3. Versátil peroxidasa (EC 1.11.1.16) .....	23
2.1.6.4. Cloroperoxidasas (EC 1.11.1.10).....	25
2.1.1. Colorantes sintéticos .....	28
2.2. OBJETIVOS .....	29

2.2.1. Objetivo general .....	29
2.2.2. Objetivos específicos.....	29
CAPITULO III MATERIALES Y MÉTODOS .....	30
3.1.1. Material biológico.....	30
3.1.2. Formulación del medio de cultivo y parámetros de incubación. ....	30
3.1.3. Actividad en placa lacasa .....	30
3.1.4. Ensayos de dependencia de peróxido.....	31
3.1.5. Ensayo de versatilidad enzimática de <i>P. floricidensis</i> en presencia de diferentes colorantes.....	31
3.1.6. Extracción de proteínas de <i>P. floricidensis</i> .....	33
3.1.7. Determinación de la concentración proteica.....	34
3.1.8. Determinación del perfil electroforético de <i>P. floricidensis</i> .....	34
3.1.9. Zimograma del extracto proteico de <i>P. floricidensis</i> .....	35
3.1.10. Enriquecimiento y semi-purificación de peroxidasas	35
3.1.11. Determinación de la actividad enzimática de lacasas y peroxidasas	36
3.1.12. Caracterización de componentes del extracto proteico extracelular del hongo <i>P. floricidensis</i> .....	37
CAPITULO IV .....	38
4.1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38

4.1.1. Ensayo de la actividad en placa de la enzima lacasa de <i>P. floricida</i> .....	38
4.1.2. Determinación de la dependencia de peróxido de hidrogeno.....	39
4.1.3. Ensayo de la versatilidad enzimática de <i>P. floricida</i> con diferentes colorantes.....	41
4.1.4. Perfil electroforético del extracto proteico de <i>P. floricida</i> .....	43
4.1.5. Enriquecimiento y semi-purificación del extracto enzimático de <i>P. floricida</i>	45
4.1.6. Determinación de las actividades enzimáticas volumétricas de las lacasas y peroxidases.....	47
4.1.7. Identificación de las proteínas presentes en el extracto proteico de <i>P. floricida</i> .....	49
4.2. CONCLUSIONES.....	53
4.3. BIBLIOGRAFÍA.....	54
4.4. ANEXOS .....	62

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura tridimensional de la lignin peroxidasa de <i>P.chrysosporium</i> . (PDB#1lga).....	19
Figura 2: Ciclo catalítico de lignin peroxidasa. ....	20
Figura 3: Mecanismo de acción de lignin peroxidasa.....	21

Figura 4: Estructura tridimensional de la manganeso peroxidasa de <i>P.chrysosporium</i> . (PDB#1yyd) .....	22
Figura 5: Mecanismo de acción de la manganeso peroxidasa.....	23
Figura 6: La oxidación catalizada por MnP del compuesto modelo aril-glicerol- $\beta$ -aril éter. ....	23
Figura 7: Estructura tridimensional de la versátil peroxidasa de <i>P. eryngii</i> (PDB#2boq).....	24
figura 8: Estructura tridimensional de la cloroperoxidasa de <i>Leptoxiphium fumago</i> (PDB#1CPO).....	25
Figura 9: Ensayo en placa (ABTS) del hongo <i>Phlebia floridensis</i> .....	39
Figura 10: Evaluación de la dependencia de peróxido de hidrógeno en <i>P. floridensis</i> .....	40
Figura 11: Evaluación de la actividad de <i>P. floridensis</i> y <i>P. chrysosporium</i> en presencia de diferentes colorantes.....	42
Figura 12: Perfil electroforético del extracto de <i>P. floridensis</i> .....	44
figura 13:Perfil electroforético de la separación por intercambio iónico del extracto a pH3 de hongo <i>P. floridensis</i> .....	46
Figura 14: Zimograma de la fracción obtenida mediante cromatografía de intercambio iónico .....	49
figura 15: Secuencia de aminoácidos y dominios identificados en la base de datos UniProt .....	50

## **INDICE DE TABLAS**

Tabla 1: Colorantes de trifenilmetano y antraquinonas .....	32
Tabla 2: Actividades equivalentes de la enzima lacasa .....	47
Tabla 3: Actividades equivalentes de las enzimas lignin, manganeso y versátil peroxidasa.....	48
Tabla 4: Identificación de banda de la fracción semipurificada. ....	51



## CAPÍTULO I

### 1.1. RESUMEN

Los hongos de la pudrición blanca pueden degradar diferentes tipos de compuestos recalcitrantes y xenobióticos presentes en el medio ambiente debido a su capacidad natural para modificar los enlaces químicos de diversos componentes fenólicos de la lignina y sus derivados (Martani et al., 2017). En el 2015 se aislaron doce cepas de hongos en la Península de Yucatán, solo una de ellas demostró actividad decolorativa en diferentes tintes durante el análisis preliminar; esta cepa fue identificada mediante la amplificación de la secuencia del espaciador transcribible interno (ITS) como *Phlebia floridensis*. En el presente trabajo, se estudió el extracto enzimático extracelular de *P. floridensis*. Se realizaron ensayos más extensos en placas de medio mínimo con agar usando compuestos fenólicos y no fenólicos, colorantes de antroquinona y colorantes de trifenilmetano. Como resultado, la cepa *P. floridensis* pudo mineralizar Anilina Azul, Azul Metílico, Azul Brillante G250, Azul Brillante R250, Verde Malaquita y los siguientes sustratos: 2,6-dimetoxifenol (2,6 DMP), N, N-Dimetil -p-fenilendiamina (DMPPDA), sal de diamonio 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) y Guayacol (GUA). Por lo tanto, el extracto enzimático de *P. floridensis* mostró un perfil extremadamente versátil contra diferentes compuestos. Posteriormente, fue determinada la presencia de proteínas de 20 a 70 kDa utilizando SDS-PAGE. Después de esto, se realizó un proceso de enriquecimiento de enzimas mediante cromatografía de intercambio catiónico estableciendo que la fracción con actividad máxima se eluyó a una concentración de NaCl 0,1M. Esta fracción se analizó utilizando diferentes compuestos fenólicos y no fenólicos. El tamaño de la enzima con mayor actividad fue de aproximadamente 50kDa. La banda con actividad fue seleccionada y fue enviada para el análisis de secuenciación por LC-MS/MS. La información obtenida de la secuenciación fue comparada con diferentes bancos de proteínas y por homología se determinó que se trata de una cloroperoxidasa. Con base en estos resultados, sugerimos que esta

cepa podría ser una fuente de nuevas peroxidasas y oxidasas útiles en diferentes procesos biotecnológicos.

## 1.1. ABSTRACT

White rot fungi can degrade different types of recalcitrant and xenobiotic compounds present in the environment due to their natural ability to modify chemical bonds of various phenolic components of lignin and their derivatives (Martani, Beltrametti, Porro, Branduardi, & Lotti, 2017). Initially, twelve strains of fungi were isolated in the Yucatan Peninsula, only one of them demonstrated degradation on different dyes in preliminary screening; this strain was identified as *Phlebia floridensis* using ITS sequence analysis. In the present work, extracellular enzymatic extract of this strain of *P. floridensis* was studied. More extensive screening assays were performed on agar minimal medium plates using phenolic and non-phenolic compounds, anthroquinone dyes and triphenyl methane dyes. As a result, *P. floridensis* strain was able to mineralize Aniline Blue, Methyl Blue, Brilliant Blue G250, Brilliant Blue R250, Malachite Green and the following substrates: 2,6-dimethoxyphenol (2,6 DMP), N, N-Dimethyl-p-phenylenediamine (DMPPDA), 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) and Guaiacol (GUA). Thus, *P. floridensis* strain showed extremely versatile profile of enzymatic extract. Subsequently, we determined the presence of proteins from 20 to 70 kDa using SDS-PAGE. After this, cation exchange chromatography was carried out establishing that the fraction with maximum activity was eluted at a concentration of 0.1M NaCl. This fraction was analyzed using different phenolic and non-phenolic compounds. We detected a band of 50 kDa with oxidase activity using guaiacol as substrate. This band was sequenced using HPLC / MS and the spectra obtained were compared with different protein databanks. As a preliminary result we identified this enzyme as a chloroperoxidase. Based on these results, we suggest that this strain could be a source of new peroxidases and useful oxidases in different biotechnological processes.

## 1.2. INTRODUCCIÓN

La búsqueda de nuevas enzimas de origen fúngico es primordial para el desarrollo de nuevas tecnologías, con diversas las aplicaciones, entre las que destacan: el desarrollo de biosensores y baterías no contaminantes, la modificación de polímeros a nivel membrana, la síntesis de compuestos orgánicos y la biorremediación de ecosistemas contaminados con colorantes o pesticidas; de igual modo se ha propuesto el uso de estas enzimas en la fermentación de materiales lignocelulósicos para la obtención de biocombustibles (Coconi-Linares *et al.*, 2014; Freire, Durán, & Kubota, 2001). Estas aplicaciones requieren del estudio de peroxidasas de tipo II. Estas enzimas de origen fúngico son importantes debido a las características que poseen como son: la especificidad con diversos sustratos fenólicos recalcitrantes, el gran potencial óxido-reductor que presentan al ser activadas por el peróxido de hidrógeno y la optimización de procesos industriales debido a su baja energía de activación (Forootanfar *et al.*, 2013; Hammel, 1997; Levin, Papinutti, & Forchiassin, 2004).

Existen pocos reportes sobre el hongo *Phlebia floridensis* relacionados con la producción de enzimas ligninolíticas, un ejemplo es el elaborado por Arora, *et al.*, 2005. En el caso de este estudio *P. floridensis* fue recolectado previamente en la península de Yucatán, y en los resultados iniciales en placa ha demostrado una versatilidad enzimática en diferentes compuestos fenólicos, no fenólicos y colorantes antes no reportados, por lo tanto, el objetivo de este trabajo se caracterizará las enzimas provenientes del hongo *P. floridensis*.

## **CAPÍTULO II**

### **2.1. FUNDAMENTO TEÓRICO Y ANTECEDENTES**

#### **2.1.1. Biodiversidad de la Península de Yucatán**

La microbiota de la Península de Yucatán ha sido poco estudiada (Guzmán, 2004). Son escasos los catálogos validados en México como el de Cifuentes, 2008 en el cual se presentan 2 135 registros de especies de hongos para México, agrupados en Basidiomycota (1 486 especies en 353 géneros y 87 familias), Ascomycota (646 especies en 275 géneros y 86 familias, incluyendo líquenes), Zygomycota (2 especies) y Oomycota (1 especie). Sin embargo, se han registrado en Campeche 154 por Ancona-Méndez *et al.*, 2010 y en Yucatán con 153 por Yuridia-López *et al.*, 2011. Considerando que el conocimiento sobre las especies de hongos registradas en la Península de Yucatán aún es muy escaso, se vuelve necesario un estudio dirigido a la identificación de especies con potencial para la producción de compuestos y metabolitos de interés biotecnológico, industrial y comercial.

#### **2.1.2. Características del suelo en la Península de Yucatán**

Los suelos de Yucatán, México, muestran una amplia gama de variaciones morfológicas, debido a la diversidad de los materiales de origen y a las condiciones climáticas y topográficas de la entidad. Se han reconocido 20 zonas fisiográficas con una gran variedad de suelos, sin embargo, su conocimiento físico y químico ha sido muy general, ya que se ha considerado el espacio que ocupa como una

superficie homogénea. Yucatán se caracteriza por una diversidad edáfica, estos suelos son someros, de colores que van del rojo al negro, pasando por diversas tonalidades de café con abundante contenido de piedras y frecuentes afloramientos de coraza calcárea. Hacia el sur y oriente del estado, se encuentran suelos, libres de afloramientos rocosos y piedras. Otros suelos son los asociados geográficamente con el litoral marino, los cuales se caracterizan por ser profundos, sin rocas, de color ligeramente amarillento o grisáceo, y con textura arenosa (Duch-Gary, 1988). Además, estos suelos se caracterizan por ser alcalinos o ligeramente alcalinos, los estudios han señalado cinco tipos de suelos con un pH menor que 7, uno de ellos tuvo un pH de 5.23 y coincidió con el contenido más bajo de calcio (0.1 cmolc kg<sup>-1</sup>). Bautista-Zuñiga, *et al.*, 2004 reportan que la aplicación intensiva de fertilizantes nitrogenados, como sulfato de amonio y nitrato de amonio, genera acidez residual a través de la formación disociada de ácido sulfúrico y ácido nítrico. El pH afecta la solubilización, disponibilidad y absorción de los nutrimentos; el valor óptimo se encuentra entre 6 y 6.5, por lo que los suelos con pH mayor o menor que el óptimo pueden presentar problemas de disponibilidad de nutrimentos (Borges-Gómez, Escamilla-Bencomo, & Soria-Fregoso, 2005).

La región de Tizimín posee un suelo tipo litosol, estos son suelos delgados (espesor menor de 10 cm), descansa sobre un estrato duro y continuo, tal como roca, tepetate o caliche. La superficie sobre la cual se asienta la ciudad, al igual que la totalidad del área del municipio de Tizimín, es de tipo roca sedimentaria caliza, misma que pertenece al período inicial de la era Cenozoica.

Debido a estas características del suelo de la región de Tizimín, los hongos degradadores de lignina y de hemicelulosa desempeñan un papel sustancial en el mantenimiento de la disponibilidad de los nutrientes. Por ello se escogió la región de Tizimín para llevar a cabo el aislamiento de hongos relacionados con la degradación de la lignocelulosa ya que estos deben ser muy eficientes en los procesos de regeneración del humus y mantener la vegetación selva baja caducifolia (Ceccon, Olmsted, Vázquez-Yanes, & Campo-Alves, 2002; Duch-Gary, 1988).

Los hongos capaces de degradar la lignina son clasificados como hongos de la pudrición blanca. La lignina es una de las principales reservas de carbono y rodea el exterior de la planta para su protección, es el polímero orgánico más abundante en el planeta. Por tanto, la degradación de la lignina permite la liberación de azúcares complejos como la hemicelulosa y la celulosa que son asimilables por una mayor cantidad de especies de microorganismos. De ahí la degradación de la lignina permite la regeneración de los suelos (Prinsen, 2010).

### **2.1.3. Hongos ligninocelulósicos**

Los principales degradadores de lignina son los hongos filamentosos. Estos hongos cuentan con los sistemas enzimáticos capaces de romper los enlaces involucrados en la estructura de la lignina. Un grupo de hongos filamentosos son los basidiomicetos, estos son capaces de degradar la lignina en la tierra y son los que encabezan la lista de los principales recicladores del suelo. Las especies de este género cuentan con enzimas, tales como la lacasa y un grupo de peroxidasas (lignin

peroxidasa, versátil peroxidasa, manganeso peroxidasa), las cuales son capaces de romper grupos benceno y componentes fenólicos que constituyen a la lignina,

En la naturaleza existen una gran cantidad de hongos capaces de degradar compuestos recalcitrantes, estos hongos pueden ser clasificados dependiendo de su capacidad para mineralizar estos componentes en dos tipos, hongos de la pudrición blanca y hongos de la pudrición parda.

**A. Hongos de la pudrición blanca.** Los hongos que causan pudrición blanca cuentan con representantes de todos los grupos principales de los Basidiomicetos y de algunos de los Ascomicetos.

En el uso común, el término “*pudrición blanca*” ha servido tradicionalmente para definir formas de pudrición en las que la madera adquiere un aspecto blancuzco y se descompone la lignina, así como la celulosa y la hemicelulosa. Los índices relativos de degradación de la lignina y la celulosa, junto con otros constituyentes de la pared celular, varían (a veces de manera considerable) en función de la especie de hongo y de las condiciones que predominen en la madera (Hammel, 1997). A pesar de la gran diversidad que presenta la pudrición de madera causada por los hongos de pudrición blanca, en general se reconocen dos importantes formas de este tipo de degradación, a saber: la deslignificación selectiva y la pudrición simultánea.

**B. Hongos de la pudrición parda.** La pudrición marrón es un tipo de pudrición causada exclusivamente por hongos basidiomicetos, la mayoría pertenecientes a la familia de Poliporaceae. Resulta interesante comprobar

que, según los datos de que se dispone en la actualidad, sólo el 6% de todos los hongos de pudrición de la madera que se conocen causan pudrición marrón. Salvo unos pocos, todos están asociados a las coníferas, mientras que los hongos de pudrición blanca se asocian con los árboles de hoja ancha. La celulosa y las hemicelulosas se descomponen en el sustrato de la madera, en tanto que la lignina se conserva en una forma ligeramente modificada (Hammel, 1997). La degradación de la lignina por los hongos es llevada a cabo por enzimas con diversas capacidades de modificación de sustratos.

#### **2.1.4. El género *Phlebia***

*Phlebia* es un género heterogéneo de hongos basidiomicetos, posee alrededor de 60 especies de apariencia muy variable, pero que comparten una textura entre cerácea y gelatinosa, combinada con una densa empalizada de basidios claviformes. Tienen una superficie himenial lisa (referente a la capa de células fértiles que producen esporas), tuberculada (nudosidades que parecen tubérculos), odontoide (tiene forma de dientes). Su sistema hifal monomítico está constituido por hifas lisas, de paredes finas a gruesas, con o sin una matriz gelatinosa; cistidios (célula de gran tamaño que se encuentra en el himenio) que pueden estar presentes o ausentes; basidios estrechamente claviformes (tiene forma de clavo), dispuestos en una empalizada densa; basidiosporas de elipsoidales, de pared fina. (Prasher & Ashok, 2013).

Son hongos pertenecientes a la pudrición blanca, se han reportado diferentes enzimas ligninolíticas como lacasas, lignin peroxidasas, manganeso peroxidasas



capaces de degradar diferentes sustratos lignocelulósicos (Niku-Paavola, Karhunen, Salola, & Raunio, 1988; Vares, Kalsi, & Hatakka, 1995).

Estudios previos han indicado que el género *Phlebia* al contener varias enzimas ligninolíticas tiene la capacidad de modificar diferentes moléculas contaminantes que repercuten en los ecosistemas, algunos de estos contaminantes son en su mayoría colorantes, por lo anterior se han realizado estudios en este género para evaluar la capacidad de decoloración de tintes altamente contaminantes (Arora et al., 2005; Bajwa et al., 2002; Niku-Paavola et al., 1988; Vares, Kalsi, & Hatakka, 1995). Se ha reportado que las especies *Phlebia radiata*, *Phlebia floridensis*, *Phlebia brevispora* tienen la capacidad de modificar colorantes como verde brillante, rojo Congo, rojo de cresol, cristal violeta y naranja II (Bajwa et al., 2002).

### **2.1.5. Enzimas de los hongos ligninocelulósicos**

Los hongos de la podredumbre blanca producen cuatro grupos principales de enzimas para la degradación de la lignina: lignin peroxidasa (conocido como ligninasa; LiP; EC 1.11.1.14), manganeso peroxidasa (peroxidasa de manganeso, MnP; EC 1.11.1.13), versátil peroxidasa (VP; EC 1.11.1.16) y lacasa (EC 1.10.3.2) (Hammel, 1997; Heinfling, Martínez, Martínez, Bergbauer, & Szewzyk, 1998; Mougín, Kollmann, & Jolival, 2002; Ramachandra, Crawford, & Hertel, 1988). El proceso de degradación de la lignina se mejora con la acción cooperativa de varias enzimas accesorias, que pueden incluir glioxal oxidasa (EC1.2.3.5), arilo alcohol oxidasa (veratril alcohol oxidasa; EC 1.1.3.7), piranosa oxidasa 2-(Glucosa oxidasa-

1; EC 1.1.3.4), celobiosa / quinona oxidorreductasa (EC 1.1.5.1), y celobiosa deshidrogenasa (CE 1.1.99.18). Las enzimas oxidan sustratos en múltiples pasos de transferencias de electrones con la formación de catión radical intermedio, de forma similar a la observada en la peroxidasa de rábano (Kuwahara, Glenn, Morgan, & Gold, 1984; Wong, 2009).

### **2.1.6. Peroxidasas**

Las peroxidasas se pueden agrupar atendiendo a dos clasificaciones: la primera las divide en función de su estructura y la segunda lo hace en función de su secuencia de aminoácidos y de su capacidad para unirse con diferentes iones metálicos (Piontek, Glumoff, & Winterhalter, 1993).

Las peroxidasas se dividen en tres grandes superfamilias:

- **Superfamilia de peroxidasas animales.** Han sido caracterizadas estructuralmente la mieloperoxidasa, el eosinófilo peroxidasa y la prostaglandina sintetasa H2, entre otras. Todas ellas son enzimas formadas por varias subunidades, iguales o no.
- **Superfamilia de catalasas.** Se engloban dentro de las peroxidasas ya que poseen un grupo hemo e intervienen en la misma reacción catalítica. Todas ellas son enzimas tetraméricas, condición necesaria para que sean funcionales. Se ha caracterizado estructuralmente la catalasa de hígado de buey entre otras.
- **Superfamilia de peroxidasas de plantas.** Se divide en tres grandes grupos de acuerdo a sus características estructurales (las peroxidasas presentan

una estructura secundaria mayoritaria de  $\alpha$ -hélices, separadas por fragmentos de longitud variable (Welinder, 1992)

- **Clase I: Peroxidasas evolutivamente relacionadas con procariontas.**

Implicadas en los procesos de detoxificación de la planta (eliminación de peróxido de hidrógeno). Entre ellas cabe destacar citocromo c peroxidasa de levadura (CcP), ascorbato peroxidasa citosólica (APX) y del cloroplasto y las peroxidasas-catalasas bacterianas (BCPX). Estas peroxidasas no están glicosiladas, no tienen puentes disulfuro, ni iones  $\text{Ca}^{2+}$ , ni señales peptídicas para la secreción. El Triptófano 191 de la CcP de levadura está conservado en todas las peroxidasas de clase I. Una diferencia entre APXs y la CcP es que ésta tiene un sitio de unión metálico, ocupado por  $\text{K}^+$  y cerca del residuo de triptófano proximal. Las APXs (EC 1.11.1.11) se encuentran en el cloroplasto, solubles en el citosol, y en nódulos de las raíces de las plantas. Su pH óptimo de actividad oscila entre 7.5 y 8.0. Algunas son diméricas como la APX citosólica de guisante con 249 residuos (formada por dos monómeros unidos no covalentemente), en cambio la APX del cloroplasto de la misma planta es monomérica. Se encontraron dos isoenzimas, la hidroperoxidasa I (HPI), un tetrámero de 337 kDa con dos grupos hemo y la hidroperoxidasa II (HP II), su pH óptimo de actividad está comprendido entre 6,0 y 6,5. Se clasifican dentro de este grupo de peroxidasas y no dentro del grupo de catalasas por su alta homología con la CcP y las APXs. Las peroxidasas de plantas, hongos y levaduras, normalmente son monómeros que contienen entre 290 y 350 residuos (Wong, 2009).

- **Clase II: Peroxidasas secretadas por hongos. Implicadas en procesos de degradación de la lignina.** Entre ellas, cabe citar la LiP y la MnP de

*Phanerochaete chrysosporium* y la peroxidasa de *Coprinus cinereus* (CiP). Este grupo enzimático tiene una señal peptídica para la secreción a través del retículo endoplasmático cerca del extremo N-terminal. Poseen un 5% de carbohidratos en forma de glicanos, dos iones de calcio y cuatro puentes disulfuro altamente conservados. El residuo de Triptófano proximal presente en las peroxidasas de clase I es reemplazado por fenilalanina o leucina en las peroxidasas de clase II. Uno de los sitios de unión al  $\text{Ca}^{2+}$ , en estas peroxidasas de clase II, corresponde al sitio de unión al  $\text{K}^+$  en las APXs. La LiP presenta al menos 8 isoenzimas. El máximo de absorción de la enzima nativa se encuentra a 407 nm, su coeficiente de absorción molar a esa longitud de onda es de  $133 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , y tiene 49 residuos extras en el extremo C-terminal con respecto a la CcP. La MnP es una enzima monomérica de 46 kDa, con cuatro iones  $\text{Ca}^{2+}$  y cinco enlaces disulfuro por molécula. Los residuos ácido aspártico 179, ácido glutámico 35, ácido glutámico 39, el propionato del grupo hemo y dos moléculas de agua son los ligandos de unión al  $\text{Mg}^{+2}$ . En este grupo también se encuentra la versátil peroxidasa (VP), la cual ha sido recientemente descrita como una nueva familia de peroxidasas ligninolíticas, junto con la lignin-peroxidasa (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP). Se ha reportado producción de versátil peroxidasa por hongos de los géneros *Pleurotus*, *Bjerkandera* y *Lepista* (Welinder, 1992)

- **Clase III: Peroxidasas secretadas por plantas.** Dentro de este grupo, la enzima más ampliamente estudiada es la isoenzima c de la peroxidasa de rábano (cHRP), pero también se han estudiado enzimas de otras especies vegetales como tomate, cebada, trigo, tabaco, nabo, cacahuete, y diferentes especies de palmeras. Estructuralmente estas enzimas (EC 1.11.1.7) poseen dos iones de calcio, una señal peptídica en el extremo N-terminal para la secreción, cuatro puentes disulfuro conservados, en sitios distintos a los que aparecen en las peroxidasas de clase II, un conjunto de hélices extra que juegan un papel muy importante en el acceso al sitio activo y un grado de glicosilación comprendido entre el 0 y el 25%, algunas de ellas tienen un propéptido en el extremo C-terminal que las dirige hacia las vacuolas (Wong, 2009).

#### **2.1.6.1. Lignin Peroxidasa (EC 1.11.1.14)**

Las lignín peroxidasas (Lips) fueron las primeras enzimas lignolíticas en ser descubiertas (Glenn & Gold, 1983; Kuwahara *et al.*, 1984). Estas se encuentran en hongos de la pudrición blanca, y se han estudiado ampliamente en organismos como *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* y *Bjerkandera sp.* (Farrell, Murtagh, Tien, Mozuch, & Kirk, 1989). Este tipo de enzimas comparte la estructura del grupo prostético férrico protoporfirina IX (grupo hemo) presente en su sitio activo; normalmente en las hemo-peroxidasas, el átomo de hierro se encuentra pentacoordinado. Cuatro posiciones de coordinación son ocupadas por los átomos de nitrógeno de los anillos pirrólicos; la quinta posición se localiza en el lado

proximal (por “debajo”) del grupo hemo y es comúnmente ocupada por un nitrógeno perteneciente al anillo imidazol de un residuo de histidina; la sexta posición de coordinación en la enzima en su estado basal está vacante y se ubica en el lado distal (por “arriba”) del grupo hemo, esta cavidad distal es la región en la que ocurren muchas de las reacciones de las hemoperoxidasas.

Las LiP presentan masas moleculares de aproximadamente 40kDa, están glicosiladas y tienen puntos isoeléctricos y pH óptimos ácidos, además su ciclo catalítico es común para diversas peroxidadas. (Wong, 2009).



**Figura 1: Estructura tridimensional de la lignin peroxidasa de *P.chrysosporium*. (PDB#1lga)**

El ciclo catalítico de LiP está compuesto por tres reacciones consecutivas: involucra primeramente la reacción del sitio activo de la enzima con el peróxido de hidrógeno, para ello produce una reducción del  $H_2O_2$  a  $H_2O$  y la oxidación por dos electrones en la proteína férrica dando como resultado a un intermediario llamado compuesto

I, este intermediario posee dos equivalentes reductores, y contiene un centro oxiferril [ $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ ] y un radical  $\pi$ -cati3nico (radical localizado ya sea en el grupo hemo o en alg3un residuo de la prote3ina, dependiendo de la isoenzima); despu3s, el estado de la prote3ina denominado compuesto I, se reduce mediante un electr3n de una mol3cula de sustrato reductor (AH) dando lugar a un radical del sustrato ( $\text{A}^{\bullet}$ ) y al compuesto II, en el cual el radical cati3nico ha sido reducido a su estado nativo. Finalmente, el compuesto II es reducido con un electr3n por una segunda mol3cula de sustrato reductor (AH) hasta el estado nativo de la enzima que contiene el  $\text{Fe}^{3+}$ , esto se puede observar en las figuras 2 y 3.

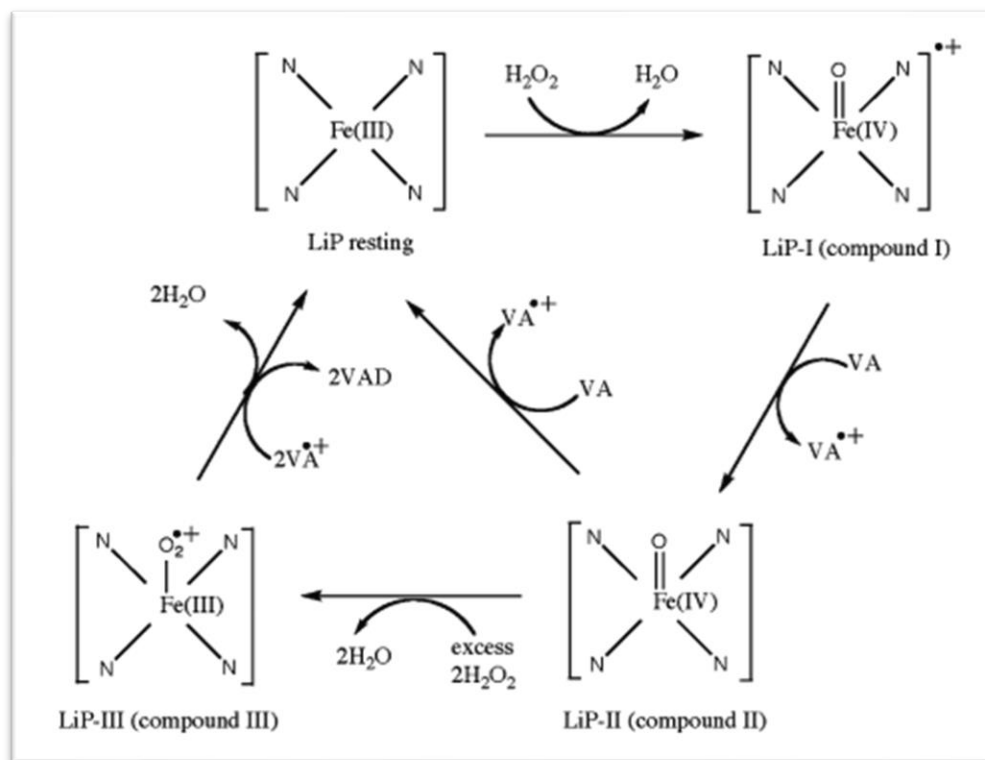
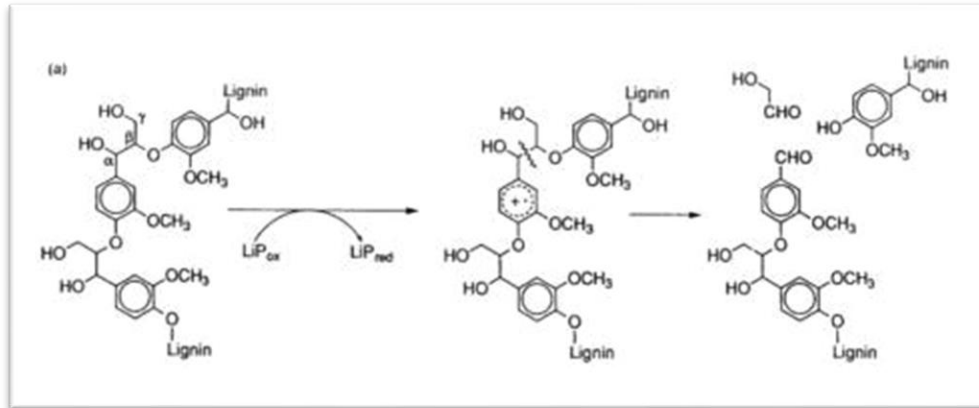


Figura 2: Ciclo catal3tico de lignina peroxidasa.



**Figura 3: Mecanismo de acción de lignin peroxidasa. La escisión interna de un compuesto no fenólico recalcitrante aril-glicerol- $\beta$ -aril éter de la lignina oxidada por la enzima lignin peroxidasa, se muestra el intermediario inestable.**

### 2.1.6.2. Manganeso Peroxidasa (EC 1.11.1.13)

Estas peroxidasas ligninolíticas se han identificado como las enzimas más abundantes en los hongos de la pudrición blanca. Estas hemo proteínas se caracterizan por ser dependientes de manganeso, por lo tanto, oxidan el  $Mn^{2+}$  a  $Mn^{3+}$  en presencia de peróxido. Son enzimas que solo actúan de manera indirecta sobre la lignina. El  $Mn^{3+}$  formado en la reacción es un fuerte oxidante, que estabilizado con ácidos di-carboxílicos secretados por el hongo (glicolato y oxalato), actúa como intermediario en la oxidación de compuestos fenólicos y no fenólicos (Hammel, 1997).





**Figura 4: Estructura tridimensional de la manganeso peroxidasa de *P.chrysosporium*. (PDB#1yyd)**

El ciclo catalítico de la MnP es semejante al de otras peroxidasas, incluidas la LiP, y transcurre a través de la formación de intermediarios. El primer producto de la reacción de la MnP nativa con el peróxido de hidrógeno es el compuesto I, la reducción del compuesto I por  $Mn^{2+}$  conduce al compuesto II que de nuevo se reduce por  $Mn^{2+}$  para generar la enzima nativa, mientras que el compuesto I puede ser reducido además del  $Mn^{2+}$  por otros donadores como los fenoles, el compuesto II de la MnP solo puede ser reducido por  $Mn^{2+}$  por lo que depende de este catión para cerrar su ciclo como se observa en la figura 5 y 6.

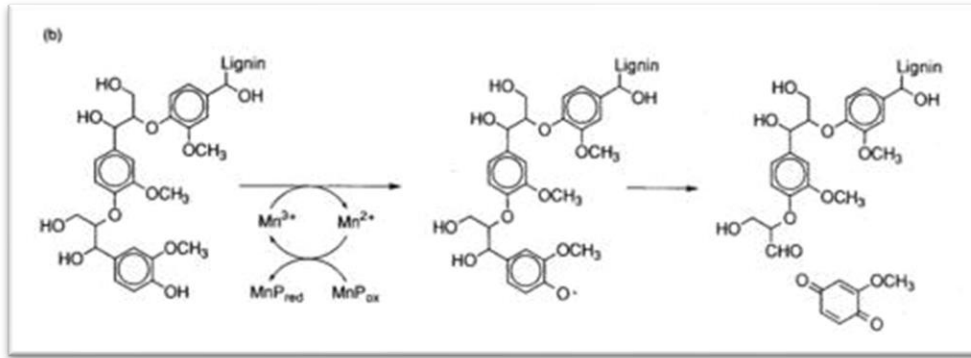


Figura 5: Mecanismo de acción de la enzima manganeso peroxidasa. Se puede observar la escisión interna de un compuesto no fenólico recalcitrante arilglicerol- $\beta$ -arileter de la lignina oxidada por la enzima manganeso peroxidasa.

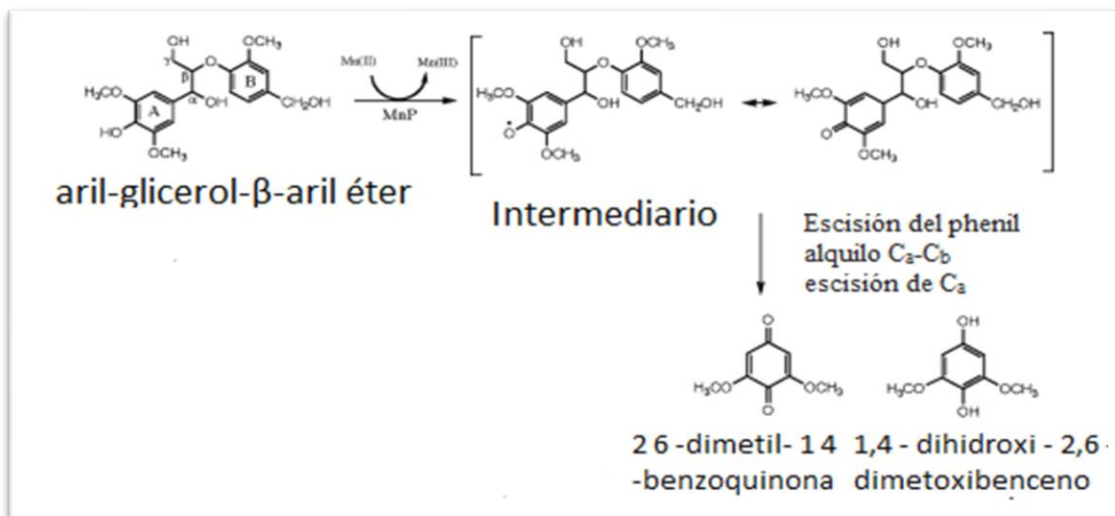


Figura 6: La oxidación catalizada por MnP del compuesto modelo aril-glicerol- $\beta$ -aril éter.

### 2.1.6.3. Versátil peroxidasa (EC 1.11.1.16)

Esta enzima se describió por primera vez en varios hongos del género *Pleurotus* y en *Bjerkandera*. La versátil peroxidasa difiere de la enzima manganeso peroxidasa y Lignin peroxidasa en que es capaz de catalizar reacciones sobre sustratos aromáticos en ausencia de  $Mn^{2+}$  (Heinfling *et al.*, 1998). Además es capaz de oxidar

al alcohol veratrílico (a veratril aldehído), dimetoxibenceno y dímeros de lignina, aunque con menor afinidad que la LiP (Coconi-Linares et al., 2014; Dashtban, Schraft, Syed, & Qin, 2010; Dávila & Vázquez-Duhalt, 2006).



**Figura 7: Estructura tridimensional de la versátil peroxidasa de *P. eryngii* (PDB#2boq).**

El ciclo catalítico de la VP combina los ciclos de la LiP y la MnP. Sus características básicas son comunes a la mayoría de las peroxidasas. El ciclo de la VP incluye la sustracción de dos electrones de la enzima en estado basal por el  $H_2O_2$  para producir un radical catiónico (Pérez-Boada *et al.*, 2002; Vares, Kalsi, Hatakka, *et al.*, 1995). Es importante mencionar que esta enzima oxida directamente hidroquinonas como 1-4 benzoquinona, la cual se usa para la fabricación de colorantes, los cuales no son oxidados eficientemente por la LiP o la MnP en

ausencia de alcohol veratrílico o  $Mn^{2+}$ , respectivamente; incluso es capaz de oxidar compuestos de alto potencial óxido-reductor, los cuales sólo son catalizados por la LiP en presencia de alcohol veratrílico (Heinfling *et al.*, 1998).

#### 2.1.6.4. Cloroperoxidasas (EC 1.11.1.10)

Las cloroperoxidasas ocupan un nicho único dentro de las hemoproteínas; éstas son catalizadoras extremadamente versátiles, debido a que presentan la función de oxigenación de haluros, la deshidrogenación y la descomposición del peróxido de hidrógeno típicas de otras clases de hemoproteínas (Griffin, 1991; Morris & Hager, 1966). Las cloroperoxidasas han sido aisladas de los caldos de fermentación producidas por el hongo *Caldariomyces fumago* y ha sido cristalizada, pero solamente la cristalografía preliminar de rayos X ha sido publicada.

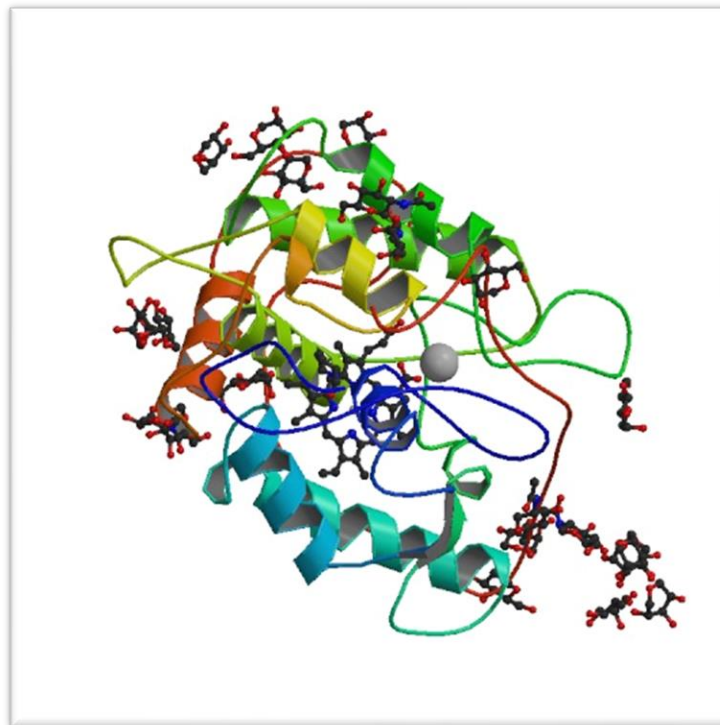


figura 8: Estructura tridimensional de la cloroperoxidasa de *Leptoxiphium fumago* (PDB#1CPO)

Dos de las tres cloroperoxidasas, que han sido reportadas, han sido caracterizadas y resultaron ser isoenzimas, ellas poseen la misma composición de aminoácidos y la actividad específica de halogenación catalítica, pero difieren en el contenido de glicanos (Morris & Hager, 1966; Sundaramoorthyl, Terrier, Poulosl, & Poulos, 1998).

La cloroperoxidasa está conformada por una subunidad monomérica con una masa molecular de 42 kDa, con un contenido de carbohidratos aproximado 19%. Dos de los residuos de asparagina de esta isoenzima fueron identificados como sitios de N-glicosilación con un alto contenido de oligosacáridos de manosa. Además, esta enzima también contiene N-acetilglucosamina, galactosa y en menor concentración xilosa y arabinosa. Las cloroperoxidasas también contienen una molécula de ferriprotoporfirina IX y son las únicas hemoproteínas del tipo haloperoxidasa que contiene  $Mn^{3+}$  (Morris & Hager, 1966).

Como se ha mencionado antes la cloroperoxidasa es la hemoproteína más versátil. Esta enzima cataliza cuatro diferentes tipos de reacciones con peróxido de hidrogeno y otros agentes peroxídicos como fuente de equivalentes oxidativos, puede realizar halogenaciones de compuestos orgánicos con cloro, iodo y bromo como la fuente de halógenos, deshidrogenación, descomposición del peróxido de hidrogeno y transferencia de oxígeno hacia compuestos orgánicos e inorgánicos (Sundaramoorthyl *et al.*, 1998).

Las cuatro diferentes reacciones que pueden llevar a cabo las cloroperoxidasas son halogenación, deshidrogenación, descomposición del peróxido de hidrogeno e inserción de oxígeno.

Debido a ello es de suma importancia encontrar hongos capaces de producir diferentes enzimas que puedan degradar los compuestos más recalcitrantes como los son los pesticidas y los colorantes industriales. Así mismo estas enzimas pueden llevar a cabo la modificación de compuestos fenólicos de gran utilidad en la farmacología, el desarrollo de biosensores y la degradación de lignina para la generación de biocombustibles.

En este trabajo se optó por el empleo de colorantes de trifenilmetano y colorantes antraquinónicos, esto fue para observar la versatilidad de las enzimas del hongo *P. floridensis* contra diferentes tipos de colorantes, dando lugar a su modificación o degradación. Una estrategia prometedora es el uso de microorganismos que poseen la capacidad de decolorar tintes sintéticos, incluyendo hongos de la pudrición blanca y cepas bacterianas (Chagas & Durrant, 2001; Robinson, McMullan, Marchant, & Nigam, 2001; Stolz, 2001). La decoloración y degradación microbiana es una alternativa ecológica y rentable para procesos de descomposición y para el tratamiento de efluentes industriales (Verma & Madamwar, 2003).

### 2.1.1. Colorantes sintéticos

Los colorantes sintéticos son ampliamente utilizados en la industria textil, cosmética, de impresión, drogas, alimentos y también utilizados en los laboratorios de investigación (Padamavathy, Sandhya, Swaminathan, Subrahmanyam, & Kaul, 2003). El tratamiento deficiente de los residuos de las industrias de colorantes lleva a la contaminación del medio ambiente por medio de tintes, con especial impacto sobre suelos y cuerpos de agua naturales (Pearce, Lloyd, & Guthrie, 2003). La producción de colorantes y pigmentos en todo el mundo asciende a más de 700,000 toneladas anuales. Tan solo en la India se produce una cantidad cercana a las 80,000 toneladas (Robinson et al., 2001). Se ha reportado que se fabrican más de 10,000 tipos diferentes de tintes y pigmentos en todo el mundo (Zollinger, 2003). Estos colorantes son químicos, fotolíticamente y biológicamente estables de naturaleza altamente recalcitrante. Los tintes sintéticos contienen grupos cromóforos como azo, antraquinona, trifenilmetano, etc., y grupos reactivos, como vinilsulfona, clorotriazina, tricloropirimidina (Husain, 2006). Los tintes azo, son la clase más amplia de colorantes sintéticos solubles en agua con una mayor variedad de colores y estructuras. Son generalmente resistentes a la biodegradación aeróbica. La mayoría de estos tintes no son tóxicos por sí mismos, pero después de su liberación en entornos acuáticos pueden ser convertidos en aminas cancerígenas (Chung & Stevens, 1993; Spadaro & Renganathan, 1994).

Por todo lo anterior es importante caracterizar diferentes oxidorreductasas provenientes de hongos lignocelulósicos, como *P. floridensis*. Este organismo ha sido poco estudiado y se considera que tiene enzimas con posible aplicación

biotecnológica, especialmente en la modificación/detoxificación de compuestos altamente recalcitrantes.

## **2.2. OBJETIVOS**

### **2.2.1. Objetivo general**

- Caracterizar e identificar enzimas extracelulares con potencial oxidoreductorio presentes en el secretoma de *P. floridensis* nativo de la península de Yucatán.

### **2.2.2. Objetivos específicos**

- Establecer el perfil electroforético de las proteínas de *P. floridensis* secretadas bajo diferentes condiciones de pH en el medio de cultivo.
- Realizar un enriquecimiento y purificación parcial de las enzimas extracelulares de *P. floridensis* con capacidad de degradación de colorantes
- Evaluar las actividades de peroxidasas y oxidasas de las fracciones obtenidas del extracto proteico de *P. floridensis*.
- Identificar enzimas extracelulares presentes en el secretoma de *P. floridensis*.



## **CAPITULO III MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1.1. Material biológico**

Se utilizó una cepa *Phlebia floridensis*, recolectada en el municipio de Tizimín, Yucatán e identificada en el laboratorio de microbiología aplicada y molecular del instituto tecnológico de Mérida, Yucatán. Se utilizó la cepa de *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24275 como control para las pruebas de actividad. La cepa *P. floridensis* fue identificada mediante la amplificación de la región ITS con los iniciadores ITS1-F e ITS4-R y validada en la base de datos del GenBank. Se realizaron tres ensayos independientes de identificación para corroborar la secuencia ITS generada (anexo 1).

### **3.1.2. Formulación del medio de cultivo y parámetros de incubación.**

Se utilizó el medio mínimo descrito por (Hill & Kafer, 2001). Se utilizó la fórmula descrita en el apéndice (1) para su preparación. Se inoculó el hongo en el medio líquido y se incubó durante 6 días a una temperatura de 30°C sin agitación.

### **3.1.3. Actividad en placa lacasa**

La actividad de lacasa se determinó en *P. floridensis* a través de la reacción con ABTS en medio mínimo (M.M.) en placas Petri según el método de Pointing, 1999. El medio de cultivo se complementó con 1 g L<sup>-1</sup> de ABTS después de la esterilización y 18 g L<sup>-1</sup> de agar y se esterilizó en autoclave a 121°C por 20 minutos. Se inocularon

con una pieza de agar (10 mm de diámetro) cubierto con micelio fresco previamente inoculado y se incubaron durante 14 días a una temperatura de 30°C.

#### **3.1.4. Ensayos de dependencia de peróxido**

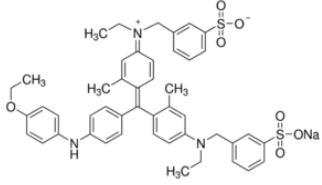
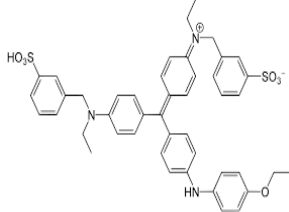
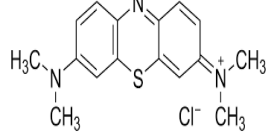
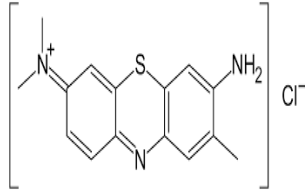
Para determinar si las enzimas producidas por *P. floridensis* eran dependientes de peróxido de hidrógeno. Se inoculó *P. floridensis* en cajas de medio mínimo las cuales se incubaron a 30°C hasta que el diámetro del micelio alcanzara 2cm. Los ensayos se realizaron utilizando 3 diferentes sustratos 1mM 2,6 Dimetoxifenol (DMP), 2mM guaiacol (GUA) y 20mM N,N dimetil-p- fenildiamina(DMPPDA), se adicionó 0.1mM peróxido de hidrogeno para observar los posibles cambios de coloración en los sustratos y 10 unidades de catalasa/L para eliminar cualquier residuo de peróxido endógeno. Se prepararon las soluciones de los sustratos con los dos diferentes tipos de tratamientos y se adicionaron 5 mL a las cajas Petri con *P. floridensis* previamente incubado, se incubaron 5 minutos a una temperatura ambiente y se decantó la solución, esperando un cambio de coloración en las cajas Petri.

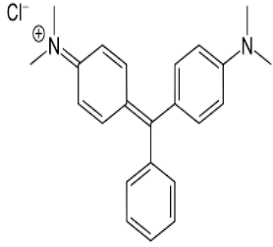
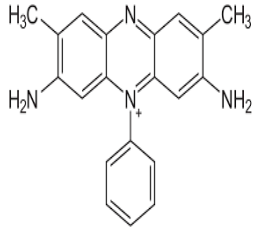
#### **3.1.5. Ensayo de versatilidad enzimática de *P. floridensis* en presencia de diferentes colorantes**

Se utilizaron colorantes de trifenilmetano y antraquinónicos para observar la capacidad del hongo para metabolizar los diversos colorantes. Se realizó esta determinación utilizando azul de anilina, azul de Coomassie G250, verde de

malaquita, azul de Coomassie R250 (trifenilmetanos), azul de metileno y safranina (antraquinonas). El medio de cultivo se complementó con 2 g L<sup>-1</sup> de cada colorante y 18 g L<sup>-1</sup> de agar y se esterilizó en autoclave a 121°C por 20 minutos. Se inocularon con una pieza de agar (10 mm de diámetro) cubierto con micelio fresco previamente inoculado y se incubaron durante 14 días a 30°C. Los colorantes usados en este trabajo son del tipo trifenilmetano, antraquinona y azo, como se puede observar en la siguiente tabla

**Tabla 1: Colorantes de trifenilmetano y antraquinonas**

Nombre	Tipo	Estructura
Azul de Coomassie G250	Trifenilmetano	
Azul de Coomassie R250	Trifenilmetano	
Azul de metileno	Antraquinona	
Azul de anilina	Antraquinona	

Verde de malaquita	Trifenilmetano	
Safranina	Antroquinona	

### 3.1.6. Extracción de proteínas de *P. floridensis*

Primeramente, se separó el micelio del medio del cultivo mediante filtración. Se descartó el micelio, mientras que el medio de cultivo se concentró mediante ultrafiltración, utilizando concentradores Amicon Ultra-15 (3kDa MWCO), centrifugando a 5,000rpm en lapsos de 10 min. Se realizó una segunda concentración del extracto enzimático utilizando Amicon Ultra-0.5 mL (3kDa MWCO), centrifugando a 12,000 rpm en lapsos de 10min. El extracto enzimático concentrado se almaceno a 4°C hasta su uso.

### **3.1.7. Determinación de la concentración proteica**

Se determinó la concentración de proteína en el extracto proteico de *P. floridensis* mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando albumina de suero bovino (ASB) (Sigma-Aldrich) como estándar. La curva patrón se realizó evaluando concentraciones de 1, 3, 5, 10, 15 y 20 µg/mL. Para los ensayos se usaron tubos con un volumen de 5 mL, consistiendo en 1, 3, 5, 10, 15 y 20 µL de muestra previamente desnaturalizada a una temperatura de 95°C durante 10 minutos, 99, 97, 95, 90, 85 y 80 µL de agua destilada respectivamente para cada concentración y 900 µL del reactivo de Bradford; el blanco se realizó sin la adición de la muestra a evaluar (100 µL de agua destilada y 900 µL del reactivo de Bradford). Posteriormente los tubos se incubaron por 10 min en obscuridad y se leyó a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro. El ensayo fue evaluado por triplicado.

### **3.1.8. Determinación del perfil electroforético de *P. floridensis***

Primeramente, se tomaron 0.65 µg/µl del extracto enzimático de *P. floridensis* y se le agregó 3µl de buffer de carga desnaturalizante (0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8; 2% SDS, 5% 2-mercaptoetanol, 10% glicerol, y 0.002% de azul de bromofenol) luego se procedió a una desnaturalización física la cual consiste en un tratamiento térmico a 95°C por 5 minutos. Una vez finalizado el tratamiento térmico, se procedió a cargar la muestra en un sistema electroforético discontinuo SDS-PAGE, el cual consiste en 2 geles con diferente concentración de acrilamida, y por ende, con diferente tamaño

de poro (Gel concentrador con 4% de acrilamida/Bis-acrilamida y separador con 12% de acrilamida/bis-acrilamida). La electroforesis se realizó a 100 V por 90 minutos. Una vez finalizada la corrida, se procedió a teñir el gel con azul de Coomassie (0.2% de Azul de Coomassie R-250, 10% ácido acético, 45% metanol) por aproximadamente 40 minutos en agitación constante. (Laemmli, 1970).

### **3.1.9. Zimograma del extracto proteico de *P. floridensis***

Se realizó un zimograma en el cual se cargó una concentración del extracto proteico de *P. floridensis* de 0.65  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y 1.30  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (geles de acrilamida/bis-acrilamida de diferente tamaño de poro 4% y 12%). Se determinó la actividad peroxidasa mediante la tinción de los geles con 20mM guaiacol en un buffer de acetatos 50mM pH3.6 y peróxido de hidrogeno al 0.03%. Se incubó durante 30 minutos para observar alguna banda con actividad, de acuerdo a lo reportado por (López-Castillo *et al.*, 2015).

### **3.1.10. Enriquecimiento y semi-purificación de peroxidasas**

Se utilizó una estrategia de enriquecimiento y semi-purificación basada en cromatografía de intercambio iónico, utilizando columnas HiTrap® Q HP para el paso de intercambio aniónico y HiTrap® SP HP para el paso de intercambio catiónico. Se cargó el extracto crudo se cargó una concentración de 65  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Se utilizó un gradiente de 0.1M-1M de NaCl para eluir el extracto proteico en diferentes fracciones. Las fracciones que mostraron actividad de peroxidasa fueron lavadas con agua estéril para disminuir la concentración de NaCl. Las proteínas, se

concentraron mediante ultrafiltración, utilizando concentradores Amicon Ultra-15 (3kDa MWCO), centrifugando a 5,000rpm en lapsos de 10 min. Las fracciones enriquecidas fueron almacenadas a 4°C hasta su uso.

### **3.1.11. Determinación de la actividad enzimática de lacasas y peroxidasas**

Los ensayos para determinar la actividad de la lacasa se evaluaron mediante el monitoreo de la oxidación de tres sustratos: 2,2-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) a 420 nm ( $\epsilon = 36,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), DMP a 469 nm ( $\epsilon = 27,500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) y GUA a 465 nm ( $\epsilon = 12,100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (Mougin *et al.*, 2002). La mezcla de reacción contenía ya sea 1 mM ABTS, 1 mM DMP o 2 mM GUA, (según el tipo de actividad enzimática a evaluar), 10  $\mu\text{l}$  del concentrado de proteínas extracelulares y 100 mM de buffer de citrato-fosfato (pH 3.0). Los ensayos se realizaron en presencia de 10 U/mL de catalasa (Sigma) para asegurar la ausencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en los extractos proteicos. La actividad de la MnP se midió a través de la formación del complejo  $\text{Mn}^{3+}$ - malonato dependiente de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 270 nm ( $\epsilon = 11,590 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (Wariishi, Valli, & Gold, 1992). La reacción contenía 0.5 mM  $\text{MnSO}_4$ , 10  $\mu\text{l}$  del concentrado de proteínas extracelulares, 50 mM buffer de malonato (pH 4.5), y 0.1 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La actividad de la LiP fue determinada por la medición de la oxidación del alcohol veratrílico (VA) a veratril aldehído a 310 nm ( $\epsilon = 9300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (Farrell *et al.*, 1989). La mezcla de reacción contenía 2 mM VA, 10  $\mu\text{l}$  del concentrado de proteínas extracelulares, y 0.4 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$

disuelto en 50 mM de buffer de ácido tartárico (pH 3.0). La actividad de la VP se midió mediante el monitoreo de la oxidación de 1 mM DMP en 469 nm ( $\epsilon = 27,500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (Pérez-Boada *et al.*, 2002). La mezcla de ensayo contenía 1 mM DMP y 10  $\mu\text{l}$  del concentrado de proteínas extracelulares disuelto en 100 mM de buffer de tartrato de sodio (pH 3.5). La reacción se inició con la adición de 0.1 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En todos los experimentos el cambio de absorbancia fue monitoreada en un espectrofotómetro UV/visible a la longitud de onda correspondiente. La cantidad de enzima que convierte 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto se definió como una unidad de actividad enzimática.

### **3.1.12. Caracterización de componentes del extracto proteico extracelular del hongo *P. floridensis***

Todos los experimentos se realizaron en un nano Acquity nanoflow, sistema de cromatografía de líquidos (UPLC) (Waters, Milford, MA, EE. UU.), acoplado a un espectrofotómetro de masas con trampa de iones lineal LTQ Velos (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemania), equipado con una fuente de iones nano electrospray. Para la digestión en gel de las bandas de proteínas, el protocolo de Shevchenko, 1996, 2006, se modificó ligeramente, tal como describe López-Castillo *et al.*, partiendo de las bandas obtenidas en el SDS-PAGE que mostraron actividad de peroxidasa tras la tinción con guayacol. Estas bandas fueron cortadas del gel con un tamaño aproximado de 1 mm de ancho y picadas en cubos. Los cubos se transfirieron a viales y se lavaron con una solución 1:1 (v/v) de bicarbonato de



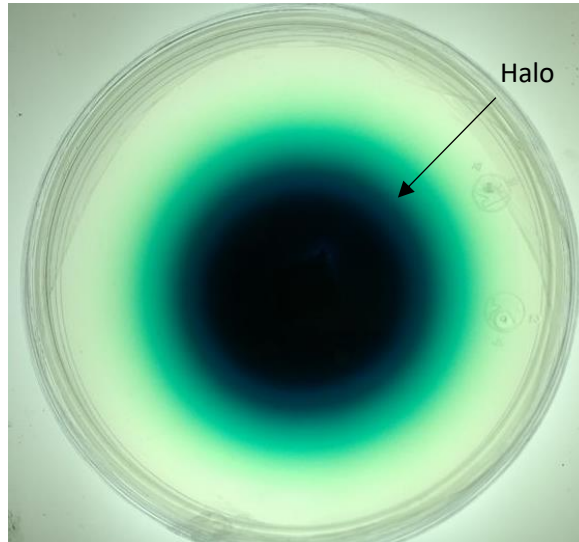
amonio 125 mM y acetonitrilo (ACN) hasta decoloración completa. Los pasos de reducción y alquilación se realizaron por incubación con DTT 10 mM e IAA 55 mM. Las piezas de gel se enjuagaron con ACN, luego las piezas de gel encogidas se secaron en una centrifuga de vacío. Para la digestión de proteínas, las piezas secas de gel se rehidrataron en una solución 50 mM de bicarbonato de amonio que contiene 10 ng/L de tripsina (PROMEGA, Madison, WI, EE. UU.) Y se incubaron durante la noche a 37°C. Después de la digestión trípica, los péptidos se pudieron extraer agitando por 15 minutos con una solución 1:2 (v/v) de 5% de ácido fórmico / ACN a 37°C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se secó en una centrifuga de vacío, antes del análisis de LC-MS / MS, los péptidos se disolvieron en 20 µL de ácido fórmico al 0,1% (v / v) (López-Castillo *et al.*, 2015).

## **CAPITULO IV**

### **4.1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **4.1.1. Ensayo de la actividad en placa de la enzima lacasa de *P. floricida***

En la figura 9 se observa un halo de coloración verde oscuro, lo cual indica que el sustrato ABTS está siendo oxidado por *P. floricida*, sugiriendo la presencia de la enzima lacasa. En el año 2011 Tapia-Tussell y colaboradores demostraron que *Trametes hirsuta* es capaz de oxidar el compuesto ABTS y generar un halo de coloración similar al mostrado en la figura 9, con el cual reportaban una producción extracelular de la enzima lacasa.

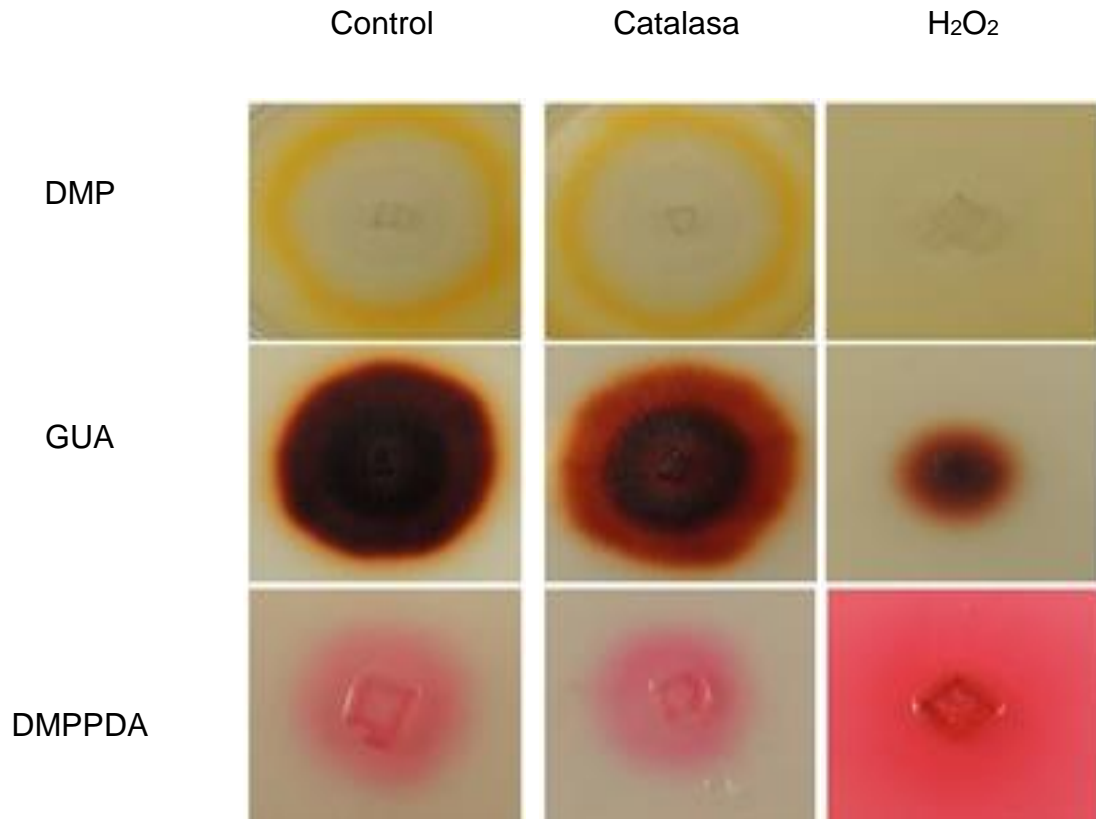


**Figura 9: Ensayo en placa (ABTS). Se puede observar un halo de color verde oscuro lo que indica que *P. floridensis* está secretando alguna lacasa que interactúa con el reactivo ABTS.**

#### **4.1.2. Determinación de la dependencia de peróxido de hidrogeno**

En la figura 10 se observan diferentes actividades, en las cuales los sustratos guayacol y 2,6 dimetoxifenol fueron polimerizados a tetraguayacol (coloración café) y 3,3',5,5' Tetrametoxibifenol-4,4'-diol (coloración amarilla) respectivamente y el compuesto N, N dimetil-p-fenildiamina cambia a color rosado al sufrir una oxidación. En el tratamiento con peróxido se observó una mayor actividad en la oxidación del compuesto N, N dimetil-p-fenildiamina, sin embargo, en el tratamiento con catalasa se mostró una actividad similar al control, esto indica que hay presencia de enzimas tanto dependientes e independientes de peróxido de hidrógeno. Existen reportes en los que se evaluó la oxidación de estos compuestos como el realizado por Coconi Linares y colaboradores en 2015, quien evaluó la cepa de *Phanerochaete chrysosporium*, la cual no pudo polimerizar los sustratos guaiacol, 2,6 dimetoxifenol

ni oxidar el compuesto N, N dimetil-p-fenildiamina; sin embargo, la cepa modificada genéticamente pudo polimerizar estos sustratos.



**Figura 10: Evaluación de la dependencia de peróxido de hidrogeno en *P. floridensis*.** En la figura se puede observar un mayor cambio de coloración en el control para los reactivos guaiacol y DMP, lo que indica que *P. floridensis* tiene la capacidad de modificar estos sustratos, el tratamiento con catalasa se puede observar un cambio de coloración en los reactivos guayacol y DMP lo que indica que existen enzimas extracelulares no dependientes de peróxido capaces de interactuar con los reactivos y en el tratamiento con peróxido de hidrogeno se observa una mayor actividad en el reactivo DMPPDA lo que indica que alguna

enzima extracelular es dependiente de peróxido de hidrogeno para poder modificar este reactivo.

#### **4.1.3. Ensayo de la versatilidad enzimática de *P. floridensis* con diferentes colorantes**

En la figura 11 se observa la actividad de *P. floridensis* y *P. chrysosporium* sobre diferentes colorantes antraquinónicos y trifenilmetanos. Los colorantes susceptibles a decoloración por *P. floridensis* fueron: el azul de anilina, azul de coomassie G250, azul de Coomassie R250, además, en los colorantes verde de malaquita y azul de metileno el hongo ocasionó un cambio de coloración. Por lo tanto, se sugiere la presencia de enzimas en *P. floridensis* capaces de reconocer diferentes familias colorantes y ocasionar su decoloración. Arora y colaboradores en 2004 reportaron que *P. floridensis* tiene actividad de decolorar al 100% tintes del tipo trifenilmetano, azoico y ftalocianina, en el sexto día de incubación. También, en el 2002 Gill y colaboradores reportaron la actividad de decoloración de *P. floridensis* contra colorantes antraquinónicos y trifenilmetanos, como el verde brillante y el naranja II los cuales tuvieron un porcentaje de decoloración del 100%, mientras que, el rojo congo y el cristal violeta se decoloraron un 95%.

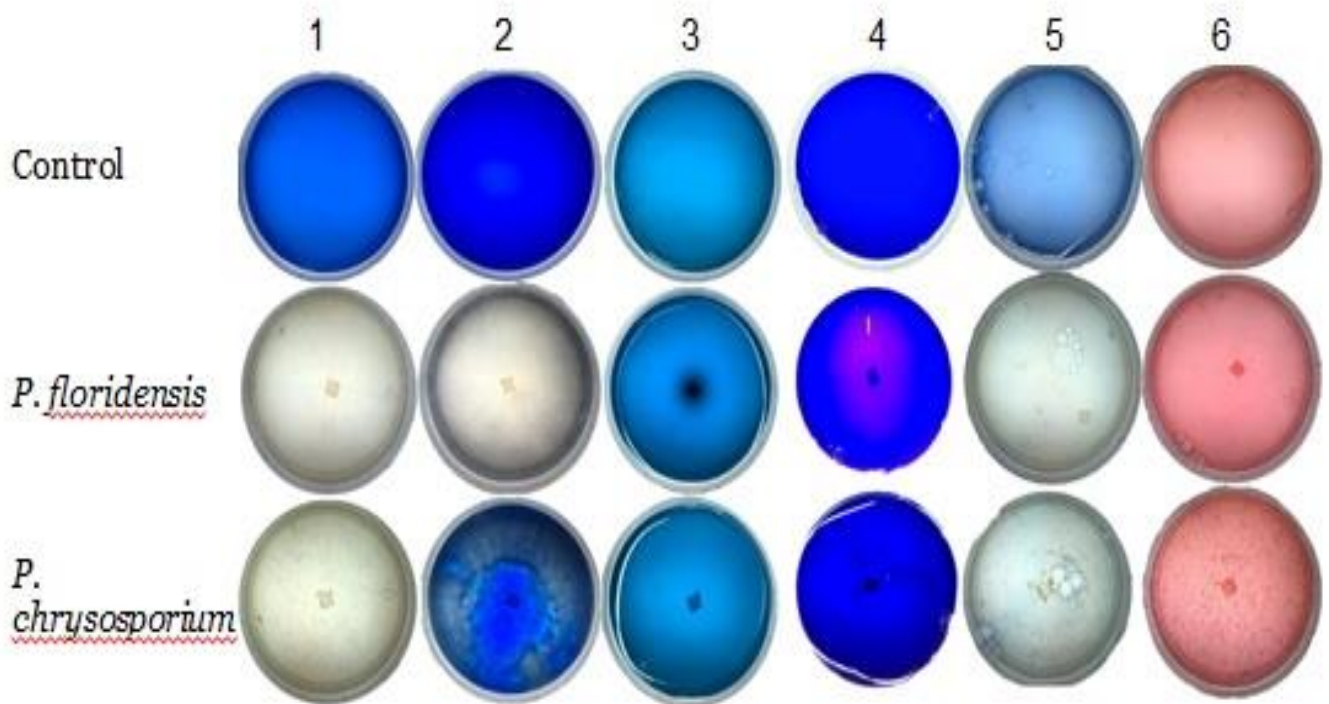
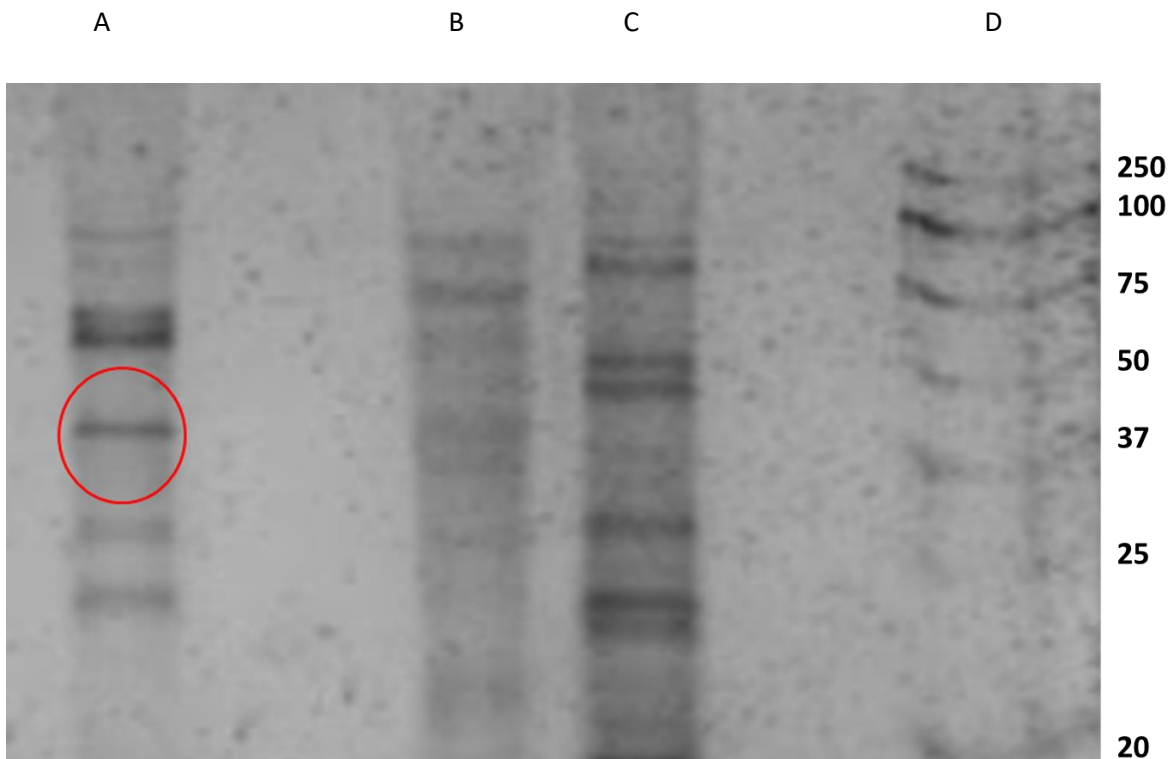


Figura 11: Evaluación de la actividad de *P. floridensis* y *P. chrysosporium* contra diferentes colorantes. 1) Azul de anilina 2) Azul de Coomassie G250, 3) Verde de malaquita, 4) Azul de metileno, 5) Azul de Coomassie R250 y 6) Safranina. En la imagen se puede observar la decoloración del tinte Azul de anilina, Azul de Coomassie G250 y Azul de Coomassie R250 por el hongo *P. floridensis*, lo cual sugiere la presencia de enzimas extracelulares capaces de reconocer la estructura de estos colorantes e iniciar su decoloración, estos resultados fueron comparados con el hongo *P. chrysosporium* debido a que es el hongo con más reportes de decoloración de tintes, el cual, no pudo decolorar el tinte azul de Coomassie G250, lo que se sugiere que *P. floridensis* tiene enzimas extracelulares capaces de degradar el azul de coomassie G250.

#### **4.1.4. Perfil electroforético del extracto proteico de *P. floridensis***

En la figura 12 se determinó que el extracto proteico obtenido a pH 3 de *P. floridensis* tiene mejor producción de enzimas sugiriéndose que el estrés generado por la acidez del medio de cultivo induce la producción de proteínas extracelulares. En dicha figura 12 se observan los diferentes perfiles electroforéticos de las enzimas extracelulares secretadas a pH 3, 5 y 7. En el extracto proteico a pH 3 se pueden observar 7 bandas con diferentes tamaños, señalándose una banda con un peso de 45kDa. En el pH 5 se observan 5 bandas integras de diferente peso molecular, mientras que en el pH 7 se pueden observar 8 bandas diferentes, con lo cual se sugiere que las proteínas observadas en los tres perfiles electroforéticos se expresan de forma diferencial debido al pH del medio de cultivo. Se han reportado diferentes tamaños de enzimas ligninolíticas como la lacasa de *Trametes hirsuta*, con un tamaño aproximado de 65 kDa reportada por Zapata-Castillo y colaboradores en 2012, en el trabajo de Vares y colaboradores en 1995 se reporta la presencia de lignin peroxidasa con un tamaño aproximado de 46 kDa, manganeso peroxidasa con un tamaño aproximado de 50 kDa y lacasa con un tamaño aproximado de 64 kDa en el hongo *Phlebia radiata*.



**Figura 12: Perfil electroforético del extracto de *P. floridensis*. A) pH3, B) pH5, C) pH7 y D) Marcador de peso molecular. En la figura se puede observar diferentes perfiles debido a los diferentes pH de los medios de cultivo, se sugiere que el pH esta induciendo o reprimiendo la síntesis de diferentes proteínas para la supervivencia al medio ácido. Se señala una banda con un peso aproximado de 45 kDa debido a que esta banda se observa en los siguientes zimogramas.**

#### **4.1.5. Enriquecimiento y semi-purificación del extracto enzimático de *P. floridensis***

Se realizó un enriquecimiento y semi-purificación de los extractos enzimático a pH 3 y a pH 5 de *P. floridensis*. Mediante la cromatografía de intercambio iónico. Se obtuvieron tres fracciones activas (0.1M, 0.5M y 1M) del extracto a pH3, en la fracción 0.1M se observan tres bandas con un peso aproximado de 70kDa, 67kDa y 45kDa aproximadamente, en las fracciones 0.5M y 1M se observa un barrido en los carriles 7 y 8, se sugiere que el barrido es debido a enzimas que tienen actividad con la solución de tinte del gel, el principal tinte utilizado en esta solución es el azul de Coomassie, como se demostró anteriormente el hongo *P. floridensis* tiene la capacidad de decolorar este tinte, este barrido se observa en la Figura 13. La elución de 3 proteínas con la concentración de 0.1M de NaCl en la columna de intercambio aniónico sugiere que son proteínas con carga negativa.



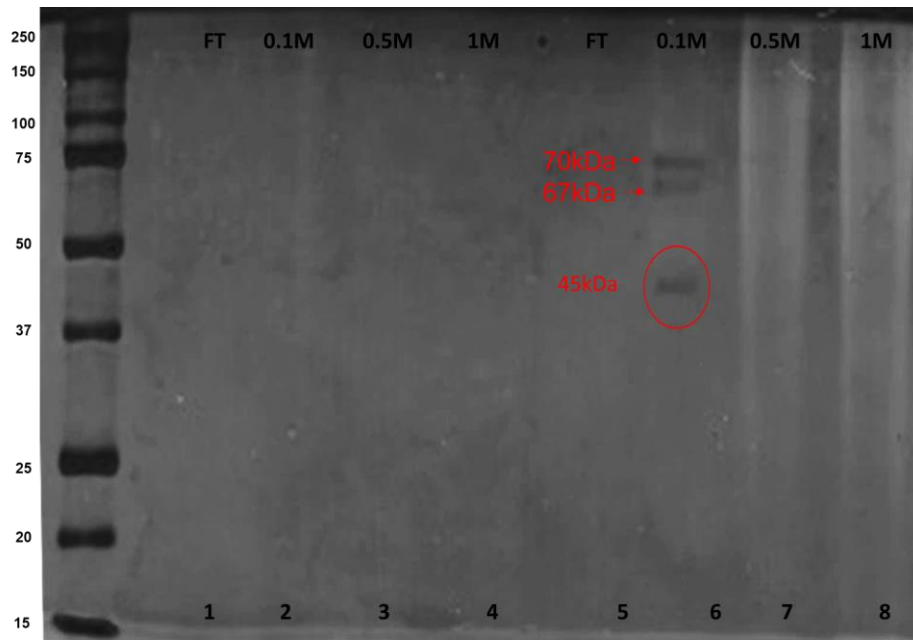


Figura 13: Perfil electroforético de la separación por intercambio iónico del extracto a pH3. Marcador de peso molecular, 1) recuperado de la columna de intercambio catiónico 2) fracción 0.1M, 3) fracción 0.5M. 4) fracción 1M, 5) recuperado de la columna de intercambio aniónico, 6) 0.1M, 7) 0.5M y 8) 1M. En la figura se puede observar la cromatografía de intercambio iónico, la muestra fue evaluada mediante dos columnas de intercambio aniónico y catiónico, se puede observar que las proteínas del extracto proteico del *P. floridensis* se quedaron en la columna de intercambio aniónico, en los carriles 6, 7 y 8, se pueden observar 3 bandas de diferente peso molecular en la fracción 0.1M de NaCl, en las fracciones de 0.5M de NaCl y 1M de NaCl se puede observar un barrido, lo cual sugiere la presencia de enzimas con la capacidad de degradar el colorante azul de Coomassie.

#### 4.1.6. Determinación de las actividades enzimáticas volumétricas de las lacasas y peroxidadas

Se evaluó las diferentes actividades con cada una de las fracciones obtenidas (0.1M y 0.5M y con el extracto proteico a pH3 (E.P.). Dichos resultados se muestran en las tablas 2 y 3. El extracto proteico presenta actividades como las reportadas por Arora et al., 2005 las cuales son lacasa, manganeso peroxidasa, lignin peroxidasa y versátil peroxidasa, esto sugiere la presencia de cada una de estas enzimas o bien de enzimas que poseen estos tipos de actividad. La mayor actividad que se obtuvo en este trabajo fue la enzima manganeso peroxidasa con  $1544 \text{ UL}^{-1}$ . La fracción 0.1MQ demostró tener mayor actividad lacasa con  $861 \text{ UL}^{-1}$ , mientras que la fracción 0.5MQ demostró tener mayor actividad de lignin peroxidasa con  $403 \text{ UL}^{-1}$ .

**Tabla 2: Actividades equivalentes de la enzima lacasa**

<b>Muestra</b>	<b>(ABTS) <math>\text{UL}^{-1}</math></b>	<b>(GUA) <math>\text{UL}^{-1}</math></b>
Extracto proteico	333.33	413.22
0.1M	861.11	330.57
0.5M	263.88	0

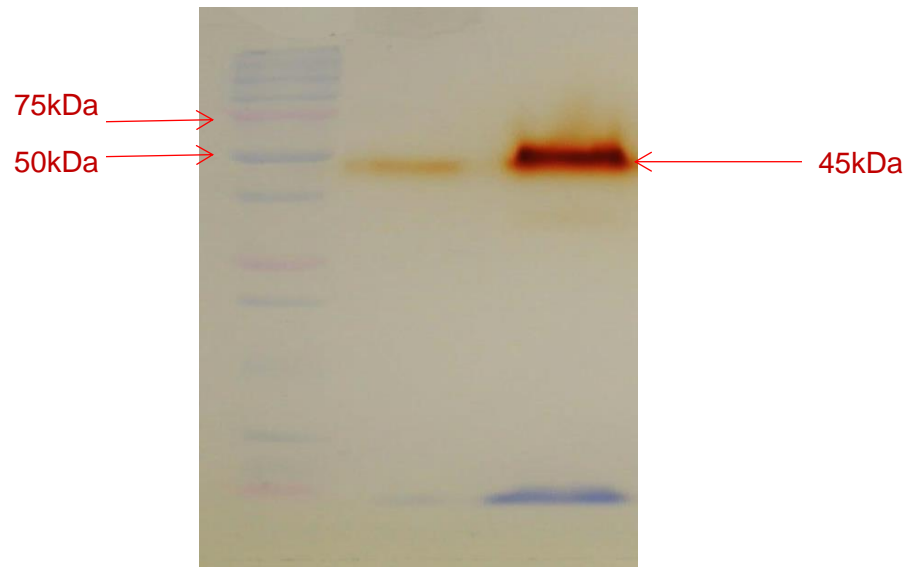
Daljit Singh y colaboradores en 2002 realizaron una evaluación del extracto enzimático del hongo *P. floricola* inoculado en un medio de cultivo a base de paja de trigo, obteniendo las siguientes actividades, lignin peroxidasa 500UL<sup>-1</sup> manganeso peroxidasa 950 UL<sup>-1</sup> y lacasa 6720UL<sup>-1</sup>, se reporta que *Aspergillus heteromorphus* tiene una actividad volumétrica para lacasa de 4900 UL<sup>-1</sup> (Lianhui Zhang, Tipeng Wang, Shunshan Jiao, Changchun Hao, & Zhihui Mao, 2007), también se ha reportado la actividad volumétrica para la enzima lacasa del hongo *Trametes versicolor* con un valor de 1322 UL<sup>-1</sup> (Haibo, Yinglong, Feng, Peiji, & Jiachuan, 2009). En este trabajo se reportan las actividades volumétricas de dos clases diferentes de enzimas, las polifenol oxidasas y las peroxidases, las actividades volumétricas obtenidas pueden sugerir la presencia de estas enzimas.

**Tabla 3: Actividades equivalentes de las enzimas lignin, manganeso y versátil peroxidasa**

<b>Muestra</b>	<b>Lignin peroxidasa UL<sup>-1</sup></b>	<b>Manganeso peroxidasa UL<sup>-1</sup></b>	<b>Versátil peroxidasa UL<sup>-1</sup></b>
Extracto proteico	349.46	1544.43	54.54
0.1M	268.81	215.70	72.72
0.5M	403.22	129.42	90.90

#### 4.1.7. Identificación de las proteínas presentes en el extracto proteico de *P. floridensis*

La figura 14 muestra el zimograma realizado con guayacol. Se observa 1 banda de color naranja con un tamaño 45kDa aproximadamente. La banda de mayor intensidad fue cortada para su identificación mediante espectrometría de masas (LC-MS/MS).



**Figura 14: Zimograma de la fracción 0.1M. Se observa una banda con un tamaño aproximado de 45kDa.**

En la tabla 4 se puede observar el análisis de la banda, este indica 4 proteínas diferentes, de las cuales 3 son del tipo peroxidasa, (B2BF37, A0A1U7L463 y A0A1U7L4V2), siendo la ultima la que coincide con el peso molecular aproximado en el zimograma y la que obtuvo mayor cobertura de secuencia. En la figura 15 se puede observar la secuencia de aminoácidos reportada en la base de datos UniProt y los dominios reportados en la base de datos de InterPro.

```

      10      20      30      40      50
MSDIPVHQHS DGRCPVTGIS GSNPHPCPP QPGDTRAPCP ALNTMANHGY
      60      70      80      90     100
LPRDGKALTA EIIIDALIKC YKLSKPLAWL LTHGALFLLD QGGKELCLSD
      110     120     130     140     150
LARHNGVEHN ASLYHPDAGY REEYAPIHGD EEMLREFFED SKDGLVMNTI
      160     170     180     190     200
DVSRRVRRRE GSYPKGQSLD FIHAELARGE MAIVLNCFNPNLGLVDKGV
      210     220     230     240     250
PLQHRSAVSK FFRAIIGRRV TSENTPLNGV PVDILRYWFQ NERLPPGWQP
      260     270     280     290     300
YHKTSLRSTI STINTMRSAM RKFAKELPKK VESTHASAPK PILAITAEPV
      310     320     330     340     350
SSLPVEGVAL NAREDNTNVL TLPDQPSHSQ YPSASSATSS TFTDVLHTPE
      360     370     380     390     400
TSDFQIPFFI TSKDAVSHMS PVHIVDSYAN GKVPLQRRLP IVEPELGI
IDGY

```

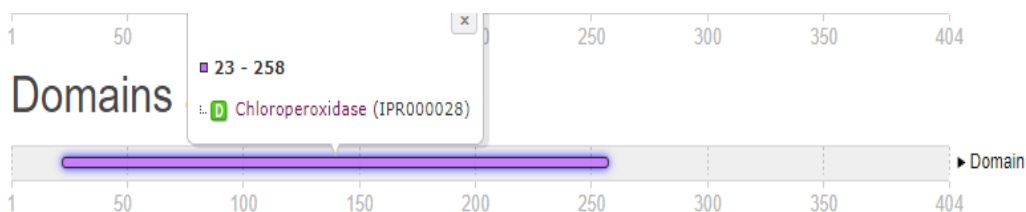


figura 15: Secuencia de aminoácidos de A0A1U7L4V2 y dominios identificados (UniProt recuperado 21 de diciembre de 2018).

Liu y colaboradores en 2014 reportaron una cloroperoxidasa del hongo *Caldariomyces fumago* que fue purificada con una columna DEAE Sephadex A-50 de intercambio anionico, lo cual indica que la cloroperoxidasa es una enzima con

carga negativa, esto coincide con los resultados obtenidos en este trabajo del extracto proteico de *P. floridensis*, la banda con un tamaño aproximado de 45kDa con actividad con guayacol fue separada en una columna de intercambio anionico.

**Tabla 4: Identificación de banda de la fracción semipurificada de 0.1M NaCl con actividad peroxidasa, usando nanoESI-LC-MS / MS (análisis de datos con PeptideShaker).**

<b>Grupo</b>	Inferencia de proteínas	Descripción	Cobertura [%]	#Péptidos validados	Peso molecular [kDa]
B2BF37	Proteína simple	Peroxidasa	31.54	0	40.2
A0A1U7 L463	Proteína simple	Peroxidasa	51.03	1	36.3
A0A1U7 KDD9	Proteína simple	Proteína no caracterizada	100	1	23.0
A0A1U7 L4V2	Proteína simple	Cloroperoxidasa *	79.46	1	44.4

\* Reportada en la especie *Phlebia centrifuga*

Liu y colaboradores en 2015 reportan una cloroperoxidasa producida por la especie *Caldariomyces fumago* que degrada diferentes colorantes recalcitrantes como son los tintes antraquinónicos y trifenilmetanos. En este trabajo se reporta una proteina con un tamaño aproximado de 45kDa con actividad peroxidasa capaz de polimerizar el guayacol en presencia de peroxido de hidrógeno. Otros reportes como el de

Morris y colaboradores en 1966, mencionan la separación y caracterización de una cloroperoxidasa con un tamaño aproximado de 40kDa proveniente del hongo *Caldariomyces fumago*. Cabe resaltar que estas enzimas tienen una doble funcionalidad, ya que además de la actividad peroxidasa, tiene la capacidad de metabolizar los colorantes, dadas sus características de haloperoxidasa. Estas enzimas, dada su multifuncionalidad son de especial interés como estrategia para la biorremediación de aguas y suelos. Cabe resaltar que, si bien pudo identificarse esta enzima utilizando las bases de datos de Uniprot, la información disponible es muy limitada. Tan es así que en bases de datos como NCBI no se encuentran reportes de esta enzima. Por lo tanto, con este trabajo se crea un precedente que enfatiza no sólo la importancia de la identificación de enzimas novedosas con potencial biotecnológico, sino también la importancia de identificar organismos que tengan la capacidad de producirlas, como es el caso del hongo *Phlebia floricola*.

## 4.2. CONCLUSIONES

- El hongo *P. floridensis* tiene capacidad de degradación con diferentes colorantes antraquinónicos, azoicos y derivados del trifenilmetano.
- El hongo *P. floridensis* es capaz de secretar distintas proteínas en respuesta a cambios de pH en el medio de cultivo
- El extracto proteico demostró actividad con los sustratos guayacol, 2,6 dimetoxifenol y ABTS.
- Se obtuvo una banda de 45 kDa con actividad guayacol peroxidasa a partir del extracto proteico a pH3, la cual se identificó como una cloroperoxidasa (A0A1U7L4V2, Uniprot).
- Se observó la inducción diferencial de enzimas con actividad de guayacol peroxidasa en respuesta a los cambios de pH en el medio de cultivo.



### 4.3. BIBLIOGRAFÍA

- Arora, D. S., Bajwa, P., Singh Arora, D., & Gill, P. K. (2005). Production of Ligninolytic Enzymes by *Phlebia Floridensis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. <http://doi.org/10.1007/s11274-004-7655-2>
- Bajwa, P., Arora, D. S., Chander, M., Gill, P., Arora, D., & Chander, M. (2002). Biodecolourization of azo and triphenylmethane dyes by *Dichomitus squalens* and *Phlebia* spp. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* , 28, 201–203. <http://doi.org/10.1038>
- Bautista-Zuñiga, F., Estrada-Medina, H., Jiménez-Osornio, J., & González-Iturbe, J. A. (2004). Relación entre el relieve y unidades de suelo en zonas cársticas de Yucatán. *TERRA Latinoamericana*, 22(3), 243–254.
- Borges-Gómez, L., Escamilla-Bencomo, A., & Soria-Fregoso, M. (2005). Potasio en suelos de Yucatán. *Terra Latinamericana*, 23(4), 437–445.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [http://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Ceccon, E., Olmsted, I., Vázquez-Yanes, C., & Campo-Alves, J. (2002). Vegetación y propiedades del suelo en dos bosques tropicales secos de diferente estado regeneracional en Yucatan. *Agrociencia*, 36(1), 621–631. Retrieved from [http://www.fisica.unam.mx/personales/mir/el/2002\\_agrociencias.pdf](http://www.fisica.unam.mx/personales/mir/el/2002_agrociencias.pdf)

- Chagas, E. P., & Durrant, L. R. (2001). Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajorcaju*. *Enzyme and Microbial Technology*, 29(8–9), 473–477. [http://doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00405-7](http://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00405-7)
- Chung, K.-T., & Stevens, S. E. (1993). Degradation azo dyes by environmental microorganisms and helminths. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12(11), 2121–2132. <http://doi.org/10.1002/etc.5620121120>
- Coconi-Linares, N., Magaña-Ortíz, D., Guzmán-Ortiz, D. A., Fernández, F., Loske, A. M., & Gómez-Lim, M. A. (2014). High-yield production of manganese peroxidase, lignin peroxidase, and versatile peroxidase in *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(22), 9283–9294. <http://doi.org/10.1007/s00253-014-6105-9>
- Coconi-linares, N., Ortiz-vázquez, E., Fernández, F., Loske, A. M., & Gómez-lim, M. A. (2015). Recombinant expression of four oxidoreductases in *Phanerochaete chrysosporium* improves degradation of phenolic and non-phenolic substrates. *Journal of Biotechnology*, 209, 76–84. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.06.401>
- Daljit Singh, A., Chander, M., & Gill, paramjit K. (2002). Involvement of lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase in degradation and selective ligninolysis of wheat straw. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 50, 115–120. Retrieved from [https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/38197153/mukesh\\_paper\\_wheat\\_straw.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires](https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/38197153/mukesh_paper_wheat_straw.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires)

=1525917013&Signature=P3quwCawnMUh1tdjCYVvmjMNSyk%3D&response  
-content-disposition=inline%3B filename%3DInvolvement\_of\_lignin

Dashtban, M., Schraft, H., Syed, T. A., & Qin, W. (2010). Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 1(1), 36–50.

Dávila, G., & Vázquez-Duhalt, R. (2006). Enzimas Ligninolíticas Fúngicas Para Fines Ambientales. *Mensaje Bioquímico*, XXX, 29–55. Retrieved from <http://bq.unam.mx/mensajebioquimicoUTH>

Duch-Gary, J. (1988). *La conformación territorial del estado de Yucatán, los componentes del medio físico*.

Farrell, R. L., Murtagh, K. E., Tien, M., Mozuch, M. D., & Kirk, K. T. (1989). Physical and enzymatic properties of lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microb. Technol.*, 11, 322–328.

Forootanfar, H., Moezzi, A., Aghaie-Khouzani, M., Janlou, Y., Niknejad, F., & Faramarzi, M. A. (2013). Synthetic dye decolorization by three sources of fungal laccase. *Research Journal of Chemistry and Environment*, 17(5), 76–81. <http://doi.org/10.1186/1735-2746-9-27>

Freire, R. S., Durán, N., & Kubota, L. T. (2001). Effects of fungal laccase immobilization procedures for the development of a biosensor for phenol compounds. *Talanta*, 54(4), 681–686. [http://doi.org/10.1016/S0039-9140\(01\)00318-6](http://doi.org/10.1016/S0039-9140(01)00318-6)

Glenn, J. K., & Gold, M. H. (1983). Decolorization of several pymeric dyes by the

- lignin degrading basidiomycete *Phanerochete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 6(45), 1741–1747.
- Griffin, B. W. (1991). Chloroperoxidase: A review. In *Peroxidases in Chemistry and Biology* (p. 85). CRC Press.
- Guzmán, G. (2004). Los hongos de la Península de Yucatán (México) V. Nuevas observaciones y nuevos registros. *Revista Mexicana de Micología*, (18), 7–13.
- Haibo, Z., Yinglong, Z., Feng, H., Peiji, G., & Jiachuan, C. (2009). Purification and characterization of a thermostable laccase with unique oxidative characteristics from *Trametes hirsuta*. *Biotechnology Letters*, 31(6), 837–843.  
<http://doi.org/10.1007/s10529-009-9945-0>
- Hammel, K. E. (1997). Fungal degradation of lignin. *Driven by Nature: Plant Litter Quality and Decomposition.*, 33–45.  
<http://doi.org/10.3109/1040841X.2013.791247>
- Heinfling, A., Martínez, M. J., Martínez, A. T., Bergbauer, M., & Szewzyk, U. (1998). Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(8), 2788–2793.
- Hill, T. W., & Kafer, E. (2001). Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium : trace element and minimal medium salt stock solutions. *Fungal Genetics Reports*, 48(1), 18–21.
- Husain, Q. (2006). Potential Applications of the Oxidoreductive Enzymes in the Decolorization and Detoxification of Textile and Other Synthetic Dyes from

Polluted Water: A Review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 26(4), 201–221.  
<http://doi.org/10.1080/07388550600969936>

Kuwahara, M., Glenn, J. K., Morgan, M. A., & Gold, M. H. (1984). Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Elsevier Science*, 169(2), 247–250.

Laemmli, U. K. (1970): (1970). Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature*, 227, 680–685.  
<http://doi.org/10.1038/227680a0>

Levin, L., Papinutti, L., & Forchiassin, F. (2004). Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes. *Bioresource Technology*, 94(2), 169–176.  
<http://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.12.002>

Lianhui Zhang, L., Tipeng Wang, T., Shunshan Jiao, S., Changchun Hao, C., & Zhihuai Mao, Z. (2007). Effect of Steam-Explosion on Biodegradation of Lignin in Wheat Straw. In *2007 Minneapolis, Minnesota, June 17-20, 2007* (p. 1). St. Joseph, MI: American Society of Agricultural and Biological Engineers.  
<http://doi.org/10.13031/2013.22959>

López-Castillo, L. M., López-Arciniega, J. a. I., Guerrero-Rangel, A., Valdés-Rodríguez, S., Brieba, L. G., García-Lara, S., & Winkler, R. (2015). Identification of B6T173 (ZmPrx35) as the prevailing peroxidase in highly insect-resistant maize (*Zea mays*, p84C3) kernels by activity-directed

purification. *Frontiers in Plant Science*, 6(September), 1–13.

<http://doi.org/10.3389/fpls.2015.00670>

Martani, F., Beltrametti, F., Porro, D., Branduardi, P., & Lotti, M. (2017). The importance of fermentative conditions for the biotechnological production of lignin modifying enzymes from white-rot fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 364(13). <http://doi.org/10.1093/femsle/fnx134>

Morris, D. R., & Hager, L. P. (1966). Chloroperoxidase. I. Isolation and properties of the Crystalline Glycoprotein. *The Journal of Biological Chemistry*, 241(8). Retrieved from <http://www.jbc.org/>

Mougin, C., Kollmann, A., & Jolival, C. (2002). Enhanced production of laccase in the fungus. *Biotechnology Letters*, 24, 139–142. <http://doi.org/10.1023/A:1013802713266>

Niku-Paavola, M. L., Karhunen, E., Salola, P., & Raunio, V. (1988). Ligninolytic enzymes of the white-rot fungus *Phlebia radiata*. *The Biochemical Journal*, 254(3), 877–883. <http://doi.org/10.1042/bj2540877>

Padamavathy, S., Sandhya, S., Swaminathan, K., Subrahmanyam, Y. V., & Kaul, S. N. (2003). Comparison of decolorization of reactive azo dyes by microorganisms isolated from various sources. *Journal of Environmental Sciences*, 15(5), 628–632. Retrieved from <https://content.iospress.com/articles/journal-of-environmental-sciences/jes15-5-10>

Pearce, C. I., Lloyd, J. R., & Guthrie, J. T. (2003). The removal of colour from

textile wastewater using whole bacterial cells: a review. *Dyes and Pigments*, 58(3), 179–196. [http://doi.org/10.1016/S0143-7208\(03\)00064-0](http://doi.org/10.1016/S0143-7208(03)00064-0)

Pérez-Boada, M., Doyle, W. A., Ruiz-Dueñas, F. J., Martínez, M. J., Martínez, A. T., & Smith, A. T. (2002). Expression of *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase in *Escherichia coli* and optimisation of in vitro folding. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(4), 518–524. [http://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00008-X](http://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00008-X)

Piontek, K., Glumoff, T., & Winterhalter, K. (1993). Low pH crystal structure of glyoxylated lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.5 Å resolution. *Elsevier Science*, 315(2), 119–124.

Prasher, I. B., & Ashok, D. (2013). A Checklist of Wood Rotting Fungi ( non-gilled Agaricomycotina ) of Himachal Pradesh. *J New Biological Reports*, 2(2), 71–98.

Prinsen, P. (2010). *Composición química de diversos materiales lignocelulósicos de interés industrial y análisis estructural de sus ligninas*. Sevilla. Retrieved from [http://www.irnase.csic.es/users/delrio/repository\\_theses/2010-Prinsen-MsC.pdf](http://www.irnase.csic.es/users/delrio/repository_theses/2010-Prinsen-MsC.pdf)

Ramachandra, M., Crawford, D. L., & Hertel, G. (1988). Characterization of an Extracellular Lignin Peroxidase of the Lignocellulolytic Actinomycete *Streptomyces-Viridosporus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(12), 3057–3063.

Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R., & Nigam, P. (2001). Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with

a proposed alternative. *Bioresource Technology*, 77(3), 247–255.

[http://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00080-8](http://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00080-8)

Spadaro, J. T., & Renganathan, V. (1994). Peroxidase-Catalyzed Oxidation of Azo Dyes: Mechanism of Disperse Yellow 3 Degradation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 312(1), 301–307. <http://doi.org/10.1006/ABBI.1994.1313>

Stolz, A. (2001). Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(1–2), 69–80.

<http://doi.org/10.1007/s002530100686>

Sundaramoorthyl, M., Terrier, J., Poulos, T. L., & Poulos, T. L. (1998).

Stereochemistry of the chloroperoxidase active site: crystallographic and molecular-modeling studies. *Chemistry & Biology*, 5, 461–473. Retrieved from <http://biomednet.com/elecref/1074552100500461>

Vares, T., Kalsi, M., & Hatakka, A. (1995). Lignin Peroxidases, Manganese Peroxidases, and Other Ligninolytic Enzymes Produced by *Phlebia-Radiata* during Solid-State Fermentation of Wheat-Straw. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(10), 3515–3520.

Vares, T., Kalsi, M., Hatakka, A., Rodríguez Sánchez, E., Pérez-Boada, M., Ruiz- Dueñas, F. J., ... Martínez, A. T. (1995). Versatile peroxidase oxidation of high redox potential aromatic compounds: Site-directed mutagenesis, spectroscopic and crystallographic investigation of three long-range electron transfer pathways. *Journal of Molecular Biology*, 354(10), 3515–3520.

<http://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.09.047>



- Verma, P., & Madamwar, D. (2003). Decolourization of synthetic dyes by a newly isolated strain of *Serratia marcescens*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(6), 615–618. <http://doi.org/10.1023/A:1025115801331>
- Wariishi, H., Valli, K., & Gold, M. H. (1992). Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: Kinetic mechanism and role of chelators. *Journal of Biological Chemistry*, 267(33), 23688–23695.
- Welinder, K. G. (1992). Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology*, 2(3), 388–393. [http://doi.org/10.1016/0959-440X\(92\)90230-5](http://doi.org/10.1016/0959-440X(92)90230-5)
- Wong, D. W. S. (2009). *Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. Applied Biochemistry and Biotechnology* (Vol. 157). <http://doi.org/10.1007/s12010-008-8279-z>
- Zollinger, H. (2003). *Color chemistry : syntheses, properties, and applications of organic dyes and pigments*. Verlag Helvetica Chimica Acta.

#### 4.4. ANEXOS

- Secuencias de ADN del hongo *P. floricola*

Secuencia1:

TTTACGCCAGCACGAGTTGACGGGTTGTAGCTGACCTCAATTGGGGTATG  
TGCACGCCTGGCTCATTCCACTCTCAAACYCCTGTGCACTTATTGTAGGCT  
TGGTGGGATAGGCTGACTTTCATTAGTCGGTCTTGAAAGCTTCGCCTATGT

TTTAATACAAACGCTTCAGTTTAGAATGTAATCATTGCTAACAAGCAAATTA  
AATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGC  
AGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAAT  
CTTTGAACGCACCTTGCGCTCTTTGGTATTCCGAAGAGCATGCCTGTTTGA  
GTGTCATGGTATCATCAACCTTCAACACTTTTGTGATTGAAGGCTTGGATTT  
GGAGGTTGTGTCGGTGCATTTCGTATCGACTCCTCTGAAATGTATTAGCGT  
GAATCTTACGGATCGCCTTCGGTGTGATAATTAAGTGCGCCGTGGACGTGA  
AGTATAACAGTGTTTCGTGCTTACAATCGTCTTTAACAGAGACAACACTTTG  
ACAATCTGACCTCAAATCAGGTAGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCA  
WAGGTGGAGGGAAWGKAGCTGACCTCAATTGGGGKATGTGCACGCCTG  
GSTCAWTCCACTCTCAAAMYCCTGTGCACTTATTGTAGGCTTGGTGGGAT  
AGGSTGACTTTCATTAGTCGGKCTTGARAGCKTCGCCTATGTTTTAATACA  
AACGCTTCAGTTTAGAATGTAATCATTGCTAACAAGCAAATTAATACAAC  
TTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAAMGCAGCGAAAT  
GYGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC  
GCACTTGCGCTCTTTGGTATWCGAGAGCATGCTGTTTGASTGTCATGGAT  
CATCACGTCACACTTTGTGATGAAGCTGAKTGAGGTGTGTCGTGCATCGAT  
CRMTCTCTGAAATGATRCGTGAGYSTACGATCGCTCGKTGATATACTGCAC  
TGGACTGAGATAACAAGTCAGCTMATCGCTGACAGAACAACCTGGACCTGA  
CYATCAGAGAATCCCGTACTAGCACTTGCGAGGAGCACACACCTGTC

Secuencia 2:

TGGCATCTACCTGATTTGAGGTCAGATTGTCAAAGTGTTGTCTCTGTAAA  
GACGATTGTAAGCACGAACAYTGTTATACTTCACGTCCACGGCGCAGTAAT  
TATCACACCGAAGGCGATCCGTAAGATTCACGCTAATACATTTTCAGAGGAG  
TCGATACGAATGCACCGACACAACCTCCAAATCCAAGCCTTCAATCACAAA  
AGTGTTGAAGGTTGATGATACCATGCACTCAAACAGGCATGCTCTTCGGA  
ATACCAAAGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCT  
GCAATTCACACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAG  
CCAAGAGATCCGTTGCTGAAAGTTGTATTTAATTTGCTTGTAGCAATGATT  
ACATTCTAAACTGAAGCGTTTGTATTTAAACATAGGCGAAGCTTTCAAGAC

CGACTAATGAAAGTCAGCCTATCCCACCAAGCCTACAATAAGTGCACAGG  
RGTTTGAGAGTGGAATGAGCCAGGCGTGCACATACCCCAATTGAGGTCAG  
CTACAACCCGTTTCAAACCTCGATAATGATCCTTCCGCAGGMCCCYWWM  
MSGRAGAGRWAACYWWYMTGRWGTGKKGAAARCGGGTTGYAGCTGAC  
CTCACTYGGRGTATGTGCACGCCTGGCTCATCCACTCTCAAACCCGGTGM  
CTTWWTGGWAGGCSTYGGKKGGGAWWGGCYGACTTTCAATAGTCGGTC  
TTGAAWGCTTCGCCATATKTAATACAAACGCTTCATTTTAGAAAGTAATCAT  
TGCTAASAAGCAATTAATAACAACCTKTCAGCAASGGATCTTGGGCTSKMWS  
CAKCAAAAAARRMMSAAAKSSAATMRGTTAATGGKGMATTGCSMRRAATT  
MRATKGMWYMACSAACCTTTGAAAGCAYTGSSCYTYKKSTWWSTCSAAM  
ARMAGCGATTGRCTKCMAGGGAATCMTCRACCTTACMTTYKGTGAATGCA  
CGCATGGAATTGAGATTGGTCGTTGCATTTCGATCGACTCCCMCKAMMGAT  
AACTGGAACTACCGAWAGCCTCRTTGWAATACGCATGCACTGACTACGTC  
TGCTAMTGTCTTACAGGA

Secuencia

alineada:

CTACCTGATTTGAGGTCAGATTGTCAAAGTGTTGTCTCTGTAAAGACGAT  
TGTAAGCACGAACAYTGTTATACTTACGTCCACGGCGCAGTAATTATCAC  
ACCGAAGGCGATCCGTAAGATTCACGCTAATACATTTTCAGAGGAGTCGAT  
ACGAATGCACCGACACAACCTCCAAATCCAAGCCTTCAATCACAAAAGTGT  
TGAAGGTTGATGATACCATGACACTCAAACAGGCATGCTCTTCGGAATACC  
AAAGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACTGAATTCTGCAAT  
TCACACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCAAG  
AGATCCGTTGCTGAAAGTTGTATTTAATTTGCTTGTTAGCAATGATTACATT  
CTAAACTGAAGCGTTTGTATTTAAACATAGGCGAAGCTTTCAAGACCGACT  
AATGAAAGTCAGCCTATCCCACCAAGCCTACAATAAGTGCACAGGRGTTT  
GAGAGTGGAATGAGCCAGGCGTGCACATACCCCAATTGAGGTCAGCTACA  
ACCCGT

>|cl|Query\_18237:141-

562CATTTTCAGAGGAGTCGATACGAATGCACCGACACAACCTCCAAATCCA  
AGCCTTCAATCACAAAAGTGTGAAGGTTGATGATACCATGACACTCAAAC  
AGGCATGCTCTTCGGAATACCAAAGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTTCG  
ATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTC

TTCATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGCTGAAAGTTGTATTTAATTT  
 GCTTGTTAGCAATGATTACATTCTAAACTGAAGCGTTTGTATTAACATAG  
 GCGAAGCTTTCAAGACCGACTAATGAAAGTCAGCCTATCCCACCAAGCCT  
 ACAATAAGTGCACAGGRGTTTGAGAGTGGAATGAGCCAGGCGTGACATA  
 CCCCAATTGAGGTCAGCT.

En la figura 16 se puede observar el análisis mediante BLAST/NCBI, este resultado tiene una identidad del 99.65%, esto sugiere que el hongo es de la especie *P. floridensis*.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">Phlebia cf. floridensis RG-2014 strain MS115a internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5</a>	1037	1037	100%	0.0	99.65%	<a href="#">KJ831896.1</a>
<a href="#">Phlebia cf. floridensis strain LTL618 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; intern</a>	1033	1033	100%	0.0	99.47%	<a href="#">MF663593.1</a>
<a href="#">Phlebia cf. floridensis isolate C2A 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcrib</a>	1031	1031	100%	0.0	99.47%	<a href="#">MH990631.1</a>

**figura 16: Resultados del análisis de la secuencia de *P. floridensis* mediante BLAST del NCBI**