

## Caracterización de aislados fúngicos en medio mínimo de Mathur adicionado con diferentes polímeros naturales y sintéticos

Juan Magaña Martínez<sup>1</sup>, Xally Lauren Mares Cendejas<sup>1</sup>, Rodrigo Alexis Martínez Gallardo<sup>1</sup>, Stephany Aguilera Domínguez<sup>1</sup>, Lérica Liss Flores Villavicencio<sup>1</sup>, Julio César Villagómez Castro<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología, DCNE campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato  
castroj@ugto.mx<sup>2</sup>

### Resumen

La acumulación de residuos de polímeros naturales y sintéticos en el ambiente se ha incrementado en las últimas décadas ocasionando daños al ecosistema y la salud humana y animal. Una de las estrategias para reducir su impacto es su reciclado, sin embargo, tanto los métodos físicos como químicos no han resuelto esta problemática, por lo que se han multiplicado los esfuerzos para su aprovechamiento utilizando microorganismos. La lignocelulosa, polímero natural más abundante en la naturaleza, es aprovechado por rumiantes y muchos microorganismos para su desarrollo. En el rumen de estos animales se ha descrito la interacción de hongos, protozoarios y bacterias para aprovechar este polímero, utilizando una batería de enzimas capaces de degradar el polímero (celulasas, xilanasas, etc.). Algunas de estas enzimas tienen gran aplicación biotecnológica, ya sea en la industria alimenticia, farmacéutica, textil, etc.; y recientemente, en el tratamiento de residuos y su aplicación en la producción de biocombustibles. Por otro lado, los residuos plásticos se han incrementado exponencialmente a partir de finales del siglo pasado, convirtiéndose en un problema ambiental y social, haciendo necesario el desarrollo de protocolos para su disposición y aprovechamiento. En las dos últimas décadas se ha reportado la biodegradación de diferentes plásticos: polietileno, poliestireno, polipropileno, etc.; por microorganismos (hongos y bacterias) o enzimas, secretadas por ellos, con actividad de esterasa, lipasa, cutinasa, etc. Hasta la fecha, el desarrollo biotecnológico hacia el aprovechamiento de estos polímeros plásticos ha sido muy limitado, principalmente por la baja eficiencia catalítica de las enzimas, lo que ha involucrado el desarrollo de la bioingeniería dedicada a su modificación para mejorar su estructura y actividad. En nuestro grupo de trabajo hemos recuperado varios aislados fúngicos capaces de crecer sobre polímeros naturales y sintéticos. Actualmente, dos de ellos, se están caracterizando bioquímicamente y molecularmente, basados en su crecimiento en medio mínimo de Mathur (MMM) adicionado con celofán o PET como fuente de carbono, lo cual sugiere la presencia de actividades hidrolíticas (celulasas, cutinasas, etc.). En este trabajo se presenta la caracterización bioquímica y morfológica de los aislados 2 y 3, crecidos en MMM y utilizando polímeros sintéticos y naturales, como fuente de carbono. Nuestros resultados confirman que ambos aislados son hongos filamentosos capaces de secretar actividades enzimáticas de  $\beta$ -glucosidasa y celobiohidrolasa, con base en el sustrato utilizado como fuente de carbono. Se requiere, en un futuro, realizar a detalle su caracterización bioquímica y molecular para determinar su potencial uso biotecnológico.

**Palabras clave:** hongos; polímeros; glucosidasa; celobiosidasa.

### Introducción

La acumulación de residuos de polímeros naturales y sintéticos en el ambiente se ha incrementado en las últimas décadas ocasionando daños al ecosistema y la salud humana y animal. Una de las estrategias para reducir su impacto es su reciclado, sin embargo, tanto los métodos físicos como químicos no han resuelto esta problemática, por lo que se han multiplicado los esfuerzos para su aprovechamiento utilizando microorganismos. En la literatura se han descrito diferentes microorganismos capaces de degradar polímeros naturales y sintéticos (desechos plásticos) con el fin de utilizarlos en la biodegradación de estos materiales y aprovechar los productos de degradación (de Vries y Visser, 2001; Ru *et al.*, 2020).

Los polisacáridos vegetales son los compuestos más abundantes en la naturaleza conformando alrededor del 90% de la materia vegetal y pueden clasificarse en celulosa, hemicelulosa y pectina. Su degradación enzimática ha sido motivo de estudio durante muchos años, ya que es una mejor alternativa frente a los procesos químicos y mecánicos que se han diseñado para ello. Estas enzimas involucradas en la degradación

de la pared celular vegetal se pueden clasificar en dos sistemas degradadores, el celulolítico y el xilanolítico (Singhania, 2009). Un fenómeno natural importante es el aprovechamiento de la lignocelulosa, empleado como alimento en ruminantes y muchos microorganismos, principalmente hongos. En el rumen de estos animales se ha descrito la interacción de hongos, protozoarios y bacterias para metabolizar el polímero (Lee *et al.*, 2000), utilizando una batería de enzimas capaces de degradarlo, tales como celulasas, xilanasas, etc. Estas enzimas también permiten a los microorganismos tener una ventaja primordial para su crecimiento con respecto a otros organismos presentes en su entorno.

En el reino fungi, se han empleado principalmente organismos de los géneros *Aspergillus* y *Trichoderma*, así como algunas especies del género *Penicillium* y géneros filogenéticamente relacionados, como microorganismos fuente de estas hidrolasas, algunas de las cuales se han modificado molecularmente para mejorar su espectro de actividad (de Vries y Visser, 2001). Sin embargo, no ha sido sino hasta los últimos 20 años, en los que se obtuvieron avances espectaculares en la caracterización bioquímica y molecular, de las enzimas involucradas y de los genes que las codifican, así como en la determinación de las características estructurales finas de los polisacáridos. Todo ello motivado por su gran importancia biotecnológica en procesos de las industrias de alimentos, papel, bebidas, textiles y, recientemente, en la de biocombustibles.

Por otro lado, los residuos plásticos se han incrementado a partir de finales del siglo pasado, convirtiéndose en un problema ambiental y social. Particularmente, el poli-etilentereftalato (PET), debido a sus características de resistencia a la degradación química, térmica y al desgaste, compatibilidad con productos alimenticios y muy pobre permeabilidad a gases ( $O_2$  y  $CO_2$ ) y agua, es actualmente uno de los polímeros sintéticos más demandados por la industria (Jambeck *et al.*, 2015). Este poliéster termoplástico, transparente y semicristalino, sintetizado inicialmente en 1941 por Whinfield y Dickson, como un polímero de uso textil, actualmente tiene un uso indiscriminado para el envasado de alimentos y bebidas (principalmente agua, gaseosas, jugos y actualmente, cervezas) provocando un incremento en su aparición como producto de desecho en rellenos sanitarios, haciéndolo un contaminante terrestre y marino ampliamente distribuido en nuestra sociedad (Jambeck *et al.*, 2015).

El PET es reciclado por métodos químicos y físicos, los cuales involucran el uso de solventes, procesos con presión alta y temperatura media, para su reciclado químico; y el consumo de grandes cantidades de agua y la pérdida de algunas de sus propiedades fisicoquímicas, durante el reciclado físico. El proceso de biodegradación de PET se ha reportado como "un proceso lento y débil" (Zhang *et al.*, 2004), si bien, recientemente se han descrito bacterias y hongos como *Ideonella sakaiensis* (Yoshida *et al.*, 2016) y *Fusarium culmorum* (Ahuactzin-Pérez *et al.*, 2016), capaces de degradar muy pequeñas cantidades de PET y derivados de ftalato (microplacas), en tiempos relativamente cortos. La degradación enzimática del PET y poliésteres sintéticos se ha atribuido a la acción de enzimas tales como hidrolasas en *Thermobifida fusca* (Müller *et al.*, 2005); cutinasas en *Fusarium solani* (Carvalho *et al.*, 1998), *Fusarium culmorum* (Ahuactzin-Pérez *et al.*, 2016), *Aspergillus nidulans* (Castro-Ochoa *et al.*, 2010; Bermúdez-García *et al.*, 2017); "PETasa" en *Ideonella sakaiensis* (Yoshida *et al.*, 2021).

En nuestro grupo de trabajo hemos recuperado varios aislados fúngicos capaces de crecer sobre polímeros naturales (celulosa) y sintéticos (PET), lo cual sugería que estos hongos fuesen capaces de utilizar el PET o derivados celulósicos como fuente de carbono (Ruano-Najarro y Villagómez-Castro, 2018; Silva-Rodríguez, 2019). Algunos de los aislados fueron parcialmente caracterizados con base a su ADN, obteniéndose, 4 diferentes géneros fúngicos con actividad celulolítica expresada diferencialmente (Pérez-Méndez, 2021). Actualmente, dos de los aislados, capaces de crecer en medio mínimo de Mathur-sales adicionado con PET o con celofán como fuente de carbono, se están estudiando en el laboratorio considerando la posibilidad de que secreten enzimas capaces de degradar ambos polímeros, una cutinasa o esterasa para degradar el PET y enzimas del complejo celulolítico para degradar el polímero natural. Sin embargo, los aislados 2 y 3, motivo de este trabajo, aún no habían sido estudiados. Nuestros resultados indican que ambos aislados son hongos filamentosos que secretan enzimas con actividad de  $\beta$ -glucosidasa y celobiosidasa de manera diferencial, dependiendo del polímero utilizado como fuente de carbono. Con base en los datos obtenidos es necesaria una caracterización taxonómica y molecular, así como un estudio más profundo de las actividades secretadas por ambos aislados y determinar, en un futuro, su posible aplicación en biotecnología.

## Material y Métodos

### Morfología macroscópica y microscópica de los aislados fúngicos

La caracterización macroscópica de los aislados fúngicos denominados 2 y 3, se realizó en medio agar papa dextrosa (PDA); medio mínimo de Mathur, pH 4.5 (MMM) y medio dextrosa-peptona-extracto de levadura, pH 4.5 (YPD). Los hongos fueron inoculados en los medios de cultivo mediante bocado y se incubaron a 28 °C durante 5 días en PDA y YPD y, 7 días en MMM. Posteriormente, se realizó el registro del crecimiento fúngico. Por otra parte, se realizó la técnica de microcultivo en medio PDA para la caracterización microscópica mediante la tinción con azul de lactofenol y blanco de Calcofluor. Las muestras fueron observadas en microscopía de campo claro y en epifluorescencia (Leica DMLS) con una cámara AxioCam ICc1 (Carl Zeiss) usando el filtro UV Excitación-Emisión: 400-420 nm.

### Crecimiento de los aislados fúngicos en MMM adicionado con diferentes polímeros naturales y sintéticos

Los hongos se crecieron en MMM, pH 4.5, adicionando como fuente de carbono diversos polímeros naturales como el celofán dulce (CD), carboximetilcelulosa (CMC), celulosa cristalina (C) o bien con polímeros sintéticos como el tereftalato de polietileno (PET), poliestireno (PS), polietileno (PE) y celofán amargo o celofán sintético (CA). Como control se utilizó la adición de glucosa (G) como única fuente de carbono. Para ello, se prepararon matraces con 8 mL de MMM (2.5 g, MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O; 2.72 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1 g, glucosa; 1.914 g, NH<sub>4</sub>Cl; en 1 L de agua destilada) y se inocularon con un bocado de micelio (5 mm de diámetro) del aislado 2 ó 3. Posteriormente, los matraces se incubaron a 28 °C, 125 rpm, durante 15 días. Al finalizar el periodo de incubación, las muestras se centrifugaron a 2655 g por 10 min a 4 °C; las pastillas fueron analizadas en microscopía de campo claro y epifluorescencia y, los sobrenadantes (SN) se alicuotaron y se colocaron en congelación a -20 °C para su posterior análisis. Previamente a la determinación de actividad enzimática y electroforesis en los SN, se cuantificó su concentración de proteína por el método de Lowry (1951), utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar (curva de calibración, 0-100 µg). Las lecturas se realizaron a 750 nm en un espectrómetro Epoch BioTek.

### Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE 10%)

Con las muestras de los SN se realizó una electroforesis en condiciones desnaturalizantes, en geles de poliacrilamida al 10 %, siguiendo el protocolo de Laemmli (1970). Para ello, 300 µL de SN de la aislado 2 y 400 µL de SN de la aislado 3, fueron concentrados al vacío (Speed Vac Plus SC 210A, Savant). Posteriormente, las muestras fueron preparadas con el amortiguador de carga para la separación de las proteínas en geles de poliacrilamida al 10 % en condiciones desnaturalizantes. Los geles fueron teñidos con plata para la visualización de las proteínas. La adquisición de la imagen se realizó en un equipo ChemiDoc MP System-BIORAD utilizando el software Image Lab™ software (BIORAD).

### Determinación de la actividad enzimática secretada


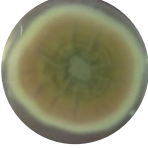

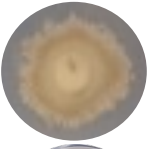
En los SN se determinó la actividad enzimática de β-glucosidasa y celobiosidasa usando como sustratos: 4-metilumbeliferil-glucósido (4-MUG) y 4-metilumbeliferil-celobiosido (4-MUC), respectivamente, (Chávez-Ramírez, 2015; Hernández-Guzmán *et al.*, 2016). Los ensayos se realizaron utilizando el sustrato respectivo (5 µM) y volúmenes variables del SN en solución amortiguadora de citrato-fosfato 150 mM, pH 4.5, en un volumen final de reacción de 400 µL. La mezcla se incubó durante 30 min a 45 °C. Al término de la incubación, la reacción se paró adicionando 2 mL de solución amortiguadora de bicarbonato de sodio-hidróxido de sodio, 0.1 M, pH 10.4 y la fluorescencia liberada se determinó a una longitud de onda de excitación y emisión de 350 y 440 nm, respectivamente, utilizando un espectrofluorómetro Perkin-Elmer LS-5B.

## Resultados

### Morfología macroscópica de los aislados fúngicos

El análisis morfológico colonial de los aislados 2 (Tabla 1) y 3 (Tabla 2), se realizó en diferentes medios de cultivo (PDA, YPD y MMM), para determinar las características macroscópicas fúngicas. El aislado 2 mostró un crecimiento micelial irregular en medio YPD y MMM, mientras que en PDA el micelio se observó filamentos, además, se visualizaron cambios en la coloración de la colonia fúngica tanto en el anverso como en el reverso, siendo más evidente la coloración radial de la colonia en medio YPD, desde blanco verdoso-amarillo-naranja y beige, vista de la parte externa al centro de la colonia, por su reverso. La colonia fúngica, independientemente de su morfología superficial, elevación y borde, presento una textura agodonosa.

**Tabla 1.** Análisis de la morfología macroscópica del aislado 2 crecido en diferentes medios de cultivo

| Morfología Macroscópica Cepa 2  |   | Medio | Forma       | Elevación | Borde    | Superficie  | Color anverso | Color reverso                                     |
|---|---|-------|-------------|-----------|----------|-------------|---------------|---|
| Anverso   | Reverso   |       |             |           |          |             |               |   |
|  |  | YPD   | Irregular   | Elevada   | Ondulado | Con surcos  | Blanco        | Blanco<br>Verdoso<br>Amarillo<br>Naranja<br>Beige |
|  |  | MMM   | Irregular   | Plana     | Lobulado | En Sectores | Beige         | Beige y Café                                      |
|  |  | PDA   | Filamentosa | Plana     | Liso     | Lisa        | Amarillo      | Beige   |

Por su parte, el aislado 3 (Tabla 2), mostró un crecimiento micelial y características dependientes del medio de cultivo empleado. Se observó un cambio evidente de coloración blanca a naranja en el reverso de la colonia fúngica en medio YPD, mientras que en el medio MMM y PDA se observó una coloración beige y amarilla, respectivamente. La textura algodonosa de la colonia se observó en medio YPD y PDA, mientras que en MMM, se observó una textura terrosa.

**Tabla 2.** Análisis de la morfología macroscópica del aislado 3 crecido en diferentes medios de cultivo

| Morfología Macroscópica Cepa 3  |   | Medio | Forma     | Elevación         | Borde    | Superficie | Color anverso | Color reverso |
|---|---|-------|-----------|-------------------|----------|------------|---------------|---------------|
| Anverso   | Reverso   |       |           |                   |          |            |               |               |
|  |  | YPD   | Irregular | Umbilicada        | Ondulado | Rugosa     | Blanco        | Naranja       |
|  |  | MMM   | Circular  | Plana             | Liso     | Suave      | Beige         | Beige         |
|  |  | PDA   | Irregular | Plana y extendida | Liso     | Suave      | Verde opaco   | Amarillo      |

### Morfología microscópica de los aislados fúngicos

El análisis de las estructuras fúngicas de los aislados 2 y 3, se realizó mediante la tinción con el fluorocromo blanco de Calcofluor y su observación por microscopia de epifluorescencia. Por otra parte, se realizó la tinción con azul de lactofenol utilizando microscopia en campo claro (Fig. 1). Ambas tinciones permitieron observar



en los dos aislados, la presencia de micelio con hifas hialinas y septadas, así como la estructura de sus conidióforos (recuadro) y, por ende, la presencia de métula y fiálides; además, se observó que los conidios presentan una morfología circular.

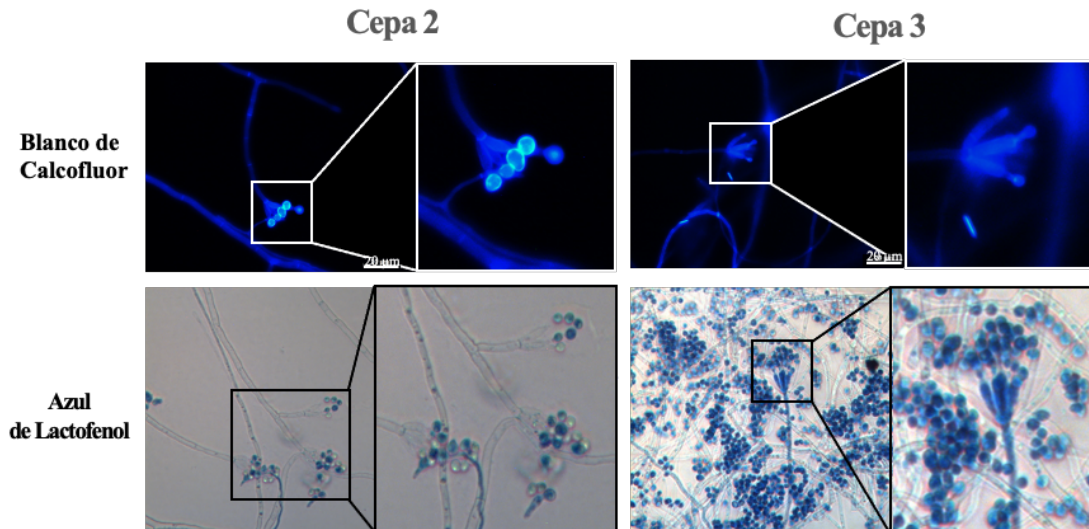


Figura 1. Caracterización de la morfología microscópica de los aislados fúngicos mediante microcultivo en PDA a 28°C. Las preparaciones fueron teñidas con Blanco de calcofluor o Azul de Lactofenol. En ambos aislados se observan hifas hialinas y septadas, así como la presencia de conidióforos (recuadros) y con una gran cantidad de conidios con morfología circular.

### Análisis de la interacción fúngica con los polímeros naturales y sintéticos

En los aislados 2 y 3 al finalizar el periodo de los 15 días de incubación, se analizó microscópicamente el crecimiento fúngico en interacción con los polímeros naturales (Fig. 2) y sintéticos (Fig. 3). En el caso de los polímeros naturales, ambos aislados crecieron sobre el polímero (Fig. 2, cabeza de flecha roja) y en algunos casos, se observaron fragmentos de los polímeros embebidos dentro de la masa micelial, como se observa para el aislado 2 con carboximetilcelulosa y el aislado 3 con celofán dulce. Además, existe la formación de artrosporas en el aislado 2, cuando fue crecido en los polímeros naturales, en contraste, el aislado 3 no las presentó. El crecimiento de los aislados en MMM suplementado solamente con glucosa como fuente de carbono, fue utilizado como un control del crecimiento del hongo, donde se pudo observar que en el caso del aislado 2 también existe la presencia de artrosporas, sin embargo, esta morfología es más evidente cuando el aislado está en interacción con los polímeros.

Con respecto a la interacción de los aislados 2 y 3 con los polímeros sintéticos (Fig. 3, cabeza de flecha roja), se observó que para el aislado 2 crecido en los diferentes polímeros, se observaron fragmentos de los polímeros embebidos en la masa micelial y la formación de artrosporas, en contraste, e aislado 3 muestra un crecimiento sobre los polímeros, sin una formación evidente de artrosporas, excepto en tereftalato de polietileno (Fig. 3).

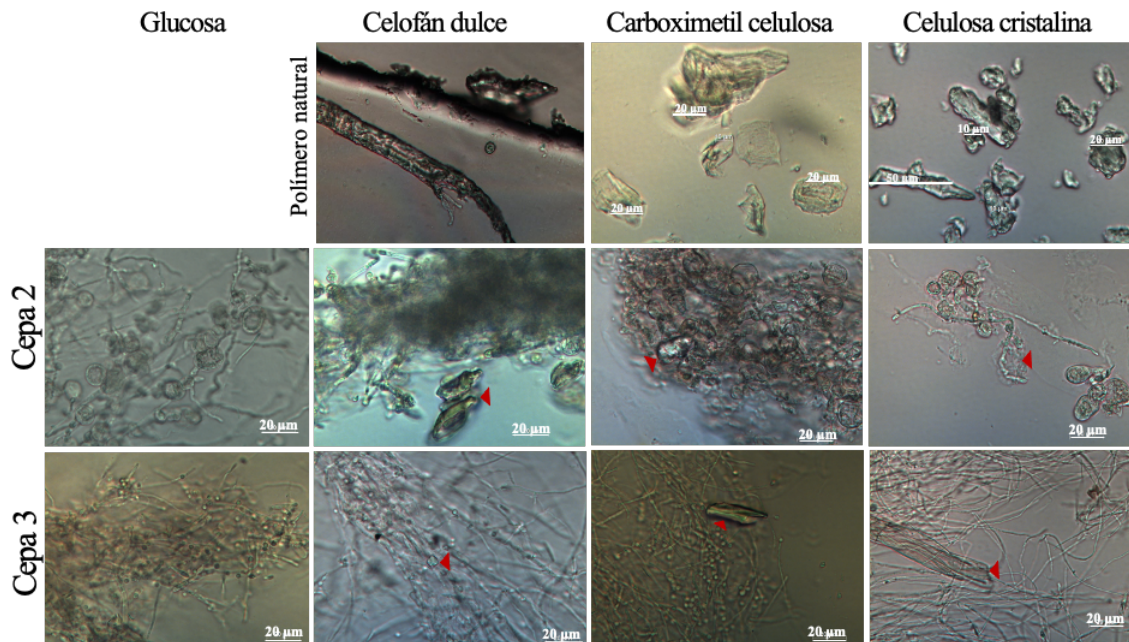


Figura 2. Análisis microscópico de la interacción fúngica con polímeros naturales. Los aislados 2 y 3 fueron crecidos con los polímeros naturales (0.1 % p/v), durante 15 días a 28 °C y agitación a 125 rpm. Posteriormente, mediante microscopia en campo claro, se observó la morfología del desarrollo del micelio en interacción con los polímeros. El crecimiento en glucosa fue utilizado como control. Fragmentos de los polímeros (cabeza de flecha roja)

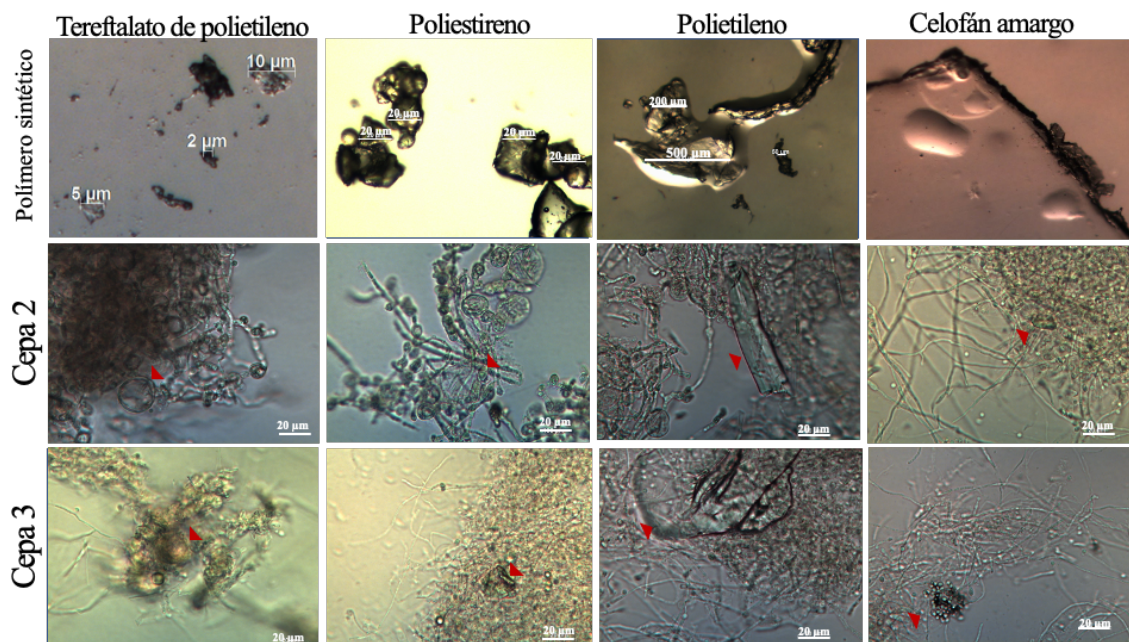


Figura 3. Análisis microscópico de la interacción fúngica con polímeros sintéticos. Los aislados 2 y 3 fueron crecidos en los polímeros de tereftalato de polietileno, poliestireno, polietileno o celofán amargo al 0.1 % (p/v) durante 15 días a 28°C y 125 rpm. Posteriormente, mediante microscopia en campo claro, se observó la morfología del micelio y su interacción con el polímero. Fragmentos de los polímeros (cabeza de flecha roja)

## Análisis de las proteínas secretadas por los aislados fúngicos

Una alícuota del SN recuperado del cultivo de ambos aislados en MMM adicionado con los diferentes sustratos (polímeros naturales y sintéticos), utilizados como fuente de carbono, se utilizó para determinar el perfil electroforético de las proteínas secretadas. El aislado 2 mostró dos bandas de proteína secretadas de 66 y 76 kDa independientemente de la fuente de carbono adicionada al medio de cultivo (Fig. 4A). En el aislado 3 crecido con tereftalato de polietileno (PET) y poliestireno (PS) también se observaron las mismas bandas de proteína, 66 y 76 kDa. En cambio, en este aislado crecido con polietileno (PE) y celofán dulce (CD), se observó una banda de proteína adicional, 103 kDa. Mientras que, en el control, crecido con glucosa, y los cultivos en presencia de carboximetilcelulosa (CMC) y celulosa cristalina (C, Avicel) se observan las bandas de proteína de 37, 51, 66, 76 y 103 kDa, mismas que aparecen en el cultivo en presencia de celofán amargo (CA), donde además se hace muy evidente una banda de 58 kDa (Fig. 4B).

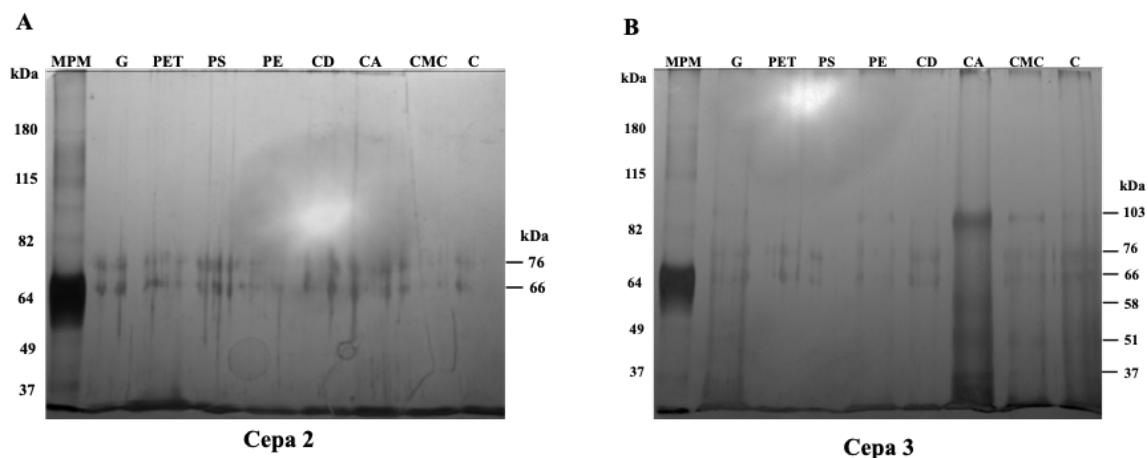


Figura 4. Perfil electroforético de las proteínas secretadas por los aislados fúngicos crecidos en MMM adicionado (0.1 % p/v) con glucosa o polímeros naturales o sintéticos, como fuente de carbono. MPM, marcadores de peso molecular; celofán dulce, (CD); carboximetilcelulosa, (CMC); y celulosa cristalina, (C); tereftalato de polietileno, (PET); poliestireno, (PS); polietileno, (PE); y celofán amargo (CA). La glucosa (G) fue utilizada como control.

## Determinación de la actividad enzimática secretada de $\beta$ -glucosidasa y celobiosidasa

Otras alícuotas del SN recuperado tras 15 días de cultivo en MMM adicionado con las diferentes fuentes de carbono (glucosa, polímeros naturales o polímeros sintéticos) fueron utilizadas para determinar la actividad enzimática secretada de 2 diferentes glicosil-hidrolasas ( $\beta$ -glucosidasa y celobiosidasa).

Como se observa en la Tabla 3., el aislado 2, si bien creció en todos los diferentes sustratos utilizados, solamente mostró actividad de  $\beta$ -glucosidasa cuando se utilizó celofán dulce (CD) y carboximetilcelulosa (CMC) como fuente de carbono, siendo mayoritaria la actividad total en presencia de ésta última (casi 20 veces) y con una actividad específica 6 veces mayor para CMC, debido a la proteína secretada que fue 3.5 veces más cuando la fuente de carbono fue CMC. En cambio, cuando se analizó la actividad de celobiohidrolasa no se logró detectarla en el sobrenadante recuperado de los cultivos tras 15 días de incubación, bajo ninguna de las condiciones de crecimiento ensayadas.

Por su parte, el aislado 3 mostró desarrollo en todas las fuentes de carbono empleadas y solamente en el polietileno (PE) no se detectó la actividad de  $\beta$ -glucosidasa (Tabla 4.). Al respecto, este aislado secretó esta enzima en el control, donde la fuente de carbono fue glucosa, sugiriendo que no está sujeta a represión catabólica. La actividad, en orden de magnitud fue mayor en CMC > CD > CA > PET > PS > G > C. Donde la actividad específica en CMC fue de 4615 nmoles 4-MU/mg/min, mientras que, en CD, la segunda fuente de carbono más propicia para la secreción de la actividad enzimática fue casi 20 veces menor, y con una



actividad total sólo 1.6 veces mayor para CMC debido a la 12 veces mayor secreción de proteína por el aislado crecido en CD.

**Tabla 3.** Determinación de la actividad enzimática secretada por el aislado 2 crecido con polímeros naturales y sintéticos

| Fuente de Carbono adicionada al MMM | Proteína total (mg) | β-Glucosidasa                       |                             | Celobiosidasa                       |                             |
|-------------------------------------|---------------------|-------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
|                                     |                     | Act. Específica (nmoles 4MU/mg/min) | Act. Total (nmoles 4MU/min) | Act. Específica (nmoles 4MU/mg/min) | Act. Total (nmoles 4MU/min) |
| Glucosa (G)                         | 4.78                | ND                                  | 0                           | ND                                  | 0                           |
| Polietilentereftalato (PET)         | ND                  | ND                                  | 0                           | ND                                  | 0                           |
| Poliestireno (PS)                   | 1.92                | ND                                  | 0                           | ND                                  | 0                           |
| Polietileno (PE)                    | ND                  | ND                                  | 0                           | ND                                  | 0                           |
| Celofán amargo (CA)                 | ND                  | ND                                  | 0                           | ND                                  | 0                           |
| Celofán dulce (CD)                  | 0.16                | 9.8                                 | 1.568                       | ND                                  | 0                           |
| Carboximetilcelulosa (CMC)          | 0.56                | 59.9                                | 33.544                      | ND                                  | 0                           |
| Celulosa cristalina (C)             | 1                   | ND                                  | 0                           | ND                                  | 0                           |

ND, no detectada

En lo que respecta a la actividad de celobiosidasa en el aislado 3 (Tabla 4.), la carboximetilcelulosa fue el mejor sustrato para inducir la actividad secretada, casi el doble de la actividad total recuperada con respecto al cultivo en celofán dulce (CD), mientras que la actividad específica fue casi 9 veces mayor, debido a la cantidad de proteína total secretada en CMC con respecto a CD, de casi 12 veces menor. En los cultivos realizados con celofán amargo (CA), la actividad total de celobiosidasa fue 10 veces menor con respecto a la recuperada en presencia de celofán dulce y 20 veces con respecto a la obtenida en presencia de carboximetilcelulosa. En el resto de los sustratos utilizados, G, PS, PE y C, no se detectó actividad de esta enzima en el sobrenadante recuperado de los cultivos tras 15 días de incubación, bajo ninguna de las condiciones de crecimiento ensayadas.



**Tabla 4.** Determinación de la actividad enzimática secretada por el aislado 3 crecido con polímeros naturales y sintéticos

| Fuente de Carbono adicionada al MMM | Proteína total (mg) | β-Glucosidasa                       |                             | Celobiosidasa                       |                             |
|-------------------------------------|---------------------|-------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
|                                     |                     | Act. Específica (nmoles 4MU/mg/min) | Act. Total (nmoles 4MU/min) | Act. Específica (nmoles 4MU/mg/min) | Act. Total (nmoles 4MU/min) |
| Glucosa (G)                         | 0.831               | 52.8                                | 43.9                        | ND                                  | 0                           |
| Polietilentereftalato (PET)         | 7                   | 11                                  | 77                          | ND                                  | 0                           |
| Poliestireno (PS)                   | 5.94                | 10.1                                | 60                          | ND                                  | 0                           |
| Polietileno (PE)                    | ND                  | ND                                  | 0                           | ND                                  | 0                           |
| Celofán amargo (CA)                 | 3.14                | 114.9                               | 361                         | 7.4                                 | 23.2                        |
| Celofán dulce (CD)                  | 3.65                | 235.34                              | 858                         | 65                                  | 237                         |
| Carboximetilcelulosa (CMC)          | 0.3                 | 4615                                | 1384                        | 1608                                | 482.4                       |
| Celulosa cristalina (C)             | 2.6                 | 8.9                                 | 23.1                        | ND                                  | 0                           |

ND, no detectada

## Conclusión

La caracterización morfológica de los aislados fúngicos indican que son hongos filamentosos, sin embargo, debido a que las características macroscópicas y microscópicas no permiten una correcta diferenciación por género y especie, es necesaria una caracterización taxonómica y molecular de ambos aislados. Esta información será muy relevante para seguir con la caracterización bioquímica de ambos aislados fúngicos, los cuales presentan actividades de β-glucosidasa y celobiosidasa secretadas, de manera diferencial, dependiendo del polímero que es utilizado como fuente de carbono, si bien, el aislado 3 produce una mayor actividad que el aislado 2.

## Bibliografía

- Ahuactzin-Pérez M, Tlecuil-Beristain S, García-Dávila J, González-Pérez M, et al. 2016. Science of the Total Environment. 556-557, 1186-1193.
- Bermúdez-García E, Peña-Montes C, Castro-Rodríguez JA, González-Canto A, Navarro-Ocaña A, Farrés A. 2017. Appl Biochem Biotechnol. 82:1014-1036.
- Carvalho CML, Aires-Barros MR, Cabral JMS. 1998. Process Biotechnology. 1998. 1(3):1- 20.
- Castro-Ochoa D, Peña-Montes C, Farrés A. 2010. Revista Especializada en Ciencias Químico- Biológicas. 13(1):16-25.
- Chávez-Ramírez MS, 2015. "Inducción, purificación y caracterización de una β-glucosidasa de *Ophiostoma piceae*". Tesis de Maestría en Ciencias (Biología), División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato.
- de Vries RP and Visser J, 2001. Microbiol Mol Biol Rev 65, 497– 522.
- Hernández-Guzmán A, Flores-Martínez A, Ponce-Noyola P, Villagómez-Castro JC. 2016. FEBS open bio 6 (11), 1067-1077.
- Jambeck JR, Geyer R, Wilcox C, Siegler TR, Perryman M, Andrady A, Narayan R, Law KL. 2015. Science. 2015. 347(6223): 768-771.
- Laemmli UK, 1970. Nature. 227 (5259): 680–685.
- Lee SS, Ha JK y Cheng KJ. 2000. Applied and Envirom Microbiol, 66(9):3807-3813. 15.
- Lowry OH, Roebrough NJ, Farr AL, y Randall RJ. 1951. J Biol Chem, 193, 265-275. 16.
- Müller RJ, Schrader H, Profe J, Dresler K, Deckwer WD. 2005. Macromol Rapid Commun. 2005. 26, 1400-1405.
- Pérez-Méndez ML. 2021. "Caracterización bioquímica y molecular de diferentes aislados fúngicos". Tesis de Licenciatura en Biología Experimental, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato.

- Ru J, Huo Y, Yang Y. 2020. *Frontiers in Microbiology*. 11, DOI. 10.3389/fmicb.2020.00442
- Ruano-Najarro MJ y Villagómez-Castro JC. 2018. *Jóvenes en la Ciencia*, 4, 1076-1082.
- Silva-Rodríguez AV. 2019. "Caracterización de microorganismos degradadores de PET". Tesis de Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato.
- Singhania R.R. 2009. Cellulolytic Enzymes. In: Singh nee' Nigam P., Pandey A. (eds) *Biotechnology for Agroindustrial Residues Utilisation*. Springer, Dordrecht
- Yoshida S, Hiraga K, Takehana Y, Taniguchi I, et al. *Science*. 2016. 351, 1196- 1199.
- Yoshida S, Hiraga K, Taniguchi I, Oda K. 2021. *Methods Enzymol*. 648, 187-205.
- Zhang J, Wang X, Gong J, Gu Z. 2004. "A study on the biodegradability of polyethylene terephthalate fiber and diethylene glycol terephthalate." *J. Appl. Polym. Sci.*, 93: 1089-1096. <https://doi.org/10.1002/app.20556>.