



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

**“Uso de los sistemas de enzimas ligninolíticas de hongos Corticales y Geastrales para la degradación de colorantes de industriales”**

Tesis presentada para optar al Título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

**Lic. Leonardo Matías Majul**

Directoras de tesis: Dra. Sonia Wirth

Dra. Laura Levin

Consejera de estudios: Dra. Laura Levin

Lugar de trabajo: Laboratorio de Micología Experimental, Instituto de Micología y Botánica, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

Buenos Aires, 2020

# "Uso de los sistemas de enzimas ligninolíticas de hongos Corticiales y Geastrales para la degradación de colorantes industriales"

## Resumen

La liberación de efluentes coloreados de la industria textil a los cursos de agua constituye un grave problema ambiental, no sólo por la toxicidad de los colorantes sino también porque pueden alterar el pH, incrementar las demandas biológica y química de oxígeno, y afectar la fotosíntesis. En la actualidad estos efluentes son tratados mediante métodos físico-químicos que presentan grandes desventajas: son costosos, energéticamente ineficientes y de versatilidad limitada. El objetivo de la presente tesis fue estudiar distintos enfoques que contribuyan al desarrollo de sistemas eficientes para la remoción de colorantes sintéticos en efluentes industriales. En una primera etapa se trabajó en el diseño de sistemas basados en el uso de Basidiomycetes lignocelulolíticos de hábito corticioide, inmovilizados sobre soportes inertes y mixtos y en la optimización de la producción de enzimas ligninolíticas. Para ello, se aislaron e identificaron mediante caracteres morfológicos y moleculares, 13 cepas de hongos corticioides, en los cuales se analizó su capacidad de producir enzimas ligninolíticas en distintos medios y condiciones de cultivo. Este análisis permitió seleccionar dos candidatos: *Phlebia uda* BAFC 4689 y *Peniophora laxitexta* BAFC 4687, debido a su capacidad para producir altos títulos de actividad lacasa en fermentación sumergida. Estos organismos se inmovilizaron en soportes mixtos constituidos por discos de esponja de poliuretano y diversos residuos lignocelulósicos. En este sistema *P. laxitexta* fue capaz de remover eficientemente hasta el 90% de los colorantes xilidina y RBBR en al menos tres ciclos de incubación consecutivos y el colorante verde de malaquita en al menos 10 ciclos, demostrando su potencial para el tratamiento de efluentes coloreados industriales. En el segundo capítulo de esta tesis se trabajó en la búsqueda de nuevas fuentes de enzimas ligninolíticas, con capacidad para degradar colorantes sintéticos. Para ello se evaluó la producción de enzimas ligninolíticas por

distintas especies de *Geastrum*: *G. argentinum* BAFC 3282, *G. triplex* BAFC 3013 y *G. schweinitzii* BAFC 3002. Estos organismos, presentes en suelos alcalinos, han sido escasamente estudiados debido a la dificultad que presentan para su cultivo. En este trabajo se optimizaron las condiciones de cultivo de estas cepas en fermentación en estado sólido, utilizando distintos sustratos lignocelulósicos, evaluándose la expresión de enzimas lignocelulolíticas a través de la cuantificación de las actividades en extractos de los cultivos y por secuenciación masiva de los transcriptomas de *G. argentinum* y *G. schweinitzii* crecidos en cascarilla de soja. El ensamblado y anotación *in silico* de los transcritos secuenciados permitió la identificación de más de 450 secuencias codificantes de enzimas activas sobre carbohidratos (CAZymes), incluyendo lacasas y peroxidasas con potencial aplicación en el tratamiento enzimático de efluentes.

# "Use of ligninolytic enzyme systems of corticioids and Geastrales fungi for the degradation of industrial dyes"

## Abstract

The release of coloured effluents from textile industries to watercourses constitutes a serious environmental problem, not only due to the toxicity of the dyes, but also because they can alter the pH, increase biological and chemical oxygen demands, and affect photosynthesis. At present, textile effluents are treated by physic-chemical methods that have great disadvantages: they are expensive, energy inefficient and of limited versatility. The objective of this thesis was to evaluate different approaches in order to develop efficient systems for the removal of dyes from industrial coloured effluents. In a first step lignocellulolytic Basidiomycetes with corticioid habit were immobilized in inert and mixed supports, and their ligninolytic enzyme production was optimized. For this, 13 strains were isolated and identified based on morphological characteristics and ITS sequences, and their capacity to produce ligninolytic enzymes in different media and culture conditions was investigated. Two strains were selected: *Phlebia uda* BAFC 4689 and *Peniophora laxitexta* BAFC 4687, due to their ability to secrete high titres of laccase in submerged fermentation. These fungi were immobilized in mixed supports consisting of polyurethane foam discs and diverse low-cost lignocellulosic residues. In this system *P. laxitexta* removed up to 90% of dyes Xylidine and RBBR, in three successive cycles, and Malachite Green in 10 repeated cycles, without any loss of efficiency, demonstrating the potential of the immobilized system for the treatment of dye-containing industrial effluents. In the second chapter of the thesis, new sources of ligninolytic enzymes were investigated. Ligninolytic enzyme production by three species of *Geastrum*: *G. argentinum* BAFC 3282, *G. triplex* BAFC 3013 and *G. schweinitzii* BAFC 3002, was evaluated. These organisms which usually grow in alkaline soils, were poorly studied up to date due to the difficulties faced during their cultivation. Firstly, culture conditions were optimized in solid state fermentation using several lignocellulosic substrates, and their lignocellulolytic enzyme production was evaluated quantifying the activities in the culture extracts and by massive sequencing of the transcriptomes of *G. argentinum* and *G. schweinitzii* grown in soybean hulls. Among total transcripts assembled and annotated *in silico*, about 450 corresponded to

sequences encoding carbohydrate active enzymes (CAZymes), including novel laccases and peroxidases with potential application in the enzymatic treatment of effluents.

## Agradecimientos

No tengo dudas en afirmar que la realización de esta tesis doctoral se encuentra solo parcialmente representada en las siguientes páginas. Esta involucró un gran desarrollo personal y emocional que jamás podría haber sido alcanzado sin el apoyo e intervención de las siguientes personas, con quienes les estoy completamente agradecidos.

Gracias a mis viejos Julio y Susana, mis hermanos Mauro y Julieta, mis tíos Marcelo y Andrea y mis abuelos Oscar, Teresa y Esther por su apoyo y cariño incondicional.

Al Dr. Leandro Papinutti, por creer en mí y apoyarme para comenzar este desafío. Lean te extrañamos.

A mis directoras, la Dra. Sonia Wirth y la Dra. Laura Levin, sin quienes esta tesis habría sido imposible. Gracias por su tutoría y crítica aguda de mis ideas, las cuales fueron necesarias para alcanzar mis metas en este periodo de formación tan intenso y azaroso.

Al INMIBO y en especial a mis amigos y compañeros del Laboratorio de Micología Experimental Fran, Vale, Maira, Ema, Juli, Isa, Euge, Marce, Eli, Luis, Pilar, Flor O., Flor B., Ani y Astrid por hacer del laboratorio un gran lugar de trabajo y encuentro, y en especial a Raúl por ser mi oído crítico y apoyo.

Al Laboratorio de Agrobiotecnología por abrir sus puertas a un micólogo y permitirme conocer un poco mas la biología molecular. En especial a mis amigos Carlotto, Furman, Mechi y Ceci por soportarme y ayudarme.

Al JUDO, a mi familia de JUDOUBA y a mis Maestro Jorge J. Repetto y Maestro Jorge A. Repetto por ayudarme a forjar mi espíritu y resiliencia.

A la Universidad Pública por enseñarme el camino del conocimiento y en especial a Exactas por ser mi segundo hogar.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Técnica (CONICET) por financiar mis estudios.

自他共榮

Jita Kyo-ei

# Índice

<b>Introducción General</b> .....	1
Los colorantes como contaminantes antropogénicos .....	2
El impacto de los colorantes .....	2
Los colorantes, clasificación.....	3
Tratamiento de colorantes.....	4
Los hongos como degradadores de contaminantes .....	6
Enzimas modificadoras de la lignina .....	9
Peroxidasas.....	10
Mn peroxidasa (MnP).....	12
Lignina peroxidasa (LiP) .....	15
Peroxidasa versátil.....	18
Peroxidasa decolorante de tintes (DyP) .....	19
Hemotiolato Peroxidasas .....	21
Lacasas .....	21
Enzimas auxiliares y productoras de peróxido de hidrógeno .....	25
Empleo de HCPBs en el tratamiento de efluentes coloreados .....	26
Inmovilización de hongos para el tratamiento de colorantes .....	29
<b>Capítulo 1 - “Selección de hongos de hábito corticioide con actividad ligninolítica para su inmovilización y tratamiento de colorantes”</b> .....	34
<b>1.1. Hipótesis y objetivos</b> .....	35
<b>Hipótesis</b> .....	35
<b>Objetivos</b> .....	35
<b>1.2. Materiales y Métodos</b> .....	36
1.2.1. Criterio de recolección de basidiomas .....	36
1.2.2. Lugares de muestreo .....	36
1.2.3. Caracteres utilizados para la identificación.....	37
1.2.4. Aislamiento.....	37
1.2.5. Identificación molecular de los aislamientos .....	38
1.2.5.1. Extracción de ADN genómico .....	38
1.2.5.2. Amplificación por PCR de la región ribosomal ITS1-5.8S-ITS2 .....	39
1.2.6. Prospección de actividad ligninolítica en medio agarizado.....	40
1.2.7. Prospección de actividad ligninolítica en medio líquido.....	41
1.2.8. Toxicidad del Cu.....	42
1.2.9. Determinaciones enzimáticas .....	42
1.2.9.1. Actividad lacasa .....	42
1.2.9.2. Peroxidasa total .....	43
1.2.10. Optimización de la producción de ligninasas por <i>Ph. uda</i> y <i>P. laxitexta</i> en medio líquido.....	43



1.2.11. Inmovilización de <i>P. laxitexta</i> y <i>Ph. uda</i> : preparación, inoculación y colonización de los soportes.....	44
1.2.12. Ensayos de remoción de colorantes por <i>P. laxitexta</i> inmovilizada .....	45
1.2.13. Evaluación de capacidad de decoloración de los sobrenadantes de cultivo con diferentes perfiles de actividad lacasa .....	47
1.2.14. Obtención de lacasas asociadas a micelio .....	47
1.2.15. Zimogramas de actividad lacasa y de decoloración de Verde de Malaquita .....	47
1.2.16. Tratamiento estadístico de los resultados.....	48
<b>1.3. Resultados</b> .....	48
1.3.1. Recolección y aislamiento de hongos con hábito de crecimiento corticioide .....	48
1.3.2. Identificación morfológica y molecular de los aislamientos .....	48
1.3.3. Selección de cepas con actividad ligninolítica .....	52
1.3.3.1. Determinación de la actividad lacasa, MnP y LiP en medio agarizado .....	52
1.3.3.2. Determinación de la actividad lacasa y peroxidasa en medio líquido .....	57
1.3.3.3. Producción de enzimas ligninolíticas por <i>Ph. uda</i> y <i>P. laxitexta</i> en medio líquido .....	59
1.3.3.4. Toxicidad del cobre sobre <i>Ph. uda</i> y <i>P. laxitexta</i> .....	59
1.3.4. Análisis de condiciones de cultivo que favorecen la producción de enzimas ligninolíticas por <i>Ph. uda</i> y <i>P. laxitexta</i> en medio líquido .....	61
1.3.5. Inmovilización de <i>P. laxitexta</i> y <i>Ph. uda</i> en soportes inertes mixtos.....	63
1.3.6. Remoción de colorantes industriales por <i>P. laxitexta</i> inmovilizada en PUF y PUF-SH.....	66
1.3.7. Extracción de lacasas asociadas al micelio .....	70
1.3.8. Inducción de la expresión de nuevas isoformas de lacasa con alta capacidad de decoloración por exposición a los colorantes .....	71
<b>1.4. Discusión</b> .....	75
1.4.1. Relevamiento de hongos corticioides y prospección de ligninasas .....	75
1.4.2. Selección de cepas en medio líquido para utilizarlas en la remoción de colorantes.....	77
1.4.3. Inmovilización de las cepas seleccionadas y análisis de la producción enzimática y remoción de colorantes sintéticos .....	78
<b>1.5. Conclusiones</b> .....	82
<b>Capítulo 2 - "Caracterización y prospección de enzimas involucradas en la degradación de lignocelulosa en cepas de <i>Geastrum</i>"</b> .....	83
<b>2.1. Hipótesis y objetivos</b> .....	84
<b>Hipótesis</b> .....	84
<b>Objetivos</b> .....	84
<b>2.2. Materiales y Métodos</b> .....	85
2.2.1. Microorganismos .....	85
2.2.2. Cultivos líquidos de <i>Geastrum</i> .....	85
2.2.3. Fermentaciones en estado sólido (SSF) de <i>Geastrum</i> .....	86
2.2.4. Extracción de ARN .....	86
2.2.5. Preparación de las bibliotecas de ADNc y secuenciación .....	87

2.2.6. Tratamiento de las secuencias y ensamblado de los transcriptomas .....	87
2.2.7. Anotación Funcional.....	88
2.2.8. Extracción de enzimática de los cultivos.....	90
2.2.9. Determinaciones enzimáticas .....	90
2.2.9.1. Endo- $\beta$ -D-1,4-glucanasa .....	90
2.2.9.2. Exo- $\beta$ -D-1,4-glucanasa .....	90
2.2.9.3. Amilasa total.....	91
2.2.9.4. Actividad $\beta$ -glucosidasa .....	91
2.2.9.5. Cuantificación de azúcares reductores.....	91
<b>2.3. Resultados .....</b>	<b>93</b>
2.3.1. Evaluación de distintas condiciones de cultivo para el crecimiento y la expresión de enzimas ligninolíticas en <i>Geastrum</i> .....	93
2.3.1.1. Cultivo y producción de ligninasas en medio líquido MG-Cu a distintos pH .....	93
2.3.1.2. Cultivo en sustratos lignocelulósicos .....	94
2.3.1.3. Producción de lignocelulasas en sustratos lignocelulosicos .....	96
2.3.2. Secuenciación y anotación de los transcriptomas de <i>G. argentinum</i> y <i>G. schweinitzii</i> crecidos en cascarilla de soja.....	98
2.3.2.1. Extracción de ARN y preparación de las bibliotecas de ADNc .....	98
2.3.2.2. Secuenciación y ensamblado <i>de novo</i> .....	99
2.3.2.3. Análisis y anotación funcional de los transcriptomas de <i>G. argentinum</i> y <i>G. schweinitzii</i> ..	101
2.3.3. Análisis de los transcritos codificantes de Enzimas Activas sobre Carbohidratos (CAZymes) en los transcriptomas de <i>G. argentinum</i> y <i>G. schweinitzii</i> .....	105
2.3.3.1. Enzimas degradadoras de celulosa.....	107
2.3.3.2. Enzimas involucradas en la degradación de hemicelulosa .....	110
2.3.3.3. Enzimas degradadoras de pectina .....	119
2.3.3.4. Enzimas involucradas en la degradación de almidón.....	123
2.3.4. Enzimas modificadoras de lignina.....	126
2.3.4.1. Oxidasas multicobre.....	126
2.3.4.2. Peroxidasas .....	131
2.3.4.3. Peroxidasas decolorantes de tintes .....	134
2.3.4.4. Superfamilia enzimática Peroxidasa-Peroxigenasa .....	137
2.3.5. Enzimas productoras de peróxido de hidrógeno .....	139
<b>2.4. Discusión .....</b>	<b>145</b>
3.4.1. Enzimas modificadoras de la lignina.....	149
3.4.1.1. Oxidasas multicobre.....	149
3.4.1.2. Peroxidasas .....	150
3.4.1.3. Enzimas productoras de peróxido de hidrógeno .....	153
<b>2.5. Conclusiones.....</b>	<b>156</b>
<b>4. Conclusiones y perspectivas generales.....</b>	<b>157</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>160</b>

# Índice de figuras

<b>Figura I:</b> Principales vías de degradación fúngica de compuestos orgánicos.....	7
<b>Figura II:</b> Fenotipo de una pudrición blanca.....	8
<b>Figura III:</b> Representación esquemática de la estructura general de la lignina y sus monómeros principales .....	9
<b>Figura IV:</b> Modelado de la estructura de la MnP de <i>P. chrysosporium</i> (1YYD).....	12
<b>Figura V:</b> Ciclo catalítico de la MnP .....	14
<b>Figura VI:</b> Modelado de la estructura de la LiP de <i>P. chrysosporium</i> (1LLP).....	16
<b>Figura VII:</b> Ciclo catalítico de la LiP .....	17
<b>Figura VIII:</b> Modelado de la estructura de la VP de <i>P. eyrinjii</i> (2BOQ).....	18
<b>Figura IX:</b> Modelado de la estructura de la DyP de <i>Auricularia auricula-judae</i> (4UZI_B).....	20
<b>Figura X:</b> Ciclo catalítico de la lacasa .....	23
<b>Figura 1.2.1:</b> Esquema de la toma de muestras para determinar el crecimiento de las cepas en medio líquido.....	42
<b>Figura 1.2.2:</b> Estructura química de los colorantes modelo VM, RBBR y Xi, utilizados en esta tesis.....	46
<b>Figura 1.3.1:</b> Detección de actividad ligninolítica en las cepas de hábito corticioide en medio MGA. ....	53
<b>Figura 1.3.2:</b> Tasa de crecimiento determinada como la variación del radio de la colonia por día para las cepas de hongos corticioides en medio MGA.....	54
<b>Figura 1.3.3:</b> Tasa de producción de actividad lacasa, LiP y MnP y respectivos índices enzimáticos .....	56
<b>Figura 1.3.4:</b> Crecimiento de <i>I. lacteus</i> BAFC 4684, <i>P. laxitexta</i> BAFC 4687, <i>Ph. uda</i> BAFC 4689, <i>F. portoricensis</i> BAFC 4680 y <i>Ps. flavidoalba</i> BAFC 4690 en GA-Cu-VA.....	58
<b>Figura 1.3.5:</b> Curvas de actividad lacasa de las cepas <i>I. lacteus</i> BAFC 4684, <i>P. laxitexta</i> BAFC 4687, <i>Ph. uda</i> BAFC 4689, <i>F. portoricensis</i> BAFC 4680 y <i>Ps. flavidoalba</i> BAFC 4690 cultivadas en medio GA-Cu-VA.....	58
<b>Figura 1.3.6:</b> Aspecto de las colonias de <i>Ph. uda</i> desarrolladas en medio de cultivo líquido MG .....	59
<b>Figura 1.3.7:</b> Crecimiento radial de <i>P. laxitexta</i> y <i>Ph. uda</i> cultivadas en placas con medio MGA suplementado con sulfato de cobre .....	60
<b>Figura 1.3.8:</b> Cinética de producción de lacasa por <i>P. laxitexta</i> y <i>Ph. uda</i> en diferentes medios de cultivo: GA, GP, GM con agregado de cobre 0,3 mM y veratril alcohol 2 mM .....	62
<b>Figura 1.3.9:</b> Esquema de los soportes diseñados compuestos por dos capas de esponja de poliuretano y una capa intermedia de sustratos lignocelulósicos.....	64
<b>Figura 1.3.10:</b> Morfología de las colonias de 21 días de crecimiento de <i>P. laxitexta</i> y <i>Ph. uda</i> cultivadas en el soporte esponja de poliuretano conteniendo cascarilla de soja. ....	64
<b>Figura 1.3.11:</b> Cinética de crecimiento de <i>P. laxitexta</i> y <i>Ph. uda</i> en los sistemas inmovilizados.....	65
<b>Figura 1.3.12:</b> Actividad lacasa detectada en cultivos de 35 días de <i>P. laxitexta</i> y <i>Ph. uda</i> inmovilizados en los soportes mixtos constituidos por esponja de poliuretano y distintos sustratos lignocelulósicos: SC; WS; SH y humedecidos con medio líquido GP-Cu-VA.....	65
<b>Figura 1.3.13:</b> Remoción de VM, RBBR y Xi por <i>P. laxitexta</i> inmovilizada en esponjas de poliuretano o en esponjas de poliuretano conteniendo cascarilla de soja y adsorción del colorante a los respectivos soportes no inoculados .....	67
<b>Figura 1.3.14:</b> C1-10: Ciclos de remoción de VM con <i>P. laxitexta</i> inmovilizado en el soporte PUF y PUF-SH con sus respectivos soportes no inoculados .....	69

<b>Figura 1.3.15:</b> Actividad lacasa del micelio de <i>P. laxitexta</i> cosechado a partir de cultivos en el soporte PUF antes de ser expuestos al colorante VM y luego de cada uno de los ciclos de remoción .....	70
<b>Figura 1.3.16:</b> Decoloración de VM, RBBR y Xi con los sobrenadantes de cultivo (conteniendo 50 U/L de lacasa) provenientes del ensayo de remoción del VM con <i>P. laxitexta</i> inmovilizado en PUF-SH antes de ser expuesto al colorante y luego del tercer ciclo .....	71
<b>Figura 1.3.17:</b> Zimogramas de actividad lacasa revelada con ABTS de los sobrenadantes provenientes de cultivos de <i>P. laxitexta</i> inmovilizados en PUF y PUF-SH previo a la exposición de los cultivos a los colorantes y luego del primer y tercer ciclo de decoloración de Xi, VM y RBBR .....	73
<b>Figura 1.3.18:</b> Zimograma de actividad lacasa revelada con DMP o el colorante VM. Las calles se sembraron con sobrenadantes provenientes de cultivos de <i>P. laxitexta</i> inmovilizados en PUF o PUF-SH obtenidos previo a la exposición al colorante y luego del tercer ciclo de remoción del VM .....	74
<b>Figura 2.2.1:</b> Esquema de la metodología utilizada el tratamiento de secuencias y ensamblado (MyM 2.2.6) y la anotación funcional de los transcritos (MyM 2.2.7) .....	89
<b>Figura 2.3.1:</b> Ejemplos de cultivos en semilla de avena y cascarilla de soja de <i>G. argentinum</i> , <i>G. triplex</i> y <i>G. schweinitzii</i> luego de 20 días de incubación. ....	95
<b>Figura 2.3.2:</b> Actividad endoglucanasa, exoglucanasa, $\beta$ -glucosidasa, amilasa, lacasa y peroxidasa determinadas en extractos de cultivo en SSF de <i>G. argentinum</i> , <i>G. triplex</i> y <i>G. schweinitzii</i> en semilla de avena, paja de trigo y cascarilla de soja. ....	97
<b>Figura 2.3.3:</b> Determinación cualitativa de dos extracciones de ARN total de <i>G. argentinum</i> , <i>G. triplex</i> y <i>G. schweinitzii</i> . ....	99
<b>Figura 2.3.4:</b> Completitud de los transcriptomas de <i>G. argentinum</i> y <i>G. schweinitzii</i> cultivados en cascarilla de soja .....	101
<b>Figura 2.3.5:</b> Comparación de las anotaciones de Gene Ontology (GO) de los transcriptomas de <i>G. argentinum</i> y <i>G. schweinitzii</i> .....	102
<b>Figura 2.3.6:</b> Frecuencia de grupos de proteínas ortólogas identificadas a partir de la base de datos de NCBI. ....	104
<b>Figura 2.3.7:</b> Distribución de familias de enzimas activas sobre carbohidratos (CAZYmes) codificadas por los transcritos expresados por <i>G. argentinum</i> y <i>G. schweinitzii</i> cultivados en cascarilla de soja. ...	106
<b>Figura 2.3.8:</b> Alineamiento de las secuencias traducidas de los transcritos GSCH14436 y GARG8354 clasificados como $\alpha$ -glucuronidasa (GH67) de <i>G. argentinum</i> y <i>G. schweinitzii</i> y las proteínas caracterizadas B3PC73 de <i>Pseudomonas cellulosa</i> , 1GQL_Bde <i>Cellvibrio japonicus</i> y Q96WX9 de <i>Aspergillus niger</i> . ....	117
<b>Figura 2.3.9:</b> Análisis filogenético de glicosil hidrolasas 67 (GH67) .....	118
<b>Figura 2.3.10:</b> Regiones correspondientes a las signature L1-L4 de los alineamientos de las secuencias traducidas de los transcritos clasificados como lacasas de <i>G. argentinum</i> y <i>G. schweinitzii</i> . ....	131
<b>Figura 2.3.11:</b> Análisis filogenético de peroxidasas fúngicas clase II .....	132
<b>Figura 2.3.12:</b> Alineamientos de las secuencias traducidas de los transcritos clasificados como MnPs de <i>G. argentinum</i> y <i>G. schweinitzii</i> . ....	134
<b>Figura 2.3.13:</b> Alineamientos de las secuencias traducidas de los transcritos clasificados como peroxidasa decolorantes de tintes (DyP) de <i>G. argentinum</i> y <i>G. schweinitzii</i> . ....	136
<b>Figura 2.3.14:</b> Alineamientos de las secuencias traducidas de los transcritos pertenecientes a la superfamilia Peroxidasa-Peroxygenasa de <i>G. argentinum</i> y <i>G. schweinitzii</i> . ....	139
<b>Figura 2.3.15:</b> Alineamiento de las regiones C terminal de las secuencias GSCH11421, MOX de <i>Coprinopsis cinerea</i> (XP_001838223.2), <i>Gloeophyllum trabeum</i> (ABI14440.1), <i>Moniliophthora perniciosa</i> (AF055203.1) .....	140

# Índice de tablas

<b>Tabla i:</b> Resumen de las enzimas extracelulares involucradas en la biodegradación de lignina .....	24
<b>Tabla 1.2.1:</b> Primers utilizados para la amplificación de la la región ribosomal ITS1-5.8S-ITS2 .....	39
<b>Tabla 1.2.2:</b> Ciclo de amplificación de las regiones ITS.....	40
<b>Tabla 1.2.3:</b> Sustratos utilizados para el revelado de cada actividad enzimática en medio MGA .....	41
<b>Tabla 1.3.1:</b> Listado de cepas .....	49
<b>Tabla 1.3.2:</b> Crecimiento y producción de lacasa al día 21 de incubación de <i>Ph. uda</i> y <i>P. laxitexta</i> en los diferentes medios de cultivo: GA, GP, GM con agregado de 0,3 mM cobre (Cu) y 2 mM veratril alcohol (VA).....	63
<b>Tabla 1.3.3:</b> Actividad lacasa determinada al final de 3 ciclos consecutivos de remoción de Xi, VM o RBBR producida por <i>P. laxitexta</i> inmovilizada en PUF o PUF-SH.....	68
<b>Tabla 1.3.4:</b> Actividad lacasa de los tratamientos de remoción del VM, luego de 24 h de incubación con <i>P. laxitexta</i> inmovilizada en PUF o PF-SH en diez ciclos consecutivos (C1 a C10) .....	69
<b>Tabla 2.3.1:</b> Tasa de crecimiento de <i>G. argentinum</i> , <i>G. triplex</i> y <i>G. schweinitzii</i> en medio MG.....	93
<b>Tabla 2.3.2:</b> Crecimiento de <i>G. argentinum</i> , <i>G. triplex</i> y <i>G. schweinitzii</i> en medio MG-Cu a pHs 6, 7 y 8 y actividades lacasa y peroxidasa total, en los sobrenadantes de cultivo, determinadas a pHs 3,6 y 5, respectivamente.....	94
<b>Tabla 2.3.3:</b> Determinación semicuantitativa del crecimiento de <i>G. argentinum</i> , <i>G. triplex</i> y <i>G. schweinitzii</i> luego de 45 días de incubación en SSF utilizando semillas de avena, paja de trigo o cascarilla de soja como sustrato o en medio líquido conteniendo el extracto proveniente de su maceración. ....	95
<b>Tabla 2.3.4:</b> Resumen de las secuenciaciones y ensamblados de los transcriptomas de <i>G. argentinum</i> y <i>G. schweinitzii</i> crecidos en cascarilla de soja .....	100
<b>Tabla 2.3.5:</b> Enzimas degradadoras de celulosa en <i>G. argentinum</i> .....	108
<b>Tabla 2.3.6:</b> Enzimas degradadoras de celulosa en <i>G. schweinitzii</i> .....	109
<b>Tabla 2.3.7:</b> Enzimas degradadoras de hemicelulosa en <i>G. argentinum</i> .....	112
<b>Tabla 2.3.8:</b> Enzimas degradadoras de hemicelulosa en <i>G. schweinitzii</i> .....	114
<b>Tabla 2.3.9:</b> Enzimas degradadoras de pectina en <i>G. argentinum</i> .....	120
<b>Tabla 2.3.10:</b> Enzimas degradadoras de pectina en <i>G. schweinitzii</i> . ....	122
<b>Tabla 2.3.11:</b> Enzimas degradadoras de almidón en <i>G. argentinum</i> .....	124
<b>Tabla 2.3.12:</b> Enzimas degradadoras de almidón en <i>G. schweinitzii</i> . ....	125
<b>Tabla 2.3.13:</b> Oxidasas multicobre de <i>G. argentinum</i> .....	126
<b>Tabla 2.3.14:</b> Oxidasas multicobre de <i>G. schweinitzii</i> .....	127
<b>Tabla 2.3.15:</b> Caracterización in silico de las secuencias de las lacasas .....	127
<b>Tabla 2.3.16:</b> Porcentaje de similitud entre las lacasas putativas y del mejor resultado en la base de datos non redundant NR (NCBI) .....	128
<b>Tabla 2.3.17:</b> Peroxidasas de <i>G. argentinum</i> .....	136
<b>Tabla 2.3.18:</b> Peroxidasas de <i>G. schweinitzii</i> .....	137
<b>Tabla 2.3.19:</b> Glucosa-Metanol-Colina oxidorreductasas de <i>G. argentinum</i> .....	142
<b>Tabla 2.3.20:</b> Glucosa-Metanol-Colina oxidorreductasas de <i>G. schweinitzii</i> . ....	144

**- Introducción General -**

## **Los colorantes como contaminantes antropogénicos**

La humanidad utiliza colorantes desde tiempos remotos. El registro más antiguo data de al menos 180.000 años: los Neandertales empleaban rojo ocre (óxido de hierro) para recubrir los cuerpos durante los rituales de entierro. El uso de colorantes orgánicos se inició en Egipto 4000 años atrás: utilizaban índigo para teñir momias. Las técnicas de tinción a nivel industrial se basaron primordialmente en colorantes orgánicos hasta fines del siglo XIX.

La introducción de colorantes sintéticos se produce luego del descubrimiento de la mauveína sintetizada por Perkin en 1856 (Gordon & Gregory, 2012). En la actualidad más de diez mil diferentes tipos de pigmentos y colorantes sintéticos son utilizados por una gran cantidad de industrias: textil, papelera, cosmética, farmacéutica y alimenticia entre otras. El éxito en su implementación se basa en su estabilidad, amplia variedad de colores y disponibilidad, gracias a su obtención mediante síntesis química (Venkataraman, 2012). Dependiendo del tipo de colorante, se estima que del 2 al 50% de estos compuestos se desechan en las aguas residuales y se consideran como contaminantes persistentes que no pueden removerse con los métodos convencionales de tratamiento de aguas, debido a que presentan estructuras complejas y a su origen sintético (Zuorro et al., 2013).

Cerca de la mitad de los colorantes producidos a nivel mundial es utilizada en la industria textil en el proceso de teñido (Nousiainen, 1997). Esta industria utiliza colorantes, los cuales a pesar de aplicarse mediante procesos altamente eficientes, tienen una pérdida de 2-20%. Sumado a esto, la ausencia de tratamientos sustentables de efluentes provoca su descarga a cuerpos de agua, volviendo a la industria textil una de las principales fuentes de contaminación (Lee, 2017).

## **El impacto de los colorantes**

La contaminación ambiental provocada por los colorantes industriales tiene un alto impacto al descargarse en los cuerpos de agua. Provocan cambios de coloración generando no sólo problemas estéticos, sino también en la cadena trófica. En bajas concentraciones (< 1 ppm) estos colorantes disminuyen la penetración de la luz y en

consecuencia la tasa fotosintética de los organismos allí presentes y la cantidad de oxígeno disuelto (Gómez et al., 2008; Lellis et al., 2019). Otro de los factores que contribuyen al impacto ambiental asociado al uso de colorantes, es el volumen de agua necesario para su aplicación y por lo tanto el volumen de efluentes resultante. En promedio, en la producción de 1 Kg de fibra textil se consumen 100 L de agua (Bhatia, 2017). Los efluentes de la industria textil se caracterizan por fluctuaciones extremas en muchos parámetros como: demanda química de oxígeno, pH (generalmente alcalino), sólidos totales y color. La composición del agua residual dependerá de las sustancias y colorantes que se usen durante el proceso.

Los colorantes no sólo son contaminantes ambientales, pueden también afectar la salud humana. Pueden generar toxicidad aguda por ingestión oral e inhalación, como así también irritación ocular y dermatitis. Los colorantes textiles reactivos y dispersos causan principalmente problemas asociados a toxicidad aguda (Tronnier, 2002). La exposición a largo plazo a colorantes puede ocasionar enfermedades crónicas y se han observado efectos mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos. Debido a sus efectos carcinogénicos, diversos colorantes azoicos han sido prohibidos en la Unión Europea y EE. UU. (Christie et al., 2007).

## **Los colorantes, clasificación**

Los colorantes tienen diferentes estructuras químicas derivadas de compuestos aromáticos o heteroaromáticos. Estos pueden diferir principalmente en sus cromóforos y auxocromos. Los colorantes utilizados a nivel industrial son principalmente los azoicos, antraquinónicos, indigoides, xantenos, arilmetanos y derivados de aftalocianinas (Gomes, 2001).

Los colorantes también pueden ser clasificados por su modo de uso y aplicación. Los colorantes ácidos son utilizados para teñir poliamidas y sustratos proteicos como nailon, lana y seda, debido a que en solución forman cationes cuya carga les permite asociarse a sustratos con carga neta negativa. De manera opuesta, los colorantes básicos forman moléculas con carga neta positiva, siendo afines a polímeros como acetonitrilos y fibras proteicas como la seda y la lana. Los colorantes dispersos se utilizan para sustratos de naturaleza hidrofóbica como poliésteres y acetatos, aunque también para polietileno y acetato de celulosa. Por último, los colorantes directos y



reactivos son usados en sustratos que contienen celulosa como el algodón, rayón, lino y papel (Hunger, 2007).

## **Tratamiento de colorantes**

Las normas respecto a tratamientos de efluentes coloreados fueron modificándose. Hasta 1920 en EE. UU. era posible descargar los efluentes industriales al sistema municipal sin tratamiento previo, siendo su coloración un factor de baja importancia legal. Gracias a las políticas ambientales actuales los límites tolerables de descarga de los efluentes se han endurecido, constituyendo en países centrales (como EE. UU. o miembros de la U.E.) un factor que puede llevar al cierre de empresas (Christie, 2007).

En las últimas décadas la comunidad científica se ha esforzado en desarrollar tratamientos eficientes de remoción de colorantes. A pesar de esto, no se han podido establecer tratamientos generales o únicos debido a la heterogeneidad de los efluentes.

Dependiendo de la naturaleza de las tecnologías involucradas, los tratamientos pueden ser clasificados como: físicos, químicos y biológicos. Entre ellos la degradación enzimática (tratamiento biológico) y la adsorción (físico) se mencionan entre los métodos más promisorios (Katheresan et al., 2018; Misra et al., 2020).

### **Métodos físicos:**

**Adsorción:** remueve eficientemente diversos colorantes, se utilizan materiales como carbón activado, sílica y residuos agroindustriales lignocelulósicos, entre otros.

**Intercambio iónico:** efectivo para remover colorantes catiónicos y aniónicos.

**Filtración por membrana:** se utilizan para remover colorantes que se encuentran en bajas concentraciones, abarca técnicas de separación como microfiltración, nanofiltración, ultrafiltración y osmosis inversa para la recuperación de compuestos activos. Las principales desventajas de las tecnologías de membrana son su elevado consumo energético y la generación de un nuevo efluente fuertemente coloreado (de menor volumen, pero más concentrado) que debe ser tratado por pirólisis. Los

procesos de ensuciamiento y colmatación de la membrana también son inconvenientes a tener en cuenta.

#### Métodos químicos:

Entre otros abarcan métodos electroquímicos, fotoquímicos, coagulación-floculación y tratamientos por oxidación. Estos últimos son muy usados ya que requieren bajos tiempos de reacción. En este proceso las moléculas se oxidan hasta obtener compuestos de menor peso molecular como aldehídos, carboxilatos, sulfatos o nitrógeno. La principal desventaja de estos tratamientos es que agregan a los efluentes compuestos de alto impacto ambiental como clorados los cuales pasan a formar parte de los efluentes (Namboodri et al., 1994). Otro tratamiento químico por oxidación ambientalmente más compatible es el que utiliza peróxido de hidrógeno y reactivos de Fenton como sulfato de hierro. En este proceso se generan radicales hidroxilo, que atacan las moléculas orgánicas provocando su decoloración. El uso de estas técnicas sigue en proceso de investigación, persistiendo aun como desventaja los largos tiempos de proceso requeridos (Nidheesh et al., 2013).

#### Métodos biológicos:

En este caso, la decoloración puede ser resultado de la retención física o adsorción del colorante en la biomasa microbiana (biosorción) o de su transformación bioquímica o enzimática por el metabolismo celular (biodegradación). Sin embargo, la biosorción como único método no se ha aplicado al tratamiento de aguas residuales en gran escala, debido a los problemas asociados con el manejo de la biomasa residual obtenida durante el proceso (Cortázar-Martínez et al., 2012).

Biodegradación: existe una amplia variedad de microorganismos que pueden degradar colorantes, entre ellos bacterias y hongos. Los hongos causantes de pudrición blanca (HCPBs) son los organismos más estudiados en la degradación de colorantes (Deshmukh et al., 2016; Patel et al., 2020), debido a que son capaces de degradar sustratos complejos a través de su sistema enzimático ligninolítico no específico (Martínez et al., 2018). La acción decolorante de los hongos causantes de pudrición blanca fue reportada por primera vez por Glenn & Gold (1983) quienes evaluaron la decoloración de tintes poliméricos sulfonados utilizando *Phanerochaete*

*chrysosporium*. Algunas de las enzimas que se utilizan en la degradación de colorantes son lacasas, peroxidasas, monooxigenasas y dioxigenasas entre otras (Kandelbauer & Guebitz, 2005).

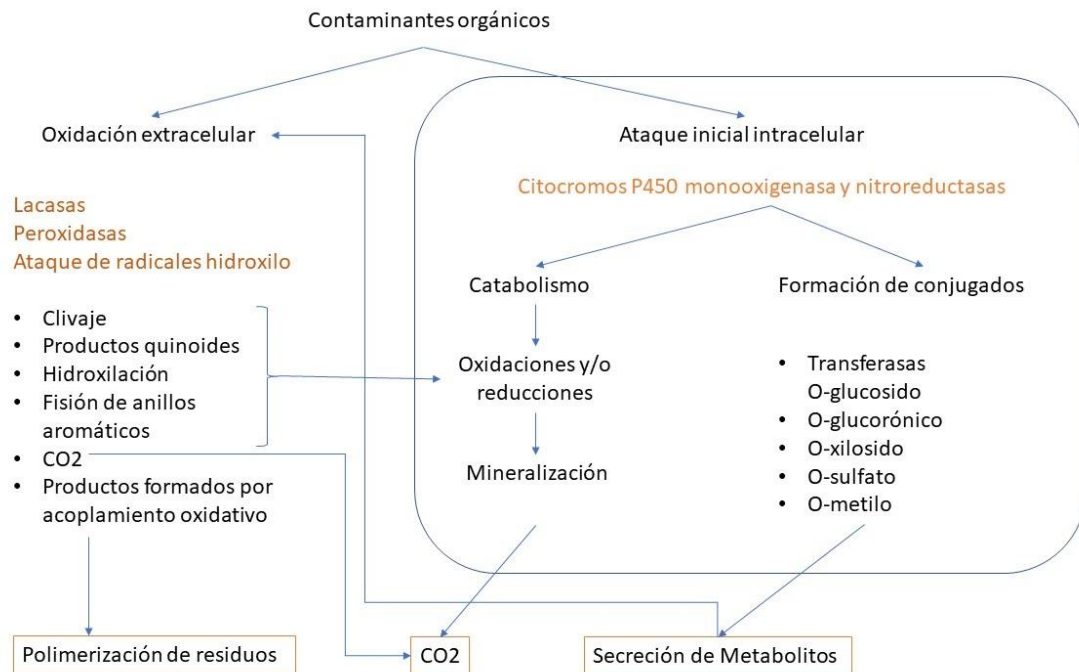
Entre los métodos descritos, la combinación de procesos de adsorción de los colorantes a un sustrato y la remoción por biosorción y degradación enzimática fúngica utilizando hongos cultivados en residuos lignocelulósicos produjo excelentes resultados (Katheresan et al., 2018).

## **Los hongos como degradadores de contaminantes**

Los hongos colonizan un amplio rango de ambientes, incluyendo hábitats extremadamente desfavorables por su temperatura, pH y abundancia de nutrientes (Hawksworth, 1991). Se nutren de forma heterótrofa, y crecen en ambientes en los que pueden suplirse fácilmente de compuestos orgánicos (principalmente polímeros) (Cooke & Rayner, 1984). Sin embargo, su capacidad de acceder y explotar distintas fuentes de nutrientes, estableciendo nichos, varía ampliamente. Entre las estrategias nutricionales desarrolladas por estos organismos se destaca la saprotrofia que utiliza como fuente de nutrientes materia orgánica que no proviene de un ser vivo, por ejemplo, restos lignocelulósicos (Cannon & Sutton, 2004).

Los hongos saprótrofos juegan un rol central en la descomposición de la materia orgánica y en los ciclos biogeoquímicos, tanto en ambientes naturales como en antropogénicos. Su habilidad para degradar materia orgánica y eficiencia para detoxificar sustratos contaminados les permite proliferar en condiciones letales para otros organismos (Anastasi et al., 2013; Deshmukh et al., 2016). Las vías involucradas en el metabolismo de contaminantes orgánicos varían dependiendo del tipo xenobiótico y de los organismos responsables la degradación (Figura i). Se pueden dividir en tres tipos, cada una asociada a diferentes mecanismos enzimáticos: reacciones de metabolismo parcial, metabolismo completo utilizando los contaminantes como única fuente de carbono y de degradación completa en presencia de sustratos compatibles (cometabolismo). El ataque inicial de los xenobióticos puede ocurrir extracelularmente (por acción de oxidasas ligninolíticas -lacasas y peroxidasas-) o intracelularmente (por acción de citocromo P-450 monooxigenasas). Los metabolitos producto de la oxidación extracelular pueden continuar su degradación intracelularmente o adherirse a partículas

del suelo. Los metabolitos resultantes de degradación intracelular pueden ser excretados y atacados luego por enzimas extracelulares o polimerizarse por oxidación abiótica.



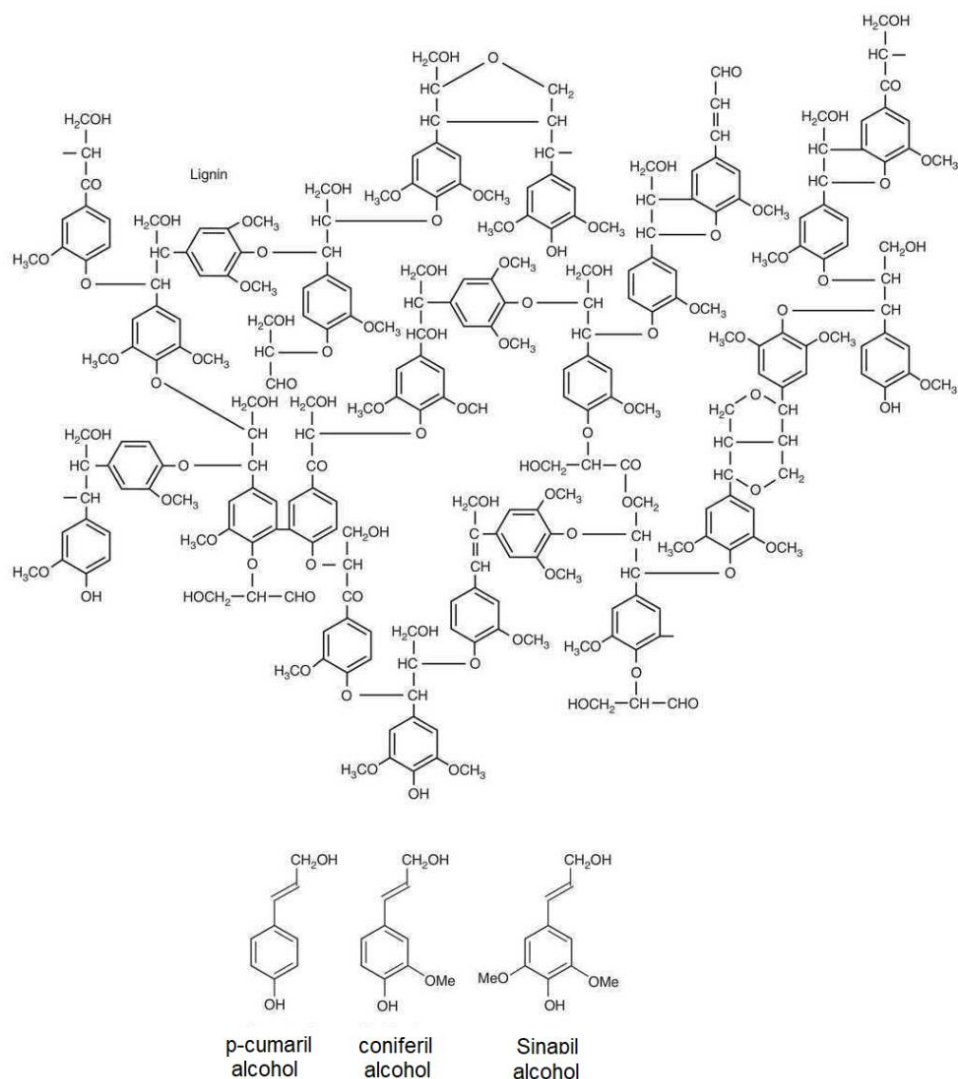
**Figura i:** Principales vías de degradación fúngica de compuestos orgánicos. El ataque al contaminante puede ocurrir extra o intracelularmente. Los metabolitos generados durante la oxidación extracelular pueden estar sujetos a catabolismo intracelular o pueden quedar adheridos al suelo. Tanto los metabolitos tóxicos, como los contaminantes que ingresan a la célula pueden ser degradados hasta su mineralización, directamente secretados y tratados extracelularmente o ser conjugados y secretados (Extraído y modificado de Harms et al., 2011).

Entre los organismos que utilizan como sustrato la madera, se destacan los hongos causantes de pudrición blanca (HCPBs). Este grupo es polifilético ya que se clasifica de forma ecofisiológica y abarca principalmente Basidiomycetes y algunos Ascomycetes del orden Xylariales (Rayner & Boddy, 1988; Floudas et al., 2012). El nombre de este grupo se debe a los cambios morfológicos que originan en la madera. La madera colonizada por los HCPBs se torna fibrilar y pasa de color castaño a blanco, debido a la degradación de la lignina, un polímero fenólico que forma parte de las paredes celulares vegetales (Figura ii) (Hubert, 1931; Daniel, 2016).



**Figura ii:** Fenotipo de una pudrición blanca. En la imagen se puede observar la morfología fibrilar de la madera y el blanqueado resultante de la colonización fúngica.

La pared celular vegetal se compone por tres capas: “pared celular primaria”, “pared secundaria” y “laminilla media”. La pared primaria se deposita durante el proceso de crecimiento celular y está compuesta por distintos polisacáridos: celulosa, hemicelulosa y pectina. La pared secundaria se forma luego de la primaria en algunas plantas (como las leñosas) y se ubica entre la membrana plasmática y la pared primaria. Está constituida por celulosa, hemicelulosa (principalmente xilano) y lignina. El agregado de lignina a la pared celular no sólo la vuelve más rígida e hidrofóbica, sino que también establece una barrera que bloquea el acceso de los microorganismos a los carbohidratos que conforman la pared (Taiz & Zeiger, 2006). Los hongos son organismos absorbotróficos, digieren los polímeros de las paredes celulares vegetales (celulosa y hemicelulosas) por medio de enzimas extracelulares y luego absorben los monómeros u oligómeros producto de su degradación. Sin embargo, la degradación de lignina es un proceso complejo debido principalmente a su estructura (Figura iii). Esta se compone por monolignoles (p-cumaril, coniferil y sinapil alcohol) e intermediarios metabólicos de estos (5-hidroxiconiferil alcohol, hidroxicinamilaldehído y ácido hidroxicinámico) unidos de forma heterogénea mediante diversos enlaces C-C y éter no hidrolizables, conformando estructuras altamente heterogéneas (Kubicek et al., 2012).



**Figura iii:** Representación esquemática de la estructura general de la lignina y sus monómeros principales (Watkinson et al., 2015).

### Enzimas modificadoras de la lignina

La degradación de la lignina se puede definir como una “combustión enzimática” en la que están involucradas oxidoreductasas del tipo fenoloxidasas como la lacasa (Lac, E.C. 1.10.3.2) y peroxidasas pertenecientes a la superfamilia peroxidasa-catalasa tales como la Mn peroxidasa (MnP, E.C. 1.11.1.13), la lignina peroxidasa (LiP, E.C. 1.11.1.14) y la peroxidasa versátil (VP, E.C. 1.11.1.16).

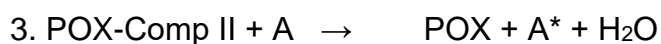
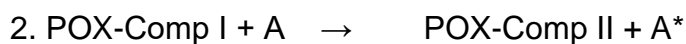
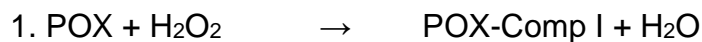
Lacasas y peroxidasas oxidan la lignina generando radicales aromáticos. Estos pueden producir reacciones no enzimáticas que también intervienen en el proceso de degradación. Estas oxidoreductasas utilizan diferentes cofactores involucrados en las

reacciones redox, como el hemo en el caso de las peroxidasas, y cobre en las lacasas. Estos cofactores son oxidados por diferentes especies de oxígeno,  $O_2$  en las lacasas y  $H_2O_2$  en el caso de las peroxidasas (obteniendo  $H_2O$  como producto). Luego del proceso de oxidación, las proteínas son nuevamente reducidas al oxidar diferentes sustratos como compuestos no aromáticos (LiP y VP) y fenólicos (Lac, VP, MnP), Mn (MnP y VP). Las VPs y LiPs son capaces de catalizar la depolimerización de lignina y la ruptura de modelos no fenólicos de lignina y se caracterizan por tener los mayores potenciales de óxido-reducción. Recientemente se descubrieron nuevos tipos de peroxidasas involucradas en el proceso de degradación de madera por Basidiomycetes. Entre estas encontramos a las peroxidasas decolorantes de tintes (DyPs) y a las hemotiolato peroxigenasas (HTPs) (Martínez et al., 2018). Las lacasas y peroxidasas tienen un amplio rango de sustratos lo que permite su aplicación en diversos procesos industriales que involucren oxidaciones, como puede ser el tratamiento de efluentes con colorantes. Contribuyen a la degradación de lignina, enzimas productoras de peróxido de hidrógeno necesarias para el funcionamiento de las peroxidasas como la glioxal oxidasa (GLOX, E.C. 1.2.3.5) y aril alcohol oxidasa (AAO, E.C. 1.1.3.7) entre otras, así como también mecanismos radicalarios no enzimáticos. Asimismo, intervienen en el proceso actividades reductoras como la celobiosa dehidrogenasa (CDH, E.C. 1.1.99.18) que oxida celobiosa (a celobionolactona), celodextrinas y otros carbohidratos y reduce quinonas y radicales fenoxilo, producidos por la acción de las ligninasas (Martínez et al., 2005).

## **Peroxidasas**

Las peroxidasas fúngicas son las enzimas con mayor incidencia en la oxidación de la lignina. Estas enzimas catalizan la oxidación de una amplia cantidad de compuestos utilizando como dador de electrones hidroperóxidos orgánicos (R-OOH) o peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Las peroxidasas expresadas en los HCPBs contienen en su sitio activo un grupo prostético protoporfirina IX (grupo hemo) lo que las clasifica como hemoperoxidasas. Este cofactor interviene en el pasaje de electrones y en consecuencia todas las hemoperoxidasas comparten mecanismos similares de oxidación. Durante la reacción, el peróxido actúa como dador de electrones primario (oxidante), del que se derivan dos electrones que reducen gradualmente la enzima a

estados intermediarios (componentes I y II), generando la liberación de dos moléculas de agua (reducción del peróxido) y el consecuente retorno al estado inicial de la enzima (Dunford, 1991). Las reacciones catalizadas por los miembros de esta familia de enzimas generalmente producen radicales orgánicos ( $AX^*$ ), los cuales rápidamente generan las subsecuentes reacciones químicas que conllevan a la formación de productos oxidados o acoplados (Hammel & Cullen, 2008; Lundell et al., 2010).



Las hemoperoxidasas conforman 4 superfamilias que evolucionaron de forma independiente: (1) peroxidasa-catalasa, (2) peroxidasa-ciclooxigenasa, (3) peroxidasa-clorito dismutasa y (4) peroxidasa-peroxigenasa. Cada superfamilia desarrolló un plegamiento particular de sus dominios y secuencias “firma” (*signature*) propias. Las peroxididasas fúngicas tradicionales asociadas a la degradación de lignocelulosa son las MnPs, LiPs y VPs, las cuales forman parte de la Clase II de la superfamilia peroxidasa-catalasa. Las enzimas pertenecientes a esta superfamilia poseen una secuencia “firma” que incluye la triada de aminoácidos distales al Hemo R-W/F-H y la triada proximal H-W/F-D (Zámocký et al., 2015).

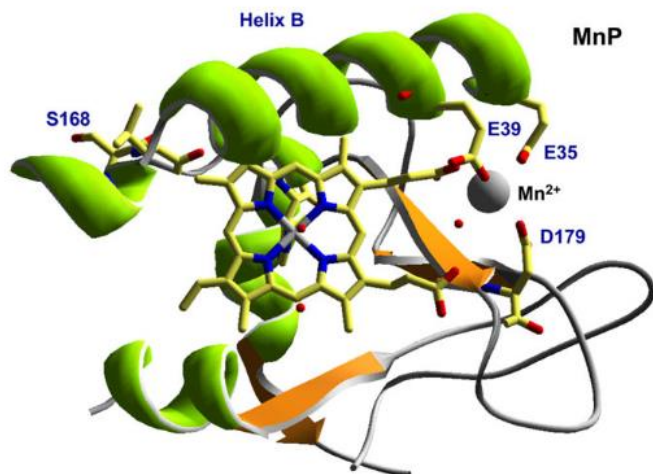
La estructura de las peroxididasas ligninolíticas se encuentra conservada en un grado mayor que sus secuencias primarias (Zámocký et al., 2010). Estas enzimas comparten su estructura terciaria general y topografía helicoidal con las peroxididasas Clase I (como la citocromo C peroxidasa mitocondrial). La especificidad de sustrato se encuentra modulada por cambios cercanos a la superficie de las enzimas, no mostrando modificaciones topográficas. Son enzimas principalmente globulares formadas por entre 10-12  $\alpha$ -hélices que conforman 2 dominios los cuales delimitan la cavidad central en la que se ubica el grupo hemo. La estructura de estas proteínas se encuentra estabilizada por puentes disulfuro (4-5) y 2 cationes  $\text{Ca}^{2+}$  (Martínez, 2002).

En la última década se describieron nuevos tipos de peroxididasas que aparentan tener un rol en la oxidación de la lignina en los HCPBs como las DyPs pertenecientes a la superfamilia peroxidasa-clorito dismutasa (Yoshida & Sugano, 2015) y las HTPs asociadas a la superfamilia peroxidasa-peroxigenasa (Hofrichter et al., 2015).



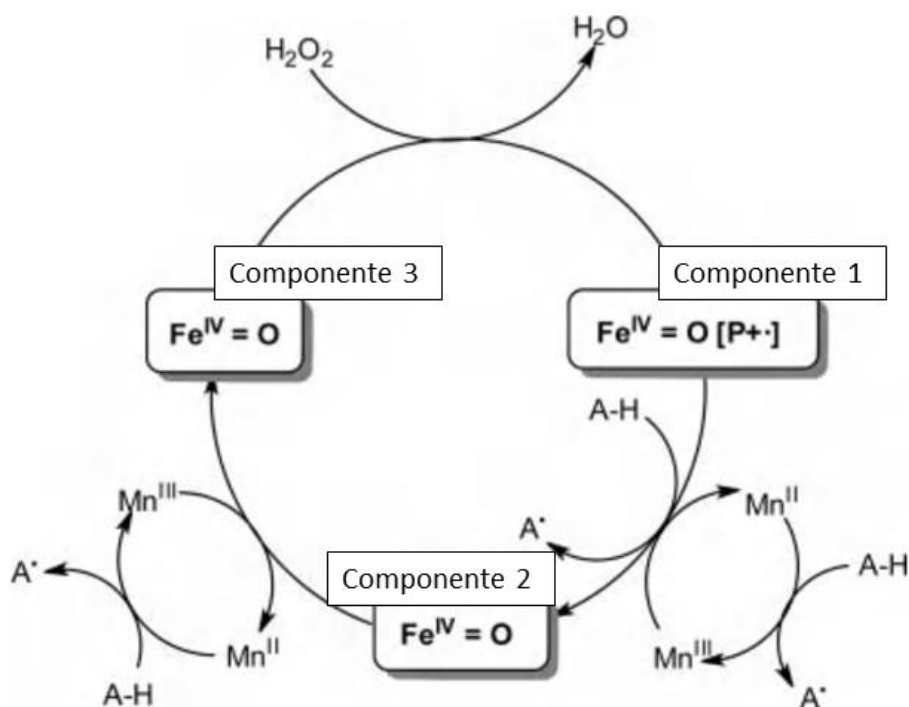
## Mn peroxidasa (MnP)

Las MnPs (EC1.11.1.13) son glicoproteínas ácidas con puntos isoeléctricos entre 4-5 y una masa molecular de aproximadamente 45 kDa. Se caracterizan por utilizar como compuesto aceptor de electrones en su ciclo catalítico al  $Mn^{2+}$ . La enzima oxida  $Mn^{2+}$  a  $Mn^{3+}$  y el  $Mn^{3+}$ , complejo con ácidos carboxílicos de función quelante, actúa como mediador redox difusible capaz de oxidar lignina y compuestos fenólicos (Sundaramoorthy et al., 1994). La estructura de la MnP de *P. chrysosporium* se diferencia de otras peroxidadas del mismo grupo, contener 10 residuos cisteína, que conforman 5 puentes disulfuro, uno más del encontrado en las LiPs y probablemente involucrado en la formación del sitio de unión a Mn. El sitio activo de la MnP es similar al de otras peroxidadas fúngicas, el bolsillo de unión a peróxido está conformado por una H y R distales las cuales funcionan como catalizador ácido-base en la formación del componente I. Por otro lado, el sitio de unión a Mn se establece por la hexacoordinación de los oxígenos de los grupos carboxilatos de los residuos E35, E39 y D179 (teniendo como referencia la MnP de *P. chrysosporium*, 1YYD), en conjunto con los oxígenos del grupo Hemo-propionato y de dos moléculas de agua (Figura iv). Estas enzimas se unen a iones calcio que actúan como estabilizadoras del sitio activo (Kubicek, 2013).



**Figura IV:** Modelado de la estructura de la MnP de *P. chrysosporium* (1YYD). En esta figura se puede observar la vista axial de la región Hemo mostrando los residuos que forman el sitio de unión a Mn (E35, E39 y D179) (Tomado de Ruiz-Dueñas et al., 2009).

El ciclo catalítico de las MnP fue descrito a partir de una isoenzima aislada de *P. chrysosporium* (Figura iv). Este se inicia con la unión de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) o un peróxido orgánico (ROOH) al estado nativo de la enzima, formando el complejo hierro-peróxido. En el siguiente paso de reacción se forma el intermediario  $Fe^{4+}$ -oxo-porfirin-radical MnP-compuesto I, a partir de la transferencia de 2 electrones desde el grupo hemo para el clivaje del enlace oxígeno-oxígeno del peróxido. La ruptura heterocatalítica del enlace dioxígeno libera como producto una molécula de agua. En el subsecuente paso de reducción, un ion  $Mn^{2+}$  actúa como compuesto dador de 1 electrón para formar  $Mn^{3+}$  y el intermediario de oxidación Mn-P compuesto II ( $Fe^{4+}$ -oxo-porfirin). Finalmente, la reducción del compuesto II al estado nativo de la enzima se produce por medio de la oxidación una nueva molécula de  $Mn^{2+}$  a  $Mn^{3+}$  y la liberación de una segunda molécula de agua. Por otro lado, para la reducción del estado intermediario componente 2 se debe oxidar una nueva molécula de  $Mn^{2+}$  y de esta manera se completa el ciclo catalítico (Hofrichter, 2002). El  $Mn^{3+}$  formado durante los pasos de reducción de la enzima, actúa como mediador redox y es capaz de oxidar gran cantidad de moléculas orgánicas, aunque no oxida ligninas lineales modelo. Diversos estudios muestran que las MnPs cumplen un rol en la degradación de la lignina vía radicales libres de tiol y derivados lipídicos que son capaces de oxidar ligninas lineales y otros compuestos no fenólicos, lo que denota la importancia de mediadores en este proceso (Martínez, 2002). Por otro lado, el pequeño tamaño del  $Mn^{3+}$  permite a los hongos actuar sobre moléculas inaccesibles para la enzima (Glenn et al., 1986). A su vez, durante el proceso de degradación de lignina se genera ácido oxálico, el cual actúa como quelante de Mn y estabilizador de la producción de  $Mn^{3+}$ , promoviendo la actividad enzimática (Kuan & Tien, 1993). Por otro lado, las MnPs son capaces de realizar peroxigenaciones lipídicas, en estas reacciones generan radicales lipídicos peroxilo que pueden atacar estructuras fenólicas no lineales de la lignina. Este mecanismo se observó en la MnP purificada del hongo de hojarasca *Stropharia coronilla*, la cual mostro actividad oxidativa *in vitro* sobre compuestos modelo de lignina no fenólicos al ser acoplada a peroxigenaciones lipídicas. Este tipo de estrategias podría estar relacionada con la ausencia de otras peroxidases de alto potencial de oxidación en hongos de hojarasca (Kapich et al., 2005).



**Figura v:** Ciclo catalítico de la MnP (Kubicek, 2012)

El estudio de numerosas MnP purificadas permitió establecer su rango óptimo de pH entre 4-7 con un pico máximo a pH 5,5. A su vez, su temperatura de actividad es amplia, entre 5-70°C con un óptimo entre 50-60°C y en general a temperaturas superiores a 65°C la enzima sufre una rápida pérdida de actividad (Chowdhary et al., 2019).

Las MnPs constituyen una familia génica subdividida en 2 grupos, las MnPs “largas” (Long MnPs; MnPs) y las MnPs “cortas” (Short MnPs; shMnPs) (Hofrichter et al., 2010; Ruiz-Dueñas et al., 2011). El nombre de los grupos se debe a que las MnPs largas poseen una cadena C-terminal adicional respecto a las MnPs descritas inicialmente en el hongo *P. chrysosporium*. Por otro lado, estos grupos muestran diferencias a nivel bioquímico. Las enzimas de ambos subgrupos son capaces de utilizar como intermediario el  $\text{Mn}^{2+}$  en su ciclo catalítico, pero en el caso de las MnPs son completamente dependientes, mientras que las shMnPs son capaces de oxidar fenoles, aminas y colorantes en su ausencia (Morales et al., 2012). A partir del descubrimiento de las shMnPs en el hongo *Phlebia radiata* (Hilden et al., 2005), se reclasificaron a shMnPs, otras MnPs previamente descritas como las MnP2 y MnP3 de *Pleurotus ostreatus* (Salame et al., 2010; Ruiz-Dueñas et al., 2011).

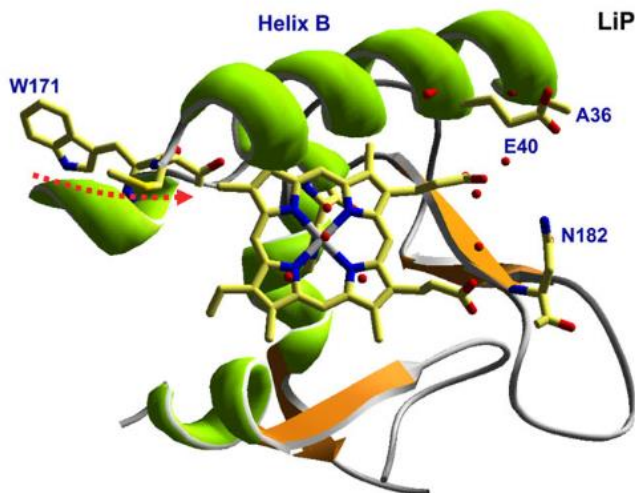
Las MnPs son las peroxidases ligninolíticas más comunes entre los hongos degradadores de lignocelulosa. Estas se encuentran representadas en la mayor parte de los genomas secuenciados de este tipo de hongos generando familias multigénicas (Knop et al., 2015). Debido al gran número de isoenzimas y la evidencia de su rol en la degradación de lignina, se piensa que existe un grado de redundancia en sus funciones fisiológicas. Aun así, en cultivos de *P. ostreatus* se observó que predomina la expresión de las isoformas MnP2 y MnP3 (shMnPs) en periodos de crecimiento activo (trofofase), mientras que el resto de las isoformas se expresaron en presencia de  $Mn^{2+}$  (Knop et al., 2015). De forma similar la expresión de las MnPs en *Trametes hirsuta* no sólo está relacionada con las fases de crecimiento y la disponibilidad de nutrientes, sino con la presencia de inductores aromáticos. En ensayos en medio líquido se observó la expresión generalizada de las 7 isoformas de MnP (todas shMnPs) de *T. hirsuta* durante la trofofase, mientras que en presencia de inductores aromáticos y en la idiofase se expresaron únicamente las isoformas POD5 y POD4 (Vasina et al., 2017).

## **Lignina peroxidasa (LiP)**

Las Lignina peroxidases (LiPs, diarilpropano peroxidases, EC 1.11.1.14) son glicoproteínas ácidas de entre 38-46 kDa, pI de 3,2-4,0, que contienen 1 mol de protoporfirina de hierro IX por mol de proteína. Las LiPs muestran un alto potencial redox ( $E_0' \sim 1.2V$ ) y una baja especificidad de sustrato. Esto les permite catalizar tanto la oxidación de sustratos fenólicos similares a los de las MnPs, generalmente compuestos orgánicos aromáticos, como también sustratos de alto potencial redox como ligninas lineales. Al igual que en otras peroxidases, el compuesto dador de electrones más usual es el peróxido de hidrógeno, pero a diferencia de las MnPs no dependen de mediadores para catalizar las reacciones (Valli et al., 1990).

Las LiPs, al igual que las MnPs, son proteínas globulares conformadas por dos dominios divididos por un grupo hemo. La estructura secundaria de estos dominios se compone de 8  $\alpha$ -hélices mayores, 8  $\alpha$ -hélices menores y 3 pequeñas hojas- $\beta$  antiparalelas, entre estas 8 cisteínas que forman puentes disulfuro, del cual uno conecta el C-terminal con el núcleo de la proteína. Esta estructura, a pesar de su bajo nivel de identidad aminoacídica, es similar a la de la citocromo C peroxidasa (CcP). A diferencia de las CcPs, las LiPs poseen una extensión en su extremo C terminal que

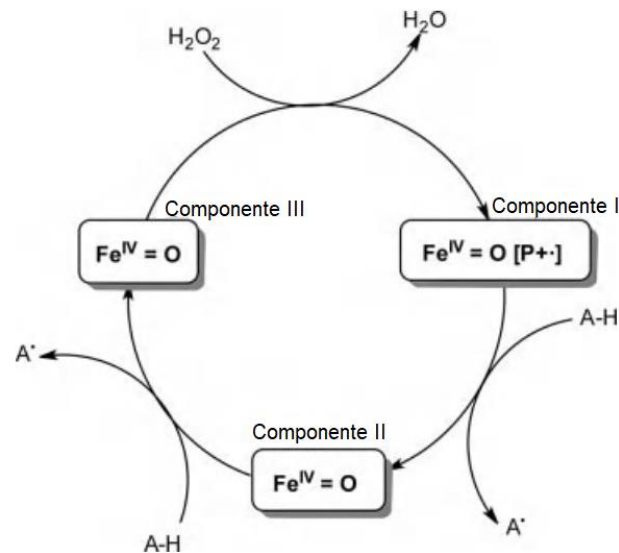
genera un bucle (loop) desde la base del dominio proximal hasta el dominio distal, y conforma el acceso al bolsillo del hemo. A su vez, cada dominio contiene un sitio de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ , los cuales pueden estar involucrados en el mantenimiento de la topología del sitio activo. El bolsillo hemo está formado por alrededor de 40 residuos situados en las hélices  $\alpha$  y las hojas plegadas  $\beta$ . El sitio de unión a peróxido localizado en el lado distal del sitio hemo conecta mediante un canal al exterior de la proteína, el cual permite la interacción con los sustratos (Edwards et al., 1993; Choinowski et al., 1999). Por otro lado, el W171, ubicado en la superficie de la proteína, cumple un rol esencial en la unión y oxidación del veratril alcohol mediante una transferencia electrónica de rango largo (LRET, Long-range electron transfer) siendo su reemplazo deletéreo para esta actividad (Doyle et al., 1998).



**Figura vi:** Modelado de la estructura de la LiP de *P. chrysosporium* (1LLP). En esta figura se puede observar la vista axial de la región Hemo y residuos catalíticos W171 (Tomado de Ruiz-Dueñas et al., 2009).

El mecanismo de oxidación de las LiPs es similar al ya descrito en generalidades (Figura vii). En el caso de las LiPs el intermediario componente I es reducido por una molécula de sustrato, generando, en caso de ser un compuesto fenólico un radical fenilo, o cationes aromáticos en caso de oxidar un compuesto no fenólico. Esta reducción genera un segundo estado intermediario de oxidación componente II. Algunos compuestos, entre ellos el veratril alcohol, pueden reducir a la enzima a su estado nativo, completando así el ciclo catalítico. Por otro lado, en ciertas

condiciones es posible que la reducción del componente I se produzca en un único paso de reducción y que en presencia de dióxígeno se promueva la ruptura de anillos aromáticos (Martínez, 2002; Pollegioni et al., 2015).



**Figura VII:** Ciclo catalítico de la LiP (Tomado/modificado de Pollegioni et al., 2015)

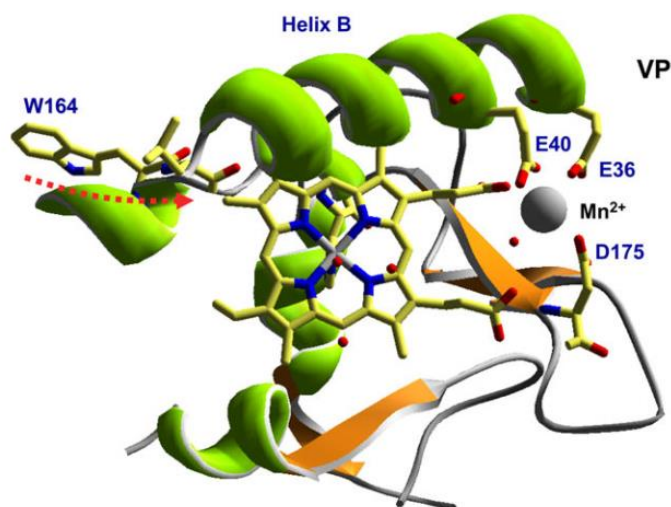
Las LiPs son frecuentemente reportadas como múltiples isoenzimas que en general se encuentran representadas por diferentes genes dentro de los genomas fúngicos. En el caso de *Trametes versicolor* se identificaron 16 isoenzimas de LiP, cada una de estas codificadas por un gen propio. De forma similar, las 10 isoenzimas aisladas de cultivos de *P. chrysosporium* que muestran características bioquímicas particulares fueron asignadas a genes individuales (Martinez et al., 2004). Las LiPs oxidan diferentes modelos de lignina no fenólica, incluyendo uniones  $\beta$ -O-4 arilglicerol eter. Las propiedades oxidativas involucran la formación de radicales por oxidaciones de un electrón que al entrar en resonancia en las estructuras de los sustratos pueden ocasionar el clivaje de cadenas laterales, la demetilación, adición intramolecular, y otros rearrreglos. La hidroxilación de grupos metileno de bencenos, oxidación de alcoholes bencílicos y la oxidación de fenoles son otros mecanismos oxidativos registrados de estas enzimas. Por otro lado, las LiPs también son capaces de oxidar una gran variedad de compuestos fenólicos como anilinas aromáticas, guaiacol, acetosiringonas, catecol, vainillil alcohol y otros compuestos con potenciales oxidativos compatibles con LiPs (Falade et al., 2017).

## Peroxidasa versátil

Las llamadas peroxidadas versátiles (VPs; EC 1.11.1.16) son un grupo de enzimas que comparten características de las LiPs y las MnPs. Estas enzimas han sido particularmente bien documentadas en *Bjerkandera adusta* y *Pleurotus* spp. (Min et al., 2010; Taboada-Puig et al., 2011; Pozdnyakova et al., 2013).

El ciclo catalítico de la VP es muy similar al de la LiP e involucra la formación y reducción de los intermediarios compuesto I y compuesto II. Al igual que las MnPs, las VPs oxidan  $Mn^{2+}$  a  $Mn^{3+}$  y también, de forma similar a las LiPs, son capaces de oxidar el modelo lineal no fenólico de lignina veratril glicerol- $\beta$ -guayacil eter y veratril alcohol, aunque con menor nivel de afinidad. Sin embargo, estas enzimas son capaces de oxidar compuestos que las MnPs y LiPs no oxidan eficientemente en ausencia de veratril alcohol o Mn como hidroquinonas y fenoles sustituidos, como así también compuestos de alto potencial redox como colorantes (Wong, 2009).

Las VPs tienen una estructura similar a la del resto de las peroxidadas tipo II. Están constituidas por 11  $\alpha$ -hélices sostenidas por 4 puentes disulfuro y 2 átomos de calcio (Perez-Boada et al., 2005). En esta estructura podemos encontrar al menos dos sitios catalíticos, un canal de acceso abierto donde sustratos de bajo potencial redox son oxidados; y otro superficial en el que se encuentra un residuo Trp, que mediante un proceso de transferencia de electrones a larga distancia (LRET), es capaz de oxidar sustratos de alto potencial redox. Por otro lado, las VPs tienen en su plano sagital un pequeño pasaje hacia el grupo hemo al cual el  $Mn^{2+}$  tiene acceso y por el cual es oxidado (González-Pérez & Alcalde, 2018).



**Figura viii:** Modelado de la estructura de la VP de *P. eyrinjii* (2BOQ). En esta figura se puede observar la vista axial de la región Hemo y residuos catalíticos W164 y los

pertenecientes al sitio de unión a Mn (E36, E40, and D175) (Tomado de Ruiz-Dueñas et al., 2009).

El amplio rango de sustratos sobre el que actúan las VPs se debe principalmente a su alto potencial de oxidación ( $E^{\circ} > 1,4 \text{ V vs SHE}$ ) y la presencia de los 3 sitios catalíticos vinculados al bolsillo hemo. Aun así, y considerando que la eficiencia en la oxidación de  $\text{Mn}^{2+}$  de las VPs es similar a la de las MnPs, las VPs son 10 veces menos eficientes en la oxidación de veratril alcohol y son activas en modelos de lignina fenólicos y no fenólicos. La VP de *Pleurotus eryngii* fue capaz de degradar guaiacil glicerol- $\beta$ -guaiacil eter y veratril glicerol- $\beta$ -guaiacil eter en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Pollegioni et al., 2015).

A pesar de no estar tan ampliamente distribuidas como las MnPs, las VPs se pueden encontrar formando familias multigénicas en los genomas de los HCPBs. La expresión de las isoformas de las VPs tiene una mecánica similar a la de las MnPs (principalmente a las shMnPs) las cuales se expresan de forma generalizada en etapas de trofofase y luego en idiofase o en presencia de compuestos aromáticos se observa la expresión diferencial de isoformas, como es el caso de *T. hirsuta* el cual expresa sólo una isoforma de VP (POD 17) de 4 registradas. Debido a este tipo de regulación se sugiere que en especies de Agaricales que no expresan LiP, la VP podría cumplir un rol similar principalmente asociado a la detoxificación del medio (Fernández-Fueyo et al., 2014; Vasina et al., 2017).

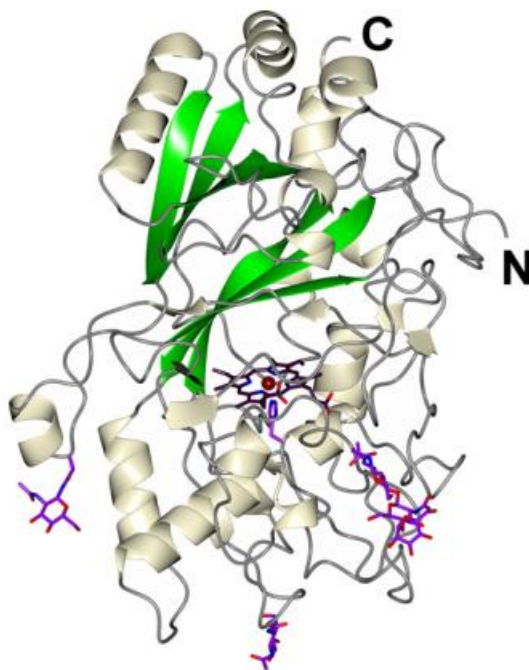
## **Peroxidasa decolorante de tintes (DyP)**

Las peroxidasas decolorantes de tintes (*Dye decolorizing peroxidases*, EC 1.11.1.19; DyPs) son una familia de hemoperoxidasas recientemente descubierta que se puede encontrar en hongos, bacterias, arqueobacterias, protistas y protozoos. A pesar de ser limitados los estudios que caracterizan su estructura y función, muchas de estas proteínas parecen ser bifuncionales con actividad hidrolasa y oxigenasa, además de la típica actividad peroxidasa. En los HCPBs estas enzimas son extracelulares y su función se asocia a la degradación de lignina o subproductos de degradación de ésta, como también a procesos de detoxificación inespecíficos (Sugano, 2009). En bacterias, las DyPs son principalmente periplasmáticas o citosólicas y muy pocas son secretadas al medio, siendo estas últimas las asociadas a la degradación de lignina (van Bloois et



al., 2010). Las DyPs de los HCPBs poseen características que las diferencian de las peroxidadas Clase II: muy amplio rango de especificidad de sustrato, falta de homología con la mayoría de las demás peroxidadas y óptimos de actividad a pHs bajos (alrededor de 3). Las DyPs son capaces de oxidar los sustratos típicos de peroxidadas, como también antraquinonas. Esta propiedad les otorgó el nombre de “dye peroxidases” debido a que muchos colorantes sintéticos son derivados de estos compuestos (Kubicek, 2013).

Las DyPs son proteínas de forma sub-globular, casi cilíndrica. Su arquitectura básica es dominada por dominios  $\alpha$ -hélice y bucles extensos. La característica más preponderante en este tipo de enzimas es su prominente hoja plegada  $\beta$  similar a la encontrada en Ferredoxinas, que se aloja en el lado distal del hemo (Figura ix).



**Figura ix:** Modelado de la estructura de la DyP de *Auricularia auricula-judae* (4UZI\_B). (Tomado de Strittmatter et al., 2013).

Las DyPs se pueden clasificar en 3 grupos P, I y V, sólo las DyP-Vs están representadas en Ascomycetes y Basidiomycetes y el resto en Bacteria. A pesar de mostrar un nivel de identidad entre secuencias primarias muy bajo, las proteínas de este grupo guardan homología estructural y de esta forma definen los grupos ya nombrados (Yoshida & Sugano, 2015; Zamocky et al., 2015).

## Hemotiolato Peroxidasas

Las hemotiolato peroxigenasas (EC 1.11.2.1 HTPs), también llamadas peroxigenasas inespecíficas (UPOs) o peroxigenasas aromáticas (APOs) son otras peroxidasas recientemente descubiertas. Estas enzimas pertenecen a la superfamilia peroxidasa-peroxigenasa. Se encuentran descritas la cloroperoxidasa de *Leptoxyphium (Caldariomyces) fumago* (CPO) y la peroxigenasa inespecífica de *Agrocybe aegerita* (AaeUPO). Las enzimas clasificadas en este grupo se caracterizan no sólo por tener actividad peroxidasa, sino también por catalizar una gran cantidad de reacciones biotecnológicamente interesantes como la incorporación de moléculas de oxígeno (peroxigenación), hidroxilaciones, epoxilaciones, O- y N-dealquilaciones, aromatizaciones, sulfoxidaciones, N-oxygenaciones y declorinaciones. A pesar del avance en la elucidación de los mecanismos catalíticos de las UPOs y de los análisis filogenéticos y moleculares, la función de estas enzimas en el metabolismo fúngico no es claro. Su gran versatilidad podría sugerir un posible rol en todo tipo de reacciones de detoxificación de compuestos, como fitoalexinas, toxinas y xenobióticos. Por otro lado, debido a que se observó la O-demetilación y clivaje de modelos no fenólicos de lignina se estima que podrían estar involucradas en el proceso de degradación de pequeños fragmentos de ligninas, producto de la acción de ligninasas (Kinne et al., 2011; Hofrichter et al., 2015).

## Lacasas

Las lacasas (EC 1.10.3.2, Lacs) representan el mayor subgrupo de oxidasas multicobre (MCOs). Estas enzimas catalizan mediante sus distintivos iones cobre, la oxidación de una amplia variedad de compuestos aromáticos con la consecuente reducción de oxígeno a agua (Solomon et al., 1996). Fueron descritas por primera vez en el “árbol de la laca” *Rhus vernicifera*. Se encuentran en plantas vasculares en donde participarían en la biosíntesis de lignina (Berthet et al., 2012), insectos (Dittmer & Kanost, 2010), bacterias y hongos (Dwivedi et al., 2011). El mayor registro de lacasas se realizó en hongos Ascomycetes y Basidiomycetes, siendo por lo tanto las mejor caracterizadas.

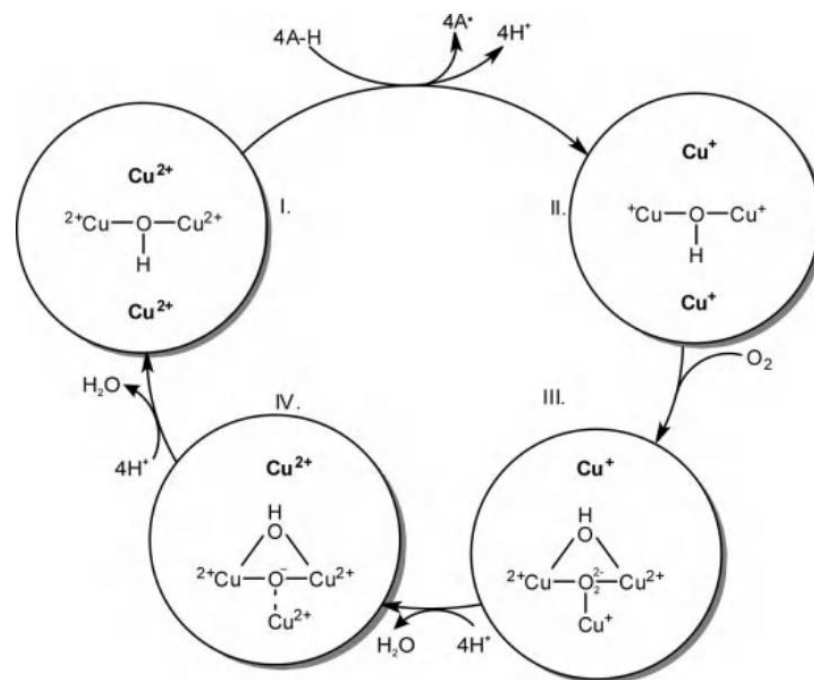
Las lacasas fúngicas pueden ser tanto intra como extracelulares, monoméricas o diméricas y con niveles de glicosilación de entre 10-45%. Su peso molecular oscila entre los 43 y los 110 kDa (Martínez-Morales et al., 2015) y presentan un alto número de isoenzimas en hongos filamentosos (Yaver & Golightly, 1996; Litvintseva & Henson, 2002; Hoegger et al., 2006)

Las lacasas cumplen múltiples funciones en los hongos, intervienen en la síntesis de melanina y otros pigmentos, están involucradas en el proceso de formación de estructuras reproductivas y participarían también en la detoxificación de quinonas de bajo PM y fenoles producidos durante la degradación de lignina a través de su oxidación y posterior polimerización, y en la detoxificación de fitoalexinas y otros compuestos fenólicos producidos por las plantas en respuesta al ataque por fitopatógenos (Arregui et al., 2019). Por otro lado, el análisis filogenético de lacasas las agrupa según su función putativa, quedando definidos grupos tales como: lacasas *sensu stricto* (Basidiomycetes y Ascomycetes), oxidasas multicobre (MCOs) de pigmentos fúngicos, ferroxidasas y ascorbato oxidasas (Hoegger et al., 2006). Las lacasas se expresan durante la degradación de lignina, aunque su rol en este proceso no está completamente definido. La definición de “pudrición blanca” se basa en que este fenotipo resultante del metabolismo fúngico requiere de la intervención de peroxidasas clase II. Sin embargo, gracias a los avances en genómica se pudo establecer que especies como *Schizophyllum commune* y *Cylindrobasidium torrendii*, consideradas HCBP, no presentan peroxidasas clase II, pero sí lacasas, que se expresan durante el proceso de degradación de lignocelulosa, lo que podría indicar que estas enzimas cumplen un rol necesario en la pudrición blanca (Eggert et al., 1996; Floudas et al., 2015).

Las lacasas oxidan sustratos como o-, p- difenoles, aminofenoles, difenoles, polifenoles, poliaminas y diarilaminas, así como también algunos iones inorgánicos. La oxidación se realiza acoplado la transferencia de 4 electrones del sustrato con la reducción de dioxígeno a agua (Figura x). Los pasos en la transferencia de estos electrones son coordinados por cuatro cobres ubicados en distintos centros cobre (Augustine et al., 2008; Kjaergaard et al., 2012).

La estructura general de las lacasas fúngicas consiste en 3 dominios barril- $\beta$  relacionados a los centros cobre, similares a los encontrados en plastocianinas y azurinas, como también comunes en el resto de las MCOs. Los cuatro iones cobre se encuentran coordinados con 12 aminoácidos que definen regiones altamente

conservadas en las lacasas fúngicas definidas como L1, L2, L3 y L4. A su vez, estas enzimas también tienen 4 regiones loops I, II, III, IV definidas en su estructura 3D que están involucradas en la unión de sustratos (Kumar, 2003). Los iones de cobre se distribuyen en 2 "centros de cobre", el centro T1, que contiene un único átomo de cobre y un centro T2/T3 que forma un cluster trinucleado con los otros tres iones de cobre. El sitio T1 se encuentra en el tercer dominio y el sitio de unión a sustrato en una pequeña cavidad cercana al sitio T1, mientras que el segundo centro de cobre T2/T3 se localiza entre el primer y tercer dominio, próximo a un segundo canal en el que se liberan las moléculas de agua luego de la reacción (Pollegioni et al., 2015).



**Figura x:** Ciclo catalítico de la lacasa (Kubicek, 2013)

La acción de las lacasas sobre la lignina se describió a partir de compuestos modelo, en los que se observó la remoción de un electrón desde los grupos hidroxilos de fenoles para formar radicales fenoxi. Estos radicales pueden continuar hacia su polimerización, como también a una demetilación, formación de quinonas o a la ruptura del anillo aromático (Wong et al., 2009).

A pesar de mostrar potenciales redox generalmente menores que las peroxidadas, el rango de sustratos oxidables por las lacasas puede ampliarse en presencia de compuestos que actúan como mediadores redox. Estos mediadores son sustratos de bajo peso molecular que, una vez oxidados por la enzima forman radicales

estables que actúan como transportadores de electrones para oxidar en forma no enzimática, otros compuestos que por su alto potencial o por motivos estéricos o de cinética enzimática no son sustratos directos de la lacasa. Ejemplos de mediadores son el ABTS (2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazol-6-sulfónico), el HBT (1-hidroxibenzotriazol y metabolitos fúngicos como el HAA (ácido 3-hidroxiantranílico), encontrado como producto natural en los cultivos de *Pycnoporus cinnabarinus* (Morozova et al., 2007). Algunos productos de degradación de la lignina pueden actuar también como mediadores de la actividad lacasa en la naturaleza (Camarero et al., 2005). El uso de este tipo de compuestos se plantea en aplicaciones biotecnológicas como blanqueo de pasta de papel o degradación de xenobióticos (Kubicek et al., 2013).

Familia	Cofactor	Cosustrato	Coproducto	Sustratos oxidados	N ° de electrones	Potencial redox máx. (V)	Fuentes reportadas
<b>LiP</b>	Hemo	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O	Lignina no fenólica	1 electrón	1,2	Polyporales
<b>MnP</b>	Hemo	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O	Mn <sup>2+</sup> (Lignina no fenólica para shMn)	1 electrón	0,8	Basidiomycetes
<b>VP</b>	Hemo	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O	Mn <sup>2+</sup> y Lignina fenólica y no fenólica	1 electrón	1,4	Basidiomycetes
<b>DyP</b>	Hemo	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O	Mn <sup>2+</sup> y Lignina fenólica y no fenólica	1 electrón	1,2	Fungi y Bacteria
<b>HTP</b>	Hemo	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O	Compuestos aromáticos y alifáticos	2 electrones y transferencia de oxígeno	1,4	Fungi
<b>Lac</b>	4 Cu <sup>2+</sup>	O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O	Lignina fenólica y productos de oxidación	1 electrón	0,8	Fungi y Bacteria

**Tabla i:** Resumen de las enzimas extracelulares involucradas en la biodegradación de lignina

## Enzimas auxiliares y productoras de peróxido de hidrógeno

La batería enzimática de degradación de lignina no está sólo compuesta por peroxidasas y lacasas, sino también por enzimas que soportan estas actividades. Entre estas encontramos a la celobiosa dehidrogenasa (CDH, EC 1.1.99.18), enzima extracelular que contiene dominios flavocitrocromo. Las CDHs se unen a celulosa y son capaces de oxidar celodextrinas y monodextrinas solubles, como también lactosa. Para esta oxidación, las CDHs utilizan una amplia variedad de compuestos dadores de electrones, entre ellos quinonas y radicales fenoxi, los cuales se generan producto de la oxidación de la lignina por peroxidasas (Cullen & Kersten, 2004). La presencia de estos compuestos en el medio genera efectos negativos como toxicidad en el caso de las quinonas y repolimerización en el caso de los radicales. La acción de las CDHs al reducir ambos compuestos impide estos efectos en el proceso de degradación (Martinez et al., 2005).

Por otro lado, el peróxido de hidrógeno es un compuesto necesario para la oxidación realizada por peroxidasas. En el proceso de producción de este compuesto intervienen oxidasas pertenecientes a la familia glucosa-metanol-colina (GMC) oxidasas como las aril alcohol oxidasas (AAO, EC 1.1.3.7), glucosa 1-oxidasas (GOX, EC 1.1.3.4) y piranosa 2-oxidasas (P2O, EC 1.1.3.10), como también la enzima glioxal oxidasa (GLOX, EC 1.2.3.15) perteneciente a la superfamilia oxidasas radicales cobre (CRO) (Ferreira, 2015). La GOX es una proteína que contiene un centro metálico cobre y un complejo metalo-radical compuesto por los residuos C-Y. Esta enzima cataliza la oxidación de aldehídos simples,  $\alpha$ -hidroxicarbonil y  $\alpha$ -dicarbonil compuestos, acoplando la reacción a la reducción de oxígeno a peróxido de hidrógeno. Por otro lado, las AAOs son proteínas monoméricas que contienen un dominio flavina (FAD). Estas enzimas son capaces de degradar un amplio rango de sustratos: convierten alcoholes alifáticos primarios poliinsaturados, bencil, cinamil, naftil y algunos alcoholes aromáticos p-anisil en sus correspondientes aldehídos y finalmente a sus ácidos carboxílicos. En todos los casos como producto de oxidación se obtiene peróxido de hidrógeno. Dentro del grupo de las enzimas dependientes de FAD también encontramos a la P2O. Esta enzima es una proteína homotetramérica localizada en el espacio periplásmico de HCPBs. Cataliza la oxidación de aldopiranosas a sus correspondientes 2-ceto aldosas con

concomitante producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como también la reducción de quinonas, radicales y complejos metálicos (Zhang et al., 2018).

## **Empleo de HCPBs en el tratamiento de efluentes coloreados**

El primer HCPB utilizado en la degradación de colorantes fue el hongo modelo *P. chrysosporium* (Glenn & Gold, 1993). Estudios realizados con colorantes radiomarcados evidenciaron que esta especie es capaz de mineralizar colorantes azoicos cuando se la cultiva en medio líquido (Paszczynski et al., 1992). Este proceso fue más eficiente en condiciones de baja concentración de nitrógeno, coincidiendo con las condiciones de producción de ligninasas en esta especie (Spadaro et al., 1992). Los estudios realizados hasta el momento muestran que una gran cantidad de especies fúngicas son capaces de degradar colorantes (Levin et al., 2004; Kaushik & Malik, 2015; Shah, 2015; Singh, 2017), pero dicha capacidad varía incluso entre cepas de la misma especie (Sen et al., 2016). Algunas cepas de *P. chrysosporium* son incluso altamente sensibles a estos compuestos y por lo tanto fueron propuestas para verificar la disminución de la toxicidad de los efluentes textiles luego de los tratamientos de decoloración (Papinutti & Forchiassin, 2004).

La capacidad de los HCPBs para la degradación de contaminantes se asocia principalmente a la producción de enzimas ligninolíticas extracelulares con alto poder oxidativo y baja especificidad como peroxidasas y lacasas. Esta capacidad se encuentra relacionada con la naturaleza de las enzimas (estructura, potencial de oxidación, composición aminoacídica, etc.) como así también con las condiciones en las que se realiza el proceso de degradación. El desarrollo de bioprocesos basados en la utilización de enzimas fúngicas para remover colorantes de efluentes industriales ha ganado impulso, principalmente por sus ventajas económicas y el amplio rango de colorantes al que pueden ser aplicadas. Uno de los desafíos que enfrenta el tratamiento enzimático es la inactivación de las enzimas por las características físico-químicas de estos efluentes. La actividad enzimática a menudo se ve gravemente afectada por factores como el pH, la temperatura y la concentración salina. A modo de ejemplo: extractos crudos de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 conteniendo 30 U/mL de actividad lacasa se ensayaron para decolorar 22 tintes a diferentes pHs (2,4-5) y temperaturas (30-50°C) obteniéndose los mejores resultados a pH 3,2 y 35°C (Bettin et

al., 2019). La actividad decolorante de las lacasas también se demostró a partir de isoenzimas expresadas de forma heteróloga. Tal es el caso de la lacasa LCC3 de *Trametes trogii* expresada en *Pichia pastoris*, siendo esta una excelente candidata para el tratamiento de colorantes ya que mostró una alta estabilidad a pH 6 y 60°C, como también capacidad decolorante de: Azul de Anilina, Verde de Malaquita, RBBR, Naranja G, Xilidina e Índigo Carmín en presencia de acetosiringona y ácido viorúlico (Campos et al., 2016). Este tipo de estrategias también se utilizó para lacasas de otros hongos con gran capacidad decolorante como la lacasa 1 (Lcc1) de *T. versicolor*, con la cual se obtuvo hasta un 90% de decoloración de RBBR a pH 5 y 45°C (Guo et al., 2008), o de una lacasa de *Pycnoporus sanguineus* que actuó sobre este mismo colorante, registrándose un 89% de decoloración a pH 3 y 40°C (Lu et al. 2009).

Además del estudio de las propiedades bioquímicas de las ligninasas producidas por un organismo, es necesario analizar las condiciones de inducción y producción de estas enzimas y de los sistemas auxiliares mediante el uso de cultivos de células libres en medio líquido. Gracias a esta metodología se observó que variables como la composición del medio, el pH, las fuentes de carbono y nitrógeno (Buswell et al., 1995; Trupkin et al., 2003; Levin et al., 2010; Knop et al., 2015; Cheng et al., 2016), el tiempo de incubación (Sosa-Martínez et al., 2020) y el tipo y concentración de colorante (Lu et al. 2016; Yesilada et al., 2018), modifican la capacidad de decoloración de diferentes especies.

Los compuestos aromáticos como los colorantes no sólo son sustrato de oxidación de las ligninasas, sino que también actúan como sus inductores. Lacasas y peroxidases reportan en sus zonas promotoras regiones regulatorias que contienen elementos de respuesta al estrés (*Heat-Shock Elements*, HSE), a metales pesados (*Metal-Response Elements*; MRE), a cAMP (*cAMP Response Elements*; CRE) y a xenobióticos (*Xenobiotic-Response Elements*; XRE) (Giardina et al., 2010; Fernández-Fueyo et al., 2014). En hongos expuestos a colorantes, se verificó una regulación positiva de estas enzimas, en conjunto con sistemas involucrados en el metabolismo y detoxificación de xenobióticos (Sun et al., 2016), e incluso actúan sinérgicamente en su descomposición, al ser mezclados con derivados de lignina (Da Cheng et al., 2018).

Otro fenómeno asociado al tratamiento de colorantes mediante el uso de cultivos celulares es la biosorción, la cual se basa en la interacción entre los componentes de la pared celular fúngica con los colorantes, siendo independiente de la viabilidad de las células. Este mecanismo es probablemente uno de los más sencillos de evaluar debido



a que los colorantes no son modificados y el color permanece en los componentes del sistema. Consiste en interacciones físico-químicas como adsorción, deposición e intercambio iónico, entre una gran cantidad de grupos funcionales presentes en la pared celular fúngica: amino, carboxilo, tiol, fosfato y las moléculas de los colorantes (Kaushik & Malik, 2015; Sen et al., 2016). Entre las interacciones posibles se destaca la generada por la quitina, el principal componente de la pared celular fúngica. La quitina se compone de cadenas lineales de N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina unidas mediante enlaces glucídicos en posición  $\beta$  1-4. Como resultado de esta unión la orientación de cada unidad rota alrededor del enlace glucosídico  $180^\circ$ . Debido a su composición y a la disposición de sus unidades, la quitina es capaz de adsorber distintos colorantes. A pH bajo los grupos amino de la quitina se protonan permitiendo la interacción mediante fuerzas electrostáticas con colorantes ácidos. A su vez, debido a su estructura lineal y a la disposición de sus monómeros, se producen estructuras planas muy similares a la de la celulosa que maximizan la formación de fuerzas de van der Waals. De esta forma el polímero es capaz de unirse a colorantes que son afines también a la celulosa como colorantes directos, reactivos, sulfurosos y de inmersión (vat) (Roberts, 2016). Muchos de los ensayos de biosorción fueron realizados con hongos que no presentaron actividad ligninolítica. *Penicillium glabrum* y *Aspergillus carbonarius* fueron capaces de remover del medio concentraciones mayores a 99 mg/g de Rojo Congo a pH 4,5 (Bouras et al., 2017); *A. niger* alcanzó un 98% de remoción de color en soluciones de 200 mg/L de los colorantes Azul Ácido 40 y Naranja Ácido 56 (Li et al., 2019); cultivos de *Neonectria radicularis* adsorbieron eficientemente los colorantes Naranja Ácido 51, Rojo Reactivo 75 y Azul Directo 86 alcanzando máximos de 120, 76 and 200 g/L a pH 2; la biomasa de *A. niger* también mostró una alta capacidad de remoción del colorante Amarillo Ácido 99 con un máximo de capacidad de adsorción de 544 mg/g (Naskar & Majumder, 2017). Por otro lado, hongos ligninolíticos como *Funalia trogii* (Yesilada et al., 2002), *P. chrysosporium* y *P. sajor-caju* (Chagas & Durrant, 2001) también mostraron capacidad de biosorción.

## Inmovilización de hongos para el tratamiento de colorantes

Entre los métodos de aplicación de hongos al tratamiento de efluentes su inmovilización constituye una opción interesante. Los principales métodos de inmovilización son el “atrapamiento” (“entrapment”) y la “adhesión” (“attachment”). Durante la adhesión, los sistemas biológicos son inmovilizados en soportes como polímeros, carbón activado o materiales lignocelulósicos. En cambio, los materiales utilizados para inmovilizar microorganismos por atrapamiento son matrices como agar, geles u otros polímeros sintéticos en donde son confinados (Papinutti & Martínez, 2006).

La inmovilización de microorganismos presenta ventajas frente a otras metodologías. Una de ellas es la posibilidad de reuso del sistema gracias a la facilidad para separar la biomasa de las soluciones tratadas (Sen et al., 2016). Por otro lado, la inmovilización de estos organismos modifica su morfología y reduce la viscosidad aparente de los caldos de cultivo debido a una disminución en la producción de polisacáridos (Rodríguez Couto, 2009; Serrano-Carreón et al., 2015). De esta forma se incrementa el intercambio de masa y oxígeno, mejorando las condiciones de cultivo y de producción de metabolitos (Thongchul & Yang, 2003; Wucherpfennig et al., 2010). A su vez, los hongos inmovilizados muestran una mayor resiliencia a perturbaciones como cambios de pH y exposición a compuestos tóxicos (Kasinath et al., 2003; Silvério et al., 2013; Mainardi et al., 2018).

El uso de estos sistemas fue explorado exhaustivamente, haciendo foco en particular en diferentes tipos de soportes. Entre los soportes estudiados se mencionan los confeccionados a partir de materiales inertes como esponjas de poliuretano (Nakamura et al., 1997), nylon (Haapala & Linko, 1993) o metal (Couto et al., 2004), los cuales mantienen su composición y estructura durante todo el proceso de fermentación y de degradación. Se utilizaron también soportes “naturales”, principalmente compuestos por materiales biodegradables, como esponja vegetal (*Luffa cylindrica*) y otros residuos lignocelulósicos. Los soportes naturales inducen la expresión de enzimas ligninolíticas y pueden ser cometabolizados durante el crecimiento fúngico en presencia de contaminantes (Fernández et al., 2020). Sin embargo, la acción del hongo sobre el soporte puede modificar su composición y generar problemas estructurales (Couto, 2009). Por otro lado, la composición de los sustratos también puede

condicionar su colonización, no siendo esta una cualidad que se relacione con la capacidad de degradación de los efluentes (Böhmer et al., 2010).

HCPBs inmovilizados han sido aplicados exitosamente al tratamiento de efluentes coloreados modelo y reales (Spina et al., 2014; Cerrón et al., 2015; Mir-Tutusaus et al., 2018). Múltiples estudios muestran que los HCPBs inmovilizados son capaces de degradar y detoxificar colorantes, habilidad relacionada con su capacidad de expresar enzimas ligninolíticas. *Dichomitus squalens* inmovilizado en esponjas de poliuretano (PUF) y en madera de pino fue capaz de decolorar el colorante antraquinónico RBBR y el azoico Naranja Reactivo 16. La decoloración coincidió con la expresión de isoformas activas de lacasas que contribuyeron en el proceso (Šušla et al., 2007). Por otro lado, *B. adusta* MUT 2295 fue inmovilizado en 4 soportes diferentes, pero decoloró más eficientemente utilizando PUF y produjo mayores títulos de peroxidasa (Spina et al., 2012).

Al igual que en los cultivos de células libres, la producción de enzimas ligninolíticas en hongos inmovilizados puede modificarse en respuesta a la disponibilidad de nutrientes y concomitantemente varía la capacidad de remoción de colorantes. En general, la presencia de fuentes de carbono simples mejora los tratamientos. El agregado de glucosa a cultivos *P. chrysosporium* inmovilizado en PUF (Pakshirajan & Kheria, 2012) y de *Stropharia* sp. ITCC 8422 mostró mejores resultados en el tratamiento de efluentes con respecto al agregado de fuentes complejas como melaza. El agregado de glucosa mantiene activo el metabolismo fúngico y evita el gasto energético implicado en la síntesis de enzimas capaces de degradar compuestos más complejos como oligo o polisacáridos (Agrawal & Verma, 2019). Por otro lado, la presencia de glucosa podría incrementar la producción de peróxido de hidrógeno por medio de enzimas con actividad glucosa oxidasa, lo que favorecería la acción de peroxidases, también implicadas en la degradación de colorantes (Swamy & Ramsay, 1999).

La presencia de lignina, tanto formando parte de sustratos fermentables como derivados solubles, aumenta la eficiencia de los procesos de decoloración mediados por hongos. *Irpex lacteus* CD2 decoloró 26% y 83% del colorante azoico Rojo Directo 5B en ausencia y presencia de oligómeros de lignina (lignina alcalina), respectivamente. En este ensayo, la expresión génica difirió en las condiciones ensayadas: en presencia de lignina se incrementó parcialmente la expresión de enzimas ligninolíticas y con el colorante solo se indujeron enzimas productoras de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

y algunas isoformas de peroxidasas, mientras que en presencia de ambos compuestos se incrementó la expresión de todas las enzimas modificadoras de lignina, incluso de VPs y MnPs no expresadas en las condiciones previas, lo cual explicaría el aumento en los porcentajes de decoloración (Sun et al., 2016).

Además de la degradación y mineralización por acción de las enzimas ligninolíticas, al proceso de biorremediación con hongos inmovilizados pueden contribuir la biosorción y bioacumulación (Singh, 2017). *F. troglia* inmovilizado formando pellets fue capaz de remover el colorante azoico Rojo Astrazon FBL mediante una primera etapa de biosorción, seguida de degradación enzimática (Yesilada et al., 2002). *P. chrysosporium* inmovilizado en *L. cylindrica* fue capaz de adsorber eficientemente el colorante antraquinónico RBBR (Iqbal & Saeed, 2007). *T. versicolor* inmovilizado en cartuchos esféricos preparados con una malla de polietileno de plástico de alta densidad y rellenos con salvado de trigo como sustrato, removió eficazmente el colorante trifenilmetánico Verde de Malaquita y el azoico Xilidina (Diorio et al., 2020). Sustratos agotados utilizados para la producción de distintos hongos comestibles, entre ellos *P. ostreatus*, se emplearon también en microrremediación de colorantes (Papinutti & Forchiassin, 2010).

Por otra parte, la capacidad de decoloración de los HCPBs no siempre se correlaciona con los títulos de enzimas ligninolíticas cuantificados. Casieri et al. (2008) inmovilizaron a *Trametes pubescens* en condiciones limitantes de nitrógeno y lo utilizaron para realizar ciclos sucesivos de decoloración empleando concentraciones crecientes de tintes antraquinónicos y azoicos. Obtuvieron porcentajes importantes de decoloración, pero alta variabilidad en las actividades Lac, MnP, MiP, LiP y AAO. Otros autores tampoco pudieron asociar la capacidad de degradación de contaminantes con los títulos de enzimas ligninolíticas producidos por HCPBs (Máximo et al., 2002; Anastasi et al., 2006; Tavčar et al., 2006). Una posibilidad es que parte de las actividades enzimáticas involucradas en el proceso de decoloración, no detectadas en los sobrenadantes, podrían estar asociadas al micelio (Svobodová et al., 2008).

A pesar de sus ventajas, la implementación a escala industrial de los tratamientos de biorremediación basados en hongos ligninolíticos sigue siendo un desafío (Rodríguez Couto, 2017). Numerosas investigaciones recientes apuntan a optimizar el rendimiento de los procesos de biorremediación y a disminuir sus costos. Una forma de operar a escala industrial minimizando los costos es identificar nuevas cepas fúngicas y enzimas mejor adaptadas a las condiciones del proceso a llevar a

cabos. En este último punto la ingeniería genética juega un rol muy importante. Otra forma de lograr mejores resultados es incrementar la eficiencia de tecnologías ya establecidas, por ejemplo, las operaciones a escala industrial pueden beneficiarse con mejores técnicas de inmovilización de biomasa fúngica para la remoción de sustancias tóxicas en los efluentes (Singh & Singh, 2014).

En el presente trabajo de tesis se abarcaron dos estrategias orientadas al tratamiento de efluentes coloreados empleando HCPBs o sus enzimas ligninolíticas.

En el primer capítulo se investigó la capacidad de remoción de colorantes de hongos con hábito de crecimiento corticioide. Estos organismos no constituyen un grupo evolutivamente monofilético (Larsson, 2007), sino que se agrupan por su característica de generar basidiomas resupinados o efusos, que en la mayoría de los casos desarrollan contexto monomítico (Donk, 1964; Larsson, 2007). Considerando que esta morfología podría asociarse a un sistema de inmovilización fúngica con mejores características reológicas, se exploró su potencial en el tratamiento de colorantes industriales. En particular se evaluó el uso de los llamados “soportes mixtos”. En estos sistemas se emplean soportes inertes como la esponja de poliuretano (Yesilada et al., 2018) y como soporte “natural” sustratos lignocelulósicos (Couto, 2009; Fernández et al., 2020). El empleo conjunto de ambos tipos de soportes permitiría generar una matriz que resista el metabolismo fúngico (esponja de poliuretano) y que mediante el agregado de materiales lignocelulósicos promueva la producción de ligninasas.

En el segundo capítulo se secuenciaron los transcriptomas de especies del género *Geastrum* en búsqueda de genes codificantes de enzimas oxidativas novedosas que puedan actuar sobre colorantes. Las especies del género *Geastrum* son saprobias y se las encuentra asociadas a hojarasca y a restos de troncos parcialmente degradados. Debido a esto, su clasificación ecofisiológica no es completamente clara, aunque se los incluye dentro de los hongos degradadores de hojarasca. El micelio de estos organismos se asocia a partículas del suelo, como restos de hojarasca, generando un estrato que puede alcanzar los 35 cm en casos como el de *Geastrum coronatum*. El hábitat de estas especies es principalmente determinado por el suelo, siendo encontrados en suelos bien drenados, de base rica, con pHs entre neutros y básicos como las morenas calcáreas, suelos arenosos calcáreos o pequeñas

capas de roca madre (bedrock) (Sunhede, 1989; Olsson et al., 2010; Esqueda et al., 2012).

La fisiología de los organismos involucrados en la degradación de materiales lignocelulósicos adaptados a suelos calcáreos o desérticos se encuentra poco estudiada. Particularmente, las especies de *Geastrum* resultan difíciles de aislar y se destacan por su crecimiento lento en cultivo (Stoytchev et al., 2001; Zamora et al., 2014), dificultando su caracterización fisiológica. A pesar de esto, estudios recientes *in vitro* las muestran como productoras de ligninasas como LiP, MnP y lacasas, así como también  $\beta$ -glucosidasas y  $\beta$ -xilosidasas (Kuhar et al., 2016).

En este tipo de situaciones, como en el caso de las micorrizas (Tisserant et al., 2012), los análisis genómicos y transcriptómicos resultan herramientas valiosas para esclarecer sus estrategias metabólicas. Los análisis comparativos de distintos genomas de hongos lignocelulolíticos facilitaron la elucidación de los mecanismos enzimáticos involucrados en la degradación de lignocelulosa (Ohm et al., 2014), incorporando nuevas familias enzimáticas y profundizando en el estudio de los tipos de degradación, como en el caso de la pudrición blanca (Riley et al., 2014; Floudas et al., 2015). Por otro lado, estos análisis contribuyen al desarrollo de sistemas de producción heteróloga o nativa de enzimas de interés industrial.

**– Capítulo 1 –**

**“Selección de hongos de hábito  
corticoides con actividad ligninolítica  
para su inmovilización y tratamiento de  
colorantes”**

# 1.1. Hipótesis y objetivos

## Hipótesis

- El hábito de crecimiento corticioide de hongos lignocelulolíticos facilitará su inmovilización sobre soportes inertes, formando sistemas compactos en los que puede inducirse la producción de enzimas ligninolíticas, para su utilización en la remoción de colorantes sintéticos.

## Objetivos

- Colectar y aislar nuevas cepas de Basidiomycetes con hábito de crecimiento corticioide e identificarlas en base a sus caracteres morfológicos y técnicas moleculares.
- Seleccionar las cepas que muestren mayor actividad lacasa y/o peroxidasa.
- Evaluar la capacidad de las cepas seleccionadas para la colonización de soportes inertes a emplear en la inmovilización de los cultivos.
- Estudiar la producción de enzimas ligninolíticas en los sistemas de hongo-soporte inmovilizados.
- Evaluar la capacidad de los sistemas hongo-soporte inerte, para remover colorantes de diferente naturaleza química.



## **1.2. Materiales y Métodos**

### **1.2.1. Criterio de recolección de basidiomas en relevamiento**

Para la obtención de los aislamientos utilizados en este trabajo se siguieron dos criterios de recolección de los basidiomas:

A) Selección de hongos con hábito de crecimiento corticioide: basidiomas “simples” de crecimiento superficial inconspicuo, que adaptan su morfología a la superficie que colonizan, pudiendo ser de tipo resupinado, efuso-reflejo o cupulado-discoide. Asimismo, en este grupo de hongos, los himenóforos desarrollados en la superficie de los basidiomas pueden encontrarse completamente expuestos y poseer una morfología variada, pudiendo ser lisos, meruloides, poroides, verrugosos o hidnoides, así como también variantes de estos tipos. La coloración de los basidiomas también suele ser variable en este grupo, siendo generalmente de tonos blanquecinos, grises o amarillos y algunas veces con colores brillantes en rojo, verde o azul (Eriksson & Ryvarden, 1973).

B) Selección de HCPBs: basidiomas que se desarrollen sobre madera en descomposición generando una decoloración blanca por degradación enzimática de la lignina.

### **1.2.2. Lugares de muestreo**

Se realizaron muestreos durante el período 2014-2015 en la reserva “Ciudad Universitaria-Costanera Norte” (Buenos Aires) y en la Reserva del CIAR (Centro de Investigaciones Antonia Ramos), Selva Misionera, Oberá (Misiones), con el fin de coleccionar basidiomas de hongos de hábito corticioide causantes de pudrición blanca. Los muestreos en Oberá se concretaron en el marco del curso de postgrado “Micología de Campo: Identificación de Macrohongos Degradadores de la Madera”. Para la identificación de estos aislamientos se contó con la colaboración de los docentes del curso Dres. E.R. Drechsler-Santos, N. Niveiro, O.F. Popoff y G. Robledo, expertos en taxonomía.

### **1.2.3. Caracteres utilizados para la identificación**

La identificación de las especies se realizó siguiendo la metodología descrita por Eriksson & Ryvarden (1973) y utilizando bibliografía adicional correspondiente a las zonas muestreadas (Gómez & Loewenbaum, 1976; Wright & Albertó, 2006; Bernicchia et al., 2010). La mayoría de los hongos colectados fueron identificados a nivel de género y en algunos casos a nivel de especie. La identificación se basó en caracteres macroscópicos (morfología del basidioma, construcción del basidioma, himenóforo y consistencia del basidioma) y microscópicos (sistemas hifales, septación de las hifas, tipo de basidios, morfología de las esporas, hifidios, cistidios y variantes como leptocistidio, liocistidio, métula, gloecistidio, lagenocistidio, basidiolas y cistidiolas entre otros). Dadas las características de los basidiomas, Eriksson & Ryvarden (1973) priorizan las observaciones microscópicas, siendo estos los primeros caracteres determinantes en las claves dicotómicas.

### **1.2.4. Aislamiento**

Los aislamientos se obtuvieron a partir de los basidiomas recolectados a campo. Para ello se desinfectó la superficie del basidioma con alcohol 70% y dependiendo del grosor de los basidiomas:

a- Se retiró con un bisturí la capa del basidioma expuesta al ambiente de forma tal de dejar expuesto tejido, se tomó parte del tejido utilizando pinzas estériles y se colocó en placas de Petri conteniendo medio de cultivo malta glucosa agarizado (MGA: Extracto de malta 12,7 g/L, Glucosa 10 g/L y Agar 2 g/L.).

b- Utilizando bisturí se retiró la totalidad del basidioma y se tomó con pinza el sustrato inmediato. La fuente de inóculo se colocó directamente en placas de Petri conteniendo medio MGA.

Para incrementar la probabilidad de obtener resultados exitosos, también se realizaron aislamientos a partir de sustratos colonizados y desinfectados por medio de lavados secuenciales por inmersión durante 1 min en soluciones de alcohol 50%, hipoclorito de sodio 1% y agua estéril para luego ser sembrados en placas con medio MGA.

## 1.2.5. Identificación molecular de los aislamientos

Con el fin de confirmar la identificación morfológica de las cepas, se secuenció la región ribosomal ITS1-5.8S-ITS2 (ITS, *Internal Transcribed Spacer*) amplificada por PCR a partir de ADN genómico de cada aislamiento. Esta secuencia incluye las regiones ITS1 e ITS2 y la secuencia del ARNr 5.8S, ubicadas entre las secuencias del ARNr 18S (SSU, subunidad pequeña) y 28S (LSU, subunidad mayor) del ADN ribosomal nuclear y es ampliamente utilizada para la identificación molecular y la clasificación fúngica (Bellemain et al., 2010).

### 1.2.5.1. Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico de los aislamientos se realizó a partir de cultivos líquidos en medio MG (Extracto de malta 12,7 g/L, Glucosa 10 g/L) de 7 días de crecimiento. Se separó el sobrenadante del micelio por filtración utilizando embudos tipo Buchner y filtros de celulosa. El micelio filtrado se molió en un mortero con nitrógeno líquido y arena estéril, hasta que se obtuvo un polvo muy fino. El micelio pulverizado se resuspendió en 3 mL de buffer CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) precalentado a 65°C y se pasó a tubos de polipropileno de 2 mL en los que se incubó durante 1 h a 65°C mezclando por inversión cada 10 min. Terminada la incubación se agregó 1 volumen de cloroformo y se incubó la solución en agitación durante 10 min. Se separaron las fases centrifugando las muestras 10 min a 5.000 g, se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo y se repitió la extracción con cloroformo. La fase acuosa final se transfirió a un nuevo tubo en el que se agregó ARNasa A hasta llegar a concentración final de 100 µg/mL e incubó a 37°C durante 30 min. Luego se agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol frío y se mezcló suavemente, de forma tal que al precipitar el ADN genómico se formen “ovillos” del mismo. En los casos en que se formó el ovillo, éste se separó y transfirió a un tubo con alcohol 70% para su lavado. En los casos en que no se produjo el ovillo la mezcla con isopropanol se centrifugó a 10.000 g durante 20 min para precipitar el ADN y luego lavar el *pellet* con etanol 70%. En ambos casos los lavados consistieron en la resuspensión del ADN en 500 µL de etanol 70% seguido de un paso de precipitación por centrifugación durante 5 min a 10.000 g. El ADN purificado se resuspendió en agua y se conservó a -20°C. La concentración de ADNg extraído se estimó por electroforesis en geles de

agarosa 1% por comparación con estándares de ADN de peso molecular y concentración conocida.

#### Buffer CTAB

Bromuro de hexadeciltrimetilamonio 2% (previamente disuelto en etanol), NaCl 1,4 M, Tris-HCl 100 mM pH 8, EDTA disódico 20 mM pH 8 y  $\beta$ -mercaptoetanol 0,2%.

### 1.2.5.2. Amplificación por PCR de la región ribosomal ITS1-5.8S-ITS2

La amplificación de las secuencias correspondientes a la región ITS1-5.8S-ITS2 del ADN ribosomal nuclear (Bellemain et al., 2010) se realizó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando como molde 100 ng de ADN<sub>g</sub> en una solución conteniendo 1X PCR buffer (Invitrogen Life Technologies) 0,7  $\mu$ M de los primers ITS1-F (*forward*) e ITS4 o ITS4b (*reverse*) (White et al., 1990; Gardes & Bruns, 1993), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM de dNTPs y 2,5 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen Life Technologies).

<i>Forward</i>	
<i>ITS1</i>	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3'
<i>Reverse</i>	
<i>ITS4</i>	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'
<i>ITS4b</i>	5' -CAGGAGACTTGTACACGGT - 3'

**Tabla 1.2.1:** Primers utilizados para la amplificación de la la región ribosomal ITS1-5.8S-ITS2

El ciclo de amplificación fue el siguiente:

<b>Ciclo de amplificación de las regiones ITS</b>	
95°C	5 min
<b>30 ciclos</b>	
95°C	0,5 min
52°C	1 min
72°C	1 min
<b>1 ciclo</b>	
72°C	10 min

**Tabla 1.2.2:** Ciclo de amplificación de las regiones ITS.

Los productos de amplificación esperados (entre 450 y 700 pb, Bellemain, 2010) se verificaron comparando su tamaño con el de patrones estándar comerciales realizando electroforesis en geles de agarosa 1% conteniendo 0,5 µg/mL de bromuro de etidio, en buffer TAE (Tris-Ácido acético pH 8,0 40 mM, EDTA disódico 1 mM) 0,5X. Los productos de amplificación se purificaron utilizando sistemas comerciales (PCR and DNA Fragment Purification Kit, Donsheng Biotech, China) y se secuenciaron utilizando los servicios de secuenciación de la empresa Macrogen (Corea del Sur).

### **1.2.6. Prospección de actividad ligninolítica en medio agarizado**

Para la determinación de las actividades ligninolíticas en medio agarizado se inocularon placas de Petri conteniendo 20 mL de medio MGA en presencia o ausencia de los sustratos de cada enzima (Tabla 1.2.3) con discos de agar de 6 mm de diámetro provenientes de cultivos en medio MGA en fase de crecimiento exponencial (aproximadamente 7 días). Las placas inoculadas se incubaron durante 14 días, en oscuridad y a 28°C, determinándose el radio de crecimiento de las colonias y del halo de actividad enzimática revelado por los sustratos cada 48 h. Estos datos se utilizaron para estimar la tasa de crecimiento (radio en función del tiempo) y la tasa de actividad enzimática (radio del halo de actividad en función del tiempo) y un índice enzimático

obtenido como la razón entre el radio del halo revelado por los sustratos y el radio de crecimiento.

#### Lacasa

<b>Sustrato</b>	1 mM 2,6-dimetoxifenol (DMP)
<b>Actividad observada</b>	Halo amarillo-anaranjado por oxidación del DMP a 3,3,5,5'-tetrametoxi-difenoquinona (coerulignona).
<b>Referencia</b>	Zhao et al., 1996

#### MnP

<b>Sustrato</b>	1mM MnSO <sub>4</sub>
<b>Actividad observada</b>	Precipitado marrón alrededor de las colonias por oxidación del manganeso soluble (Mn <sup>3+</sup> ) a óxido de manganeso (MnO <sub>2</sub> ).
<b>Referencia</b>	Steffen et al., 2000

#### LiP

<b>Sustrato</b>	50 µM Azure B (Cloruro de dimetil-[7-(metilamino fenotiazin-3-ilideno) azanio]).
<b>Actividad observada</b>	Halo de decoloración por demetilación y ruptura de los anillos aromáticos del Azure B
<b>Referencia</b>	Zhao et al., 1996

**Tabla 1.2.3:** Sustratos utilizados para el revelado de cada actividad enzimática en medio MGA

### 1.2.7. Prospección de actividad ligninolítica en medio líquido

Para evaluar la producción de lacasas y peroxidasas en medio líquido se utilizó el medio GA compuesto por Glucosa 10 g/L y Asparagina 4 g/L en medio basal MgSO<sub>4</sub> 0,5 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,6 g/L; Tiamina 0,1 mg/L; Biotina 0,05 mg/L; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0,4 mg/L; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0,09 mg/L; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,07 mg/L; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,02 mg/L; FeCl<sub>3</sub> 1 mg/L; ZnCl<sub>2</sub> 3,5 mg/L suplementado con 0,667 mM de sulfato de cobre (Cu) y 2 mM de veratril (3,4 dimetoxibenzil) alcohol (VA). Los inductores se agregaron luego de la esterilización del medio por autoclave para evitar la formación de complejos con compuestos orgánicos en el caso del cobre y la evaporación del veratril alcohol, y se ajustó a pH 6,5 con NaOH 1 N. Se inocularon Erlenmeyers de 250 mL conteniendo 25 mL de este medio con 2 discos de 6 mm de diámetro provenientes de placas de medio MGA en fase de crecimiento exponencial.

Los cultivos se incubaron de forma estática durante 28 días a 28°C y en oscuridad. Con el fin de estimar el crecimiento se realizaron 24 cultivos por especie, de los cuales se cosecharon 3 Erlenmeyers por día de evaluación (cada 3 o 4 días) y filtraron utilizando embudos tipo Büchner y filtros de celulosa. El micelio filtrado se secó en estufa a 80°C durante 8 h y se pesó en balanza de precisión para determinar su peso seco. En todos los casos se separaron 2 mL de cada sobrenadante de cultivo y se conservaron a -20°C para realizar los ensayos de actividad enzimática (Figura 1.2.1).



**Figura 1.2.1:** Esquema de la toma de muestras para determinar el crecimiento de las cepas en medio líquido.

## 1.2.8. Toxicidad del Cu

Para determinar el efecto del Cu sobre el crecimiento de las cepas ensayadas, éstas se cultivaron en medio MGA adicionado con distintas concentraciones de  $\text{CuSO}_4$  (0, 37,5; 75; 150; 300 y 600  $\mu\text{M}$ ) y se estimó la tasa de crecimiento como el radio de las colonias en función del tiempo.

## 1.2.9. Determinaciones enzimáticas

### 1.2.9.1. Actividad lacasa

La actividad lacasa (Lac) se determinó espectrofotométricamente utilizando como sustrato 0,5 mM ABTS (2,2'-Azinobis-3-etil-benzo-tiazol-6-sulfónico) en 100 mM buffer acetato, pH 3,6 (Hofrichter et al., 1998). La reacción se realizó en placas de 96 pocillos (wells), incubando entre 5 y 15  $\mu\text{L}$  de cada muestra (sobrenadantes de cultivo)

llevados a 200  $\mu\text{L}$  con el sustrato precalentado a 30°C. La actividad lacasa se determinó cuantificando la aparición del producto de oxidación del ABTS de coloración verde a 420 nm ( $\epsilon_{420} = 36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), utilizando un espectrofotómetro para microplacas Epoch (BioTek Instruments, Inc.). Una unidad de actividad enzimática (UE) de lacasa se definió como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de ABTS por minuto en las condiciones de pH y temperatura de reacción.

### 1.2.9.2. Peroxidasa total

La actividad peroxidasa total se determinó utilizando como sustrato 0,5 mM ABTS 100 mM en buffer acetato pH 4,5, en presencia de 0,3 mM  $\text{MnSO}_4$  y 0,1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La reacción se realizó en placas de 96 wells, se colocó una alícuota del sobrenadante de cultivo en las placas y luego se le agregó el sustrato previamente incubado a 30°C en un volumen final de 200  $\mu\text{L}$ . La actividad peroxidasa total se determinó cuantificando el producto de oxidación del ABTS de coloración verde a 420 nm ( $\epsilon_{420} = 36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Eggert et al., 1996). En todos los casos se restó la actividad en ausencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , correspondiente a la actividad lacasa (Hofrichter et al., 1998; Liers et al., 2010). Una unidad enzimática (UE) de peroxidasa se definió como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de ABTS por minuto en las condiciones de pH y temperatura de la reacción.

La cuantificación de las UE/mL tanto para la actividad peroxidasa total como lacasa se realizó según la siguiente ecuación:

$$\frac{UE}{mL} = \frac{(A - A_{bco}) \cdot vol \text{ de reacción (mL)}}{\epsilon_x \cdot l(cm) \cdot vol \text{ enzima (mL)} \cdot tiempo \text{ (min)}}$$

### 1.2.10 Optimización de la producción de ligninasas por *Ph. uda* y *P. laxitexta* en medio líquido

Para optimizar la producción de ligninasas por *Ph. uda* y *P. laxitexta* se cultivaron ambos hongos en los medios GA, GM (Glucosa 10 g/L, Extracto de malta 12,7g/L) y GP (Glucosa 10 g/L, Peptona 5,4 g/L) con el agregado de  $\text{CuSO}_4$  0,3 mM (Cu) y veratril alcohol 2 mM (VA). Los cultivos se incubaron de forma estática durante



31 días a 28°C y en oscuridad. A partir del día 17 de cultivo se tomaron muestras de los sobrenadantes en condiciones de esterilidad, cada 3 o 4 días para realizar las determinaciones de actividad enzimática.

### **1.2.11. Inmovilización de *P. laxitexta* y *Ph. uda*: preparación, inoculación y colonización de los soportes**

Se prepararon dos tipos de soportes: PUF y PUF con sustratos lignocelulósicos. Para el armado de los soportes PUF se utilizaron dos discos de 7 cm de diámetro de esponjas de poliuretano de 3 mm de espesor. Para el ensamblado de los soportes conteniendo sustratos lignocelulósicos, se agregó entre los discos de poliuretano una capa de paja de trigo (500 mg/soporte, tratamiento PUF-WS), cascarilla de soja (600 mg/ soporte, tratamiento PUF-SH) o tripa de celulosa (600 mg/soporte, tratamiento PUF-SC), este último amablemente provisto por la empresa Chisap S.A. Antes de ser colocada en el soporte, la tripa de celulosa fue lavada con un detergente biodegradable y enjuagada con agua destilada para quitar residuos del embutido. La utilización de estos sustratos lignocelulósicos presenta diversas ventajas: pueden servir como fuente de carbono para mantener la viabilidad y crecimiento del hongo inmovilizado, pueden funcionar como inductores de la producción de enzimas ligninolíticas y también como adsorbentes físicos de los colorantes. Además, estos sustratos son desechos de la agroindustria y de la industria de chacinados, por lo que constituyen una alternativa para el diseño de un sistema de bajo costo. La cascarilla de soja y la paja de trigo son atractivos debido a que son fuentes de azúcares fermentables capaces de sostener el crecimiento fúngico (D'Agostini et al., 2011; Sharma et al., 2016). Por otro lado, la “tripa de celulosa” es ampliamente utilizada en la industria de chacinados como envoltorio de productos emulsionados y está principalmente compuesta por celulosa. La disposición de este residuo constituye un problema ambiental y económico (Sreenath & Jeffries, 2011).

Los soportes ensamblados con y sin los sustratos se colocaron en placas de Petri de 9 cm de diámetro y se esterilizaron en autoclave durante 30 min. Una vez esterilizadas las cajas se les agregó medio de cultivo estéril y se compactaron de forma tal que al descomprimirse absorbieran el medio líquido, siendo el volumen utilizado de 20 mL. Para asegurar una distribución homogénea del medio en las esponjas y en los

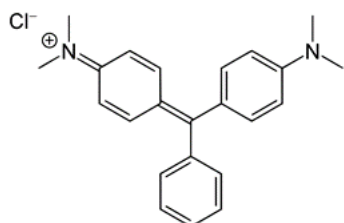
sustratos lignocelulósicos, los soportes se dejaron a 4°C durante 8 h. El medio de cultivo utilizado fue el GP-Cu-VA (GP suplementado con 0,3 mM Cu y 2 mM VA). Los sistemas se inocularon en el centro de las esponjas con 1 taco de agar de 6 mm de diámetro obtenido a partir de colonias en crecimiento activo. Los soportes inoculados se incubaron a 28°C en oscuridad y como indicador de la colonización se determinó el radio de crecimiento del micelio superficial en función del tiempo.

### **1.2.12. Ensayos de remoción de colorantes por *P. laxitexta* inmovilizada**

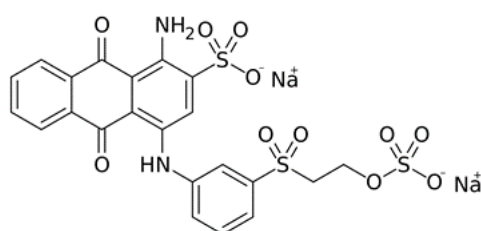
Se realizaron tratamientos de remoción de colorantes utilizando cultivos de 21 días de incubación de *P. laxitexta* inmovilizada en soportes PUF y PUF-SH humedecidos con el medio GP-Cu-VA. Los cultivos se incubaron durante tres semanas para permitir la colonización completa del soporte. Para iniciar el ensayo de remoción, se reemplazó el medio de cultivo por 20 mL de soluciones 0,3 mM de cada colorante y se incubaron a 28°C en ciclos de 24 h, tomando muestras de los sobrenadantes a las 0, 1, 4, 8 y 24 h de iniciado el tratamiento y reemplazando las soluciones decoloradas por soluciones frescas al inicio de cada ciclo.

Para este ensayo se utilizaron tres colorantes de distinta naturaleza química: Verde de Malaquita (VM, trifenilmetánico), Azul Brillante de Remazol R (RBBR, antraquinónico) y Xilidina (Xi, azoico) (Figura 1.2.2). El colorante VM fue extensamente usado para el teñido de seda, lana, jute, cuero y algodón como también en veterinaria para el tratamiento de infecciones fúngicas y de protozoos. Actualmente su uso se encuentra restringido debido a que mostró tener efectos acumulativos en tejidos animales, como también cancerígenos (Parshetti et al., 2006). El RBBR es uno de los colorantes industriales más usados en la industria textil y también es frecuentemente utilizado como precursor en la síntesis de colorantes poliméricos. Sin embargo, muestra importantes valores de toxicidad y recalcitrancia en el ambiente (Hadibarata & Kristanti, 2012). La Xi (Xylidine Ponceau 2R) es un colorante azoico modelo

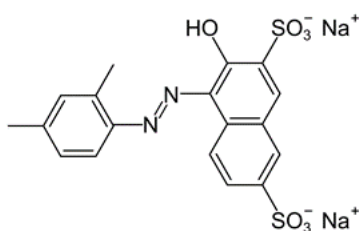
principalmente utilizado en tinciones histológicas (Goldner,1938), pero también como modelo para ensayos de degradación de colorantes de esta naturaleza química (Gnanamani et al., 2005).



Verde de Malaquita  
(Malachite Green)



Azul Brillante de Remazol R  
(Remazol Brilliant Blue R)



Xilidina Ponceau 2R  
(Xylidine Ponceau 2R)

**Figura 1.2.2:** Estructura química de los colorantes modelo VM, RBBR y Xi, utilizados en esta tesis.

El porcentaje de remoción de los colorantes se determinó midiendo la absorbancia remanente a la longitud de onda de máxima absorción de cada uno (VM: 618 nm, RBBR: 592 nm, Xi: 505 nm) estimándose como

$$\% \text{ Remoción del colorante} = \frac{(\text{Absorbancia inicial} - \text{Absorbancia a tiempo X})}{\text{Absorbancia inicial}} * 100 \%$$

En todos los casos también se evaluó la remoción de los colorantes utilizando PUF y PUF-SH sin inocular para determinar su adsorción a los soportes y sustratos.

### **1.2.13. Evaluación de capacidad de decoloración de los sobrenadantes de cultivo con diferentes perfiles de actividad lacasa**

Se evaluó la capacidad de decoloración de los sobrenadantes de cultivos de *P. laxitexta* inmovilizada comparando los extractos obtenidos antes de la exposición del hongo al colorante con los obtenidos luego de los ciclos de decoloración. Las reacciones se realizaron utilizando en todos los casos 0,05 U/mL de actividad lacasa en soluciones que contenían buffer acetato de sodio 0,1 M, pH 3,6 y 50 µM de VM, RBBR o Xi y se determinó la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción de cada uno a las 2, 4, 6, 8 y 24 h.

### **1.2.14. Obtención de lacasas asociadas a micelio**

Se realizaron 3 ciclos de remoción del verde de malaquita con cultivos inmovilizados de *P. laxitexta* como se describió en la sección 2.2.7. Luego de la incubación con el colorante se separó el soporte colonizado, se lavó con 20 mL de agua destilada y se sonicó en 20 mL de agua destilada en un baño a 0 °C por 15 min. Los lisados de los cultivos fueron extraídos por centrifugación a 8000 g durante 15 min y alícuotas del mismo fueron usadas para determinar actividad lacasa (Svobodová et al., 2008; Li et al., 2015; Szabo et al., 2015). Se evaluó esta actividad en cultivos cosechados antes de exponerlos a VM y luego de cada uno de los ciclos de remoción del colorante (C1, C2 y C3).

### **1.2.15. Zimogramas de actividad lacasa y de decoloración de Verde de Malaquita**

Los perfiles enzimáticos de la actividad lacasa presente en los sobrenadantes de cultivo y los resultantes de la decoloración del Verde de Malaquita se analizaron en geles nativos (no desnaturalizantes) de poliacrilamida (PAGE). Las muestras se prepararon en buffer de siembra (buffer Tris-HCl pH 6,8 60 mM; glicerol 10%), se sembraron en geles de poliacrilamida 8% sin SDS y corrieron en buffer TG (Tris 25 mM, glicerol 192 mM) a 30 mA constantes. Una vez separadas las proteínas los geles se lavaron con buffer acetato de sodio 0,1 M, pH 3,5 por 10 min y se reveló la actividad lacasa incubando los geles en una solución de ABTS 0,5 mM o DMP 5 mM o Verde de Malaquita 0,1 mM en buffer acetato de sodio 0,1 M pH 3,5. Las isoformas con actividad

lacasa se revelaron por la presencia de bandas de color verde o amarillas sobre el gel debido a la oxidación del ABTS o DMP y la actividad decolorante por la presencia de bandas aclaradas en presencia de Verde de Malaquita.

### **1.2.16. Tratamiento estadístico de los resultados**

Los datos presentados corresponden a las medias obtenidas a partir de triplicados con desvío estándar de 10%. Los resultados fueron analizados mediante los tests de ANOVA y Tukey del software Graphpad 6.1 (Graphpad software Inc.). Se consideraron significativos los resultados con  $P < 0,05$ .

## **1.3. Resultados**

### **1.3.1. Recolección y aislamiento de hongos con hábito de crecimiento corticioide**

Se recolectaron un total de 27 muestras de basidiomas de hábito corticioide tomadas en 2 ambientes diferentes: Reserva del CIAR y Reserva Ecológica Costanera Norte. Para el aislamiento, se tomaron secciones tanto de la capa del basidioma expuesta al ambiente, así como del sustrato inmediato inferior que se supone colonizado por el hongo. De los 27 basidiomas se obtuvieron 13 aislamientos en los que se observó la presencia de fíbulas en los cultivos para verificar que se trataba de Basidiomycetes y se procedió a su identificación morfológica y molecular.

### **1.3.2. Identificación morfológica y molecular de los aislamientos**

La identificación de los organismos aislados se realizó mediante la evaluación de caracteres morfológicos microscópicos como basidios (tamaño y número de esterigmas), esporas, cistidios y métulas.

La identidad de los aislamientos fue corroborada realizando el alineamiento de las secuencias ITS obtenidas por amplificación por PCR a partir del ADNg, mediante el programa BLAST contra la base de datos non redundant (nr) de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). En los resultados de los alineamientos se tuvieron en

cuenta únicamente las secuencias “Voucher” que provienen de organismos identificados a nivel especie.

De acuerdo con estos análisis se identificaron 5 cepas de *Irpex lacteus*, 1 de *Phlebiopsis flavidoalba*, 1 de *Hyphoderma* sp., 1 de *Peniophora bonariensis*, 1 de *Peniophora laxitexta*, 2 de *Peniophora multicistidiata*, 1 de *Fuscocerrena portoricensis* y 1 de *Phlebia* (*Mycoacia*) *uda* (Tabla 1.3.1) que fueron depositadas en el cepario BAFC de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA y cuyas características se describen a continuación.

N° BAFC	Origen	ID por ITS	ID Morfológica	Orden	N° de Acceso a Genbank
4680	Mis	<i>Fuscocerrena portoricensis</i>	<i>Fuscocerrena portoricensis</i>	Polyporales	MT041762
4681	Bs. As.	NC	<i>Hyphoderma</i> sp.	Polyporales	-
4684	Bs. As.	<i>Irpex lacteus</i>	<i>Irpex lacteus</i>	Polyporales	MT004792
4685	Bs. As.	<i>Irpex lacteus</i>	<i>Irpex lacteus</i>	Polyporales	MT023513
4691	Bs. As.	<i>Irpex lacteus</i>	<i>Irpex lacteus</i>	Polyporales	MT006134
4682	Mis	<i>Irpex lacteus</i>	<i>Irpex lacteus</i>	Polyporales	MT006135
4683	Mis	<i>Irpex lacteus</i>	<i>Irpex lacteus</i>	Polyporales	MT023514
4688	Bs. As.	NC	<i>Peniophora bonariensis</i>	Russulales	-
4689	Mis	<i>Phlebia uda</i>	<i>Phlebia uda</i>	Polyporales	MT006213
4690	Bs. As.	<i>Phlebiopsis flavidoalba</i>	<i>Phlebiopsis flavidoalba</i>	Polyporales	MT006131
4687	Bs. As.	<i>Peniophora laxitexta</i>	<i>Peniophora laxitexta</i>	Russulales	MN518328
4679	Bs. As.	NC	<i>Peniophora multicistidiata</i>	Russulales	-
4686	Bs. As.	NC	<i>Peniophora multicistidiata</i>	Russulales	-

**Tabla 1.3.1:** Listado de cepas, número BAFC (identificación del cepario Buenos Aires Facultad de Ciencias, FCEN-UBA, identidad obtenida en base a identificación morfológica y molecular, mejor match de las secuencias ITS en la base de datos Non Redundant de NCBI, Orden de las especies, número de acceso a GeneBank de las secuencias. NC: identidad no corroborada por técnicas moleculares.

#### *Irpex lacteus* (BAFC 4684, 4691, 4685, 4682 y 4683)

Se obtuvieron 5 cepas de *I. lacteus*, 3 de ellas encontradas en Buenos Aires (BAFC 4684, 4685 y 4691) y 2 en Misiones (BAFC 4682 y 4683). Todas ellas presentaron tasas de crecimiento y morfologías similares. Las colonias crecieron rápidamente en MGA, cubriendo las cajas en sólo 3 días y avanzando luego sobre sus paredes. En todos los casos se produjo un micelio de aspecto veloso, considerablemente espaciado, que luego adquirió apariencia algodonosa con leve

desarrollo de micelio aéreo. Se observó un cambio de color en el medio, probablemente debido al consumo de nutrientes durante el crecimiento fúngico. No se observaron cambios en la coloración de la colonia a lo largo del tiempo.

#### *Hyphoderma* sp. BAFC 4681

Las colonias de *Hyphoderma* sp. (BAFC 4681) en MGA crecieron rápidamente cubriendo en 4 días la superficie de la placa y extendiéndose luego por las paredes de las cajas. Se observó un micelio superficial homogéneo de textura algodonosa y desarrollo de micelio aéreo. No se detectaron zonas de crecimiento oscuras o amarronadas, reportadas en otras especies de *Hyphoderma* (Stalpers, 1978).

#### *Peniophora bonariensis* BAFC 4688

El aislamiento de *P. bonariensis* (BAFC 4688) mostró un crecimiento rápido en medio MGA, siendo el de mayor velocidad (13,4 mm/día). El micelio de color blanco crema y textura algodonosa, creció de forma homogénea. Una vez colonizado completamente el medio, se generaron zonas de micelio densas de textura afelpada, aisladas y de color más intenso, como la zona del inóculo. En esta etapa, también se produjo micelio algodonoso en la zona cercana al borde y micelio invasivo en la zona de avance.

#### *Peniophora laxitexta* BAFC 4687

El aislamiento de *P. laxitexta* (BAFC 4687) cultivado en MGA a 28°C mostró una velocidad de crecimiento de 12,7 mm/día, y cubrió completamente la placa en 5 días. Desarrolló un micelio blanco hialino, laxo, generando cordones ramificados al llegar a las paredes de las cajas. En estadios avanzados de crecimiento, las hifas colonizaron las paredes de las cajas y el micelio adquirió un tono rojizo desde el extremo de las cajas hacia el centro. Esta especie fue reportada anteriormente por Robles et al. (2011) y aislada de áreas urbanas de alto nivel de perturbación de la Ciudad de Buenos Aires. La cepa descrita en dicho trabajo se destacó por su capacidad degradativa, en pruebas de pérdida de peso seco en madera, lo que podría indicar el potencial para la producción de enzimas lignocelulolíticas de la especie.

*Peniophora multicistidiata* BAFC 4686, BAFC 4679

Las colonias de *P. multicistidiata* (BAFC 4686 y BAFC 4679) mostraron la menor velocidad de crecimiento entre las cepas del género evaluadas. El aspecto de las colonias fue similar al de *P. bonariensis*, desarrollando un micelio hialino, tendiendo a blanco crema. Al igual, que en *P. bonariensis* se detectó en zonas aisladas micelio más denso con pigmentación tendiendo a castaña, textura afelpada y a veces aspecto grumoso. Hacia el borde de la caja el micelio se observó menos compacto, de aspecto arborescente terminando en un micelio suelto algodonoso.

*Fuscocerrena portoricensis* BAFC 4680

Los cultivos de *F. portoricensis* BAFC 4680 en medio MGA desarrollaron un micelio hialino, apretado, que generó pequeños cordones y cubrió la superficie de las cajas en 10 días, creciendo a una velocidad de 8 mm/día. Luego de alcanzar los bordes, no se observó crecimiento sobre las paredes, pero sí surgimiento de pequeñas zonas oscuras y generación de pequeños cordones perpendiculares a la superficie, posibles primordios de basidiomas.

*Phlebia uda* BAFC 4689

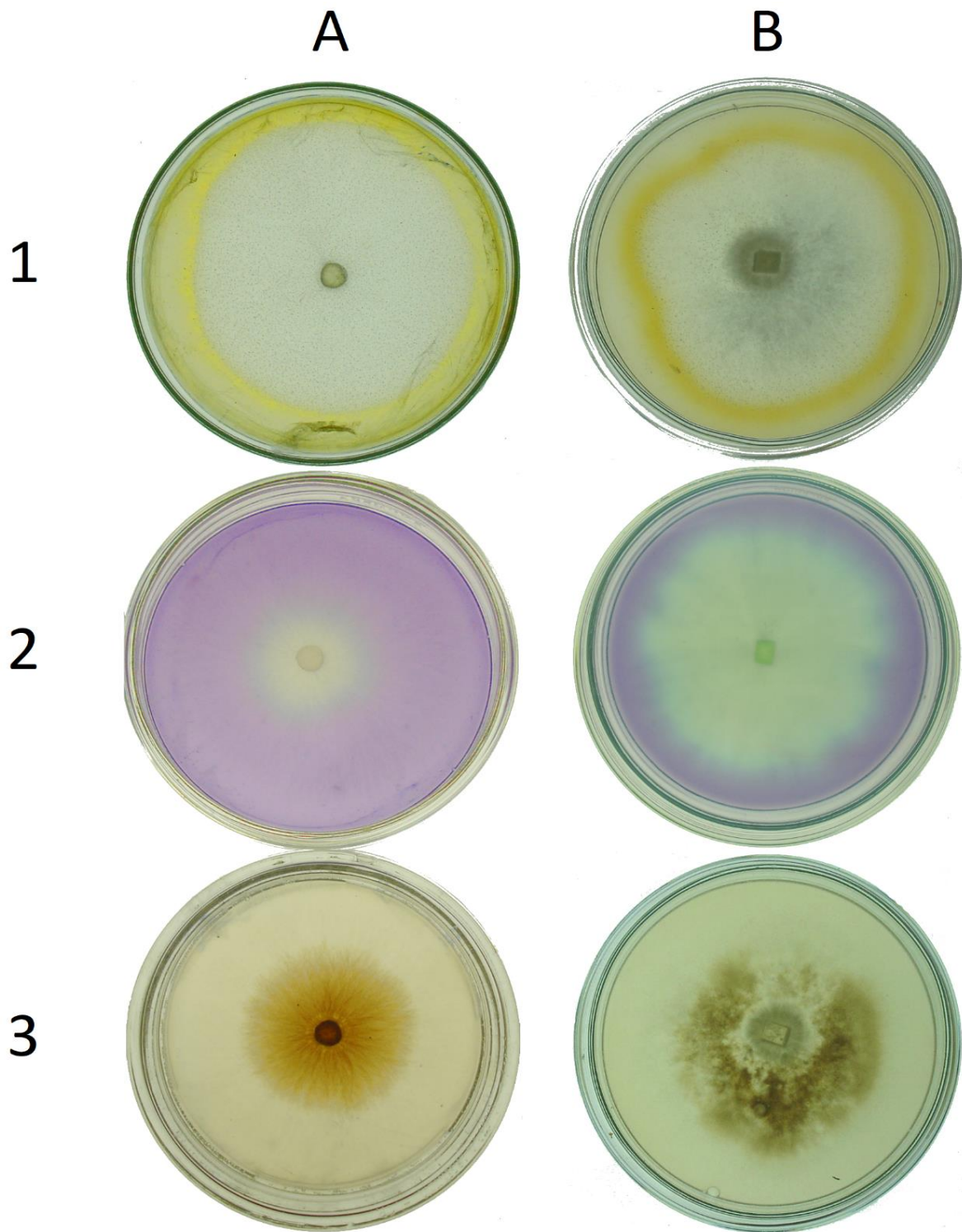
El aislamiento de *Ph. uda* (BAFC 4689) cultivado en MGA, creció a una tasa de 8,15 mm/día, cubriendo la superficie de la caja en 9 días luego de una fase lag de aprox. 3 días. La morfología y coloración de las colonias varió a lo largo del tiempo, al inicio produjo colonias con bordes levemente ondulados e hifas hialinas a blancas. Luego de colonizar toda la superficie y probablemente en la etapa de crecimiento secundario las colonias comenzaron a tornarse más densas desde el centro, adquiriendo una coloración blanca y más amarillenta en el perímetro de la caja. Sobre la superficie amarilla se formaron luego pequeñas acumulaciones de micelio similares a las estructuras desarrolladas en el himenóforo del basidioma. Esta morfología se observó sólo en colonias expuestas a la luz.



### **1.3.3. Selección de cepas con actividad ligninolítica**

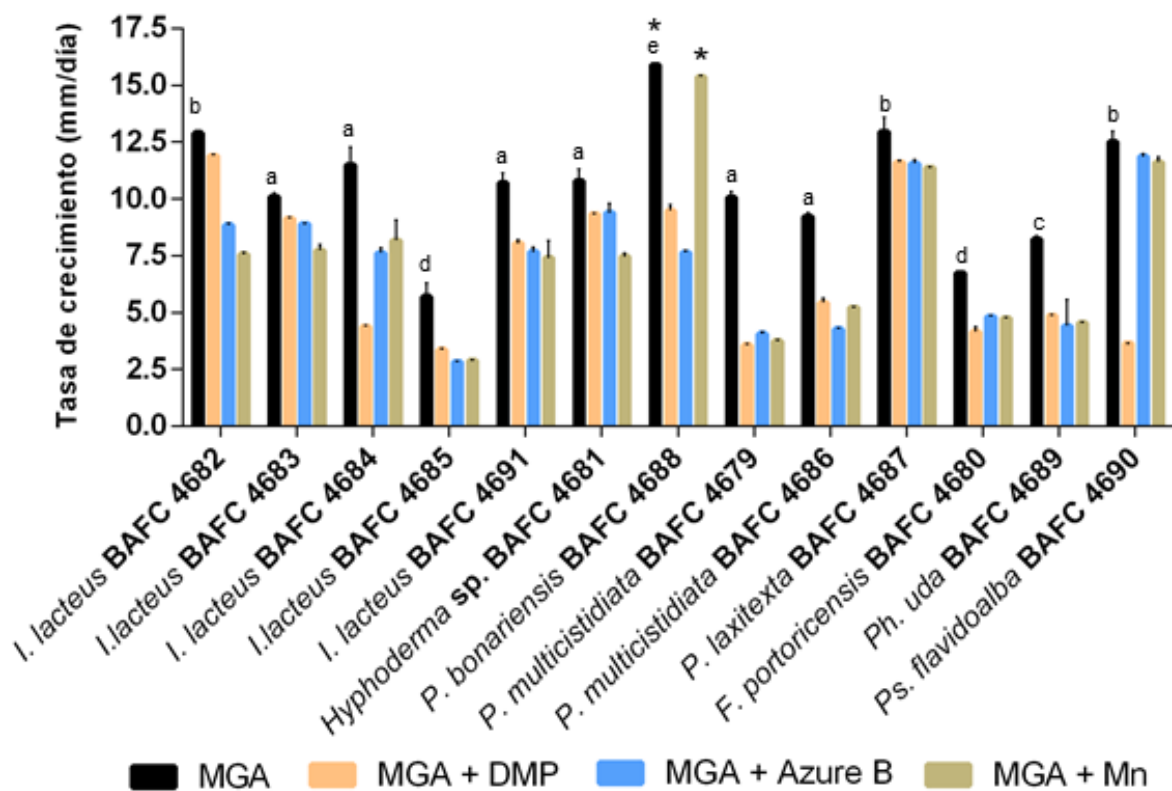
#### **1.3.3.1. Determinación de la actividad lacasa, MnP y LiP en medio agarizado**

Se evaluó la capacidad de las 13 cepas aisladas para producir enzimas ligninolíticas en medio agarizado. Este método se considera semi-cuantitativo, ya que se determina la actividad enzimática por medición de los halos de oxidación o precipitación de los sustratos. El revelado de las actividades se realizó en placas de Petri conteniendo medio MGA con el agregado de DMP como sustrato para lacasas (halo de oxidación naranja),  $\text{MnSO}_4$  para el revelado de actividad MnP (halo de precipitación de  $\text{MnO}_2$ ) y el colorante Azure B para el revelado de LiP (halo de decoloración) (Figura 1.3.1). En todos los casos se determinó además la tasa de crecimiento en los medios con sustratos y en el control en MGA.



**Figura 1.3.1:** Detección de actividad ligninolítica en las cepas de hábito corticioide en medio MGA. Se muestran como ejemplo *I. lacteus* (BAFC4684) (A) y *Ph. uda* (BAFC4689) (B) cultivados en presencia de DMP para revelar actividad lacasa (halo de oxidación naranja) (1), Azure B para detectar actividad LiP (halo de decoloración) (2) y  $MnSO_4$  para verificar actividad MnP (halo de precipitación de  $MnO_2$ ) (3).

En todos los casos, se observó inhibición del crecimiento en presencia de DMP, Azure B o MnSO<sub>4</sub> (ANOVA  $p < 0,05$ ), salvo para *P. bonariensis* que no mostró diferencias en presencia del último revelador (ANOVA  $p > 0,05$ ). La inhibición del crecimiento fue menor al 10% para *P. laxitexta* BAFC 4687 e *I. lacteus* BAFC 4683. Por otra parte, *Ps. flavidoalba* BAFC 4690 mostró una buena tolerancia a la presencia de Azure B y MnSO<sub>4</sub> (inhibición  $<10\%$ ). Además, esta última cepa, junto con *P. bonaerensis* BAFC 4688, *P. laxitexta* BAFC 4687 e *I. lacteus* BAFC 4682 fueron las que mostraron mayores tasas de crecimiento en el medio MGA control (Figura 1.3.2).



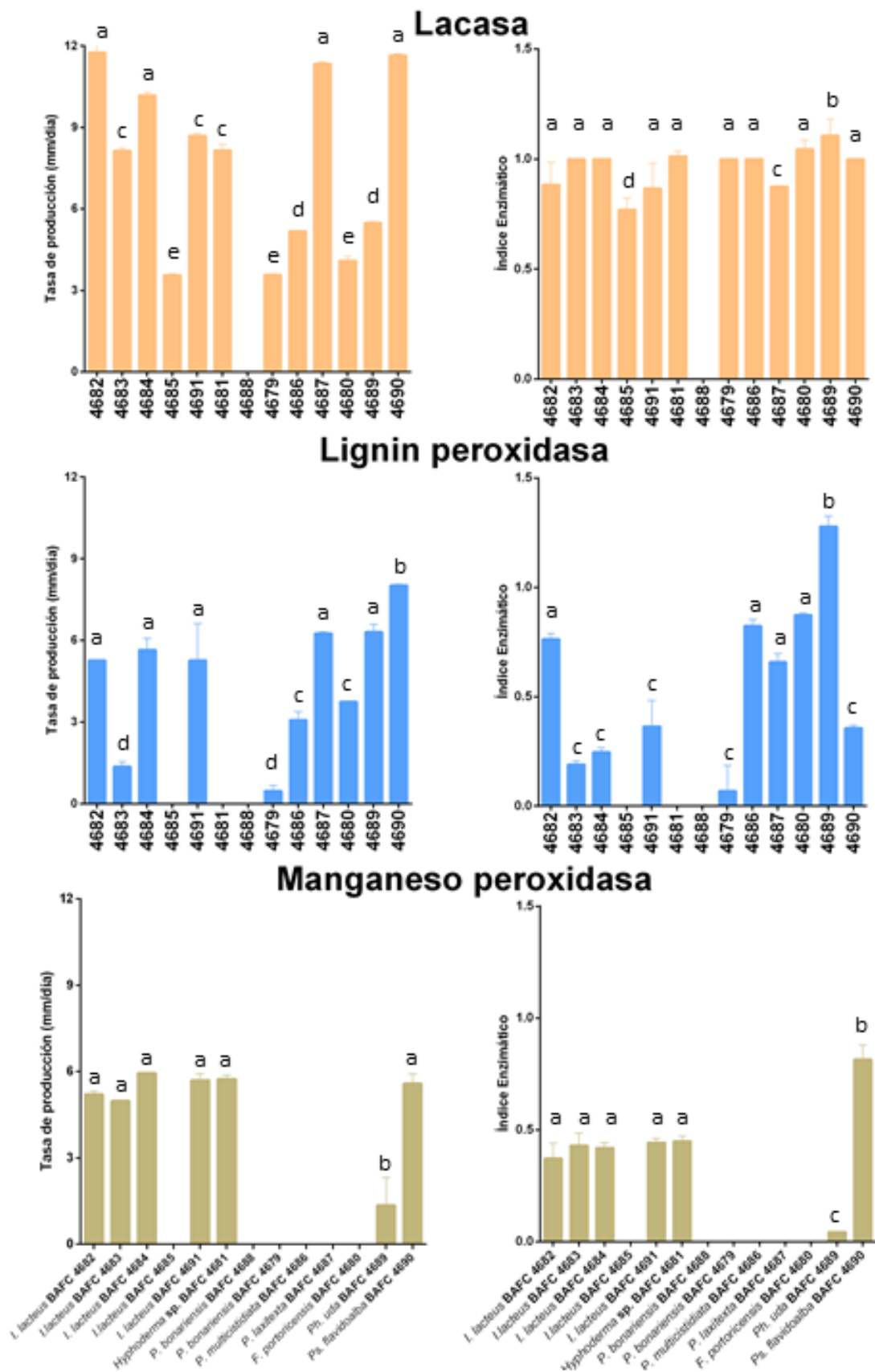
**Figura 1.3.2:** Tasa de crecimiento determinada como la variación del radio de la colonia por día para las cepas de hongos corticioides en medio MGA (control) o en el mismo medio conteniendo DMP 1 mM, Azure B 0,05 mM o MnSO<sub>4</sub> 1 mM. Los tratamientos marcados con \* no mostraron diferencias significativas entre sí. Los ensayos se realizaron por triplicado graficando su media y desvío estándar.

Respecto de las actividades enzimáticas, éstas se evaluaron determinando la tasa de producción enzimática (diámetro del halo de actividad/día) e índice enzimático (cociente entre halos de actividad y crecimiento, al colonizar el 50% de la superficie de la caja) para normalizar las actividades haciéndolas independientes de la tasa de crecimiento.

Todas las cepas fueron capaces de oxidar DMP, excepto *P. bonariensis* BAFC 4688, cepa en la que tampoco se detectó actividad sobre Mn o Azure B. De las otras 12 cepas, 11 mostraron índices enzimáticos cercanos o iguales a 1 indicando que la producción de lacasas acompañó al crecimiento y probablemente como parte del metabolismo primario, mientras que *Ph. uda* BAFC 4689, mostró un índice enzimático superior a 1 (Figura 1.3.3).

En 10 cepas se detectó actividad LiP (evidenciada por la capacidad para decolorar Azure B) y en todos los casos el índice enzimático fue menor a 1, salvo en *Ph. uda* (índice enzimático  $1,27 \pm 0,04$ ), en la cual la actividad enzimática se dispersó en un radio mayor al de crecimiento (Figura 1.3.3). Este índice para *Ph. uda* se mantuvo a partir del tercer día de cultivo (datos no mostrados). *Ps. flavidoalba* BAFC4690 se destacó por su producción de LiP en placa perfilándose como una cepa con potencial para producción enzimática, y junto con *P. laxitexta* resultaron los organismos que mejor toleraron la presencia de Azure B en el medio de cultivo (Figura 1.3.2).

La actividad MnP sólo fue detectada en 8 de las cepas analizadas. Las cepas de *I. lacteus* (salvo BAFC 4685), *Hyphoderma* sp. y *Ps. flavidoalba* registraron índices más altos de actividad MnP, los cuales alcanzaron valores de aproximadamente 0,5 y no mostraron diferencias significativas entre sí (ANOVA  $p < 0,05$ ) (Figura 1.3.3). Por otro lado, no se pudo determinar la tasa de producción de *F. portoricensis* puesto que mostró un patrón de actividad no radial y con formas irregulares.



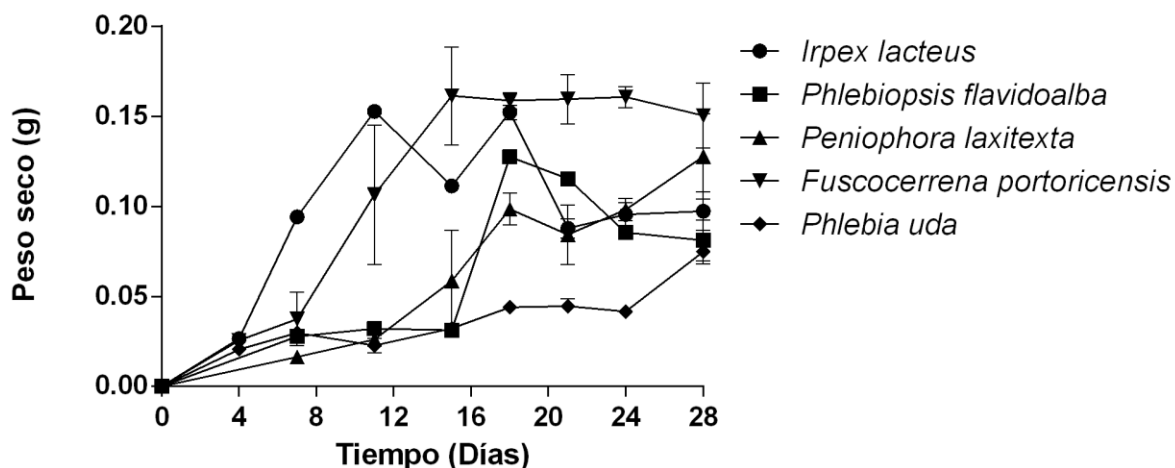
**Figura 1.3.3:** Tasa de producción de actividad lacasa (naranja), LiP (azul) y MnP (marrón) y sus respectivos índices enzimáticos obtenidos como la razón entre el radio del halo de actividad enzimática revelado con cada sustrato y el radio de crecimiento. Los ensayos se realizaron por triplicado graficando su media y desvío estándar.

A partir de los resultados obtenidos en este primer relevamiento, se seleccionaron cinco cepas para evaluar su producción enzimática en medio líquido: *Ph. uda* (BAFC 4689), ya que produjo actividad en los tres sustratos evaluados y registró el mayor índice enzimático de actividad LiP y el segundo de actividad lacasa, *F. portoricensis* (BAFC 4680) por tener un índice de actividad LiP cercano a 1 y actividad MnP; *Ps. flavidoalba* (BAFC 4690) e *I. lacteus* (BAFC 4682) por mostrar los índices de actividad MnP más altos y a *P. laxitexta* (BAFC 4687) por tener la velocidad de crecimiento más alta y presentar actividad lacasa y LiP.

### **1.3.3.2. Determinación de la actividad lacasa y peroxidasa en medio líquido**

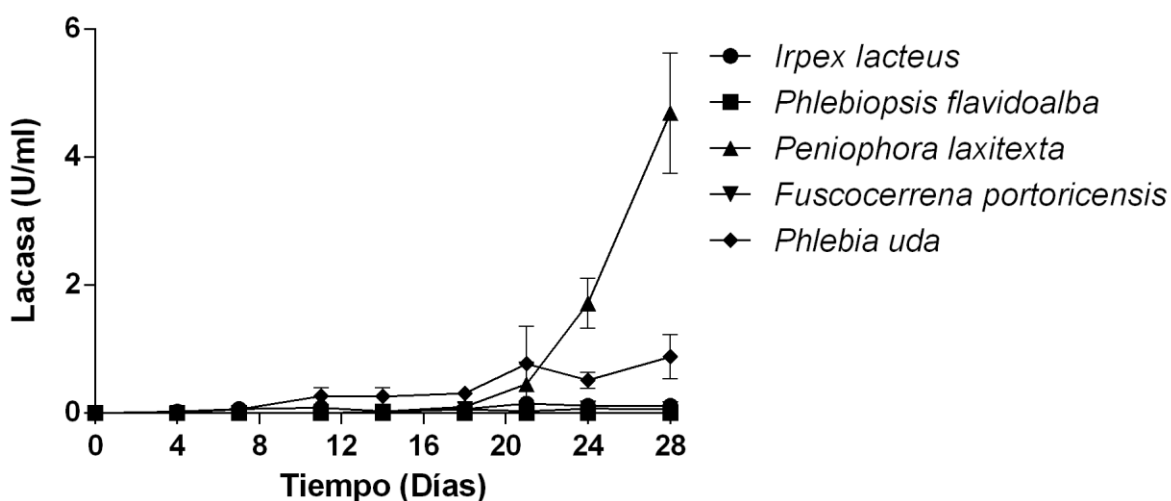
La producción de enzimas ligninolíticas por HCPBs depende principalmente de la composición del medio de cultivo, siendo los factores principales la concentración y tipo de fuentes de carbono y nitrógeno, como así también la proporción entre estas (Levin et al., 2010). Otro factor de importancia para la producción de enzimas ligninolíticas es la presencia de inductores como Cu o VA. Debido a esto y como segundo criterio de selección, se determinó la cinética de producción de lacasas y peroxidasas en medio líquido GA conteniendo VA y Cu en las cepas previamente seleccionadas por su actividad enzimática y crecimiento en medio agarizado.

*I. lacteus* y *F. portoricensis* fueron las cepas de mayor crecimiento, registrando sus máximos al día 11 y 15 de cultivo respectivamente. Por otro lado, todas las cepas salvo *Ph. uda* alcanzaron la etapa de crecimiento estacionario entre los 10 y 20 días de cultivo (Figura 1.3.4).



**Figura 1.3.4:** Crecimiento (determinado midiendo peso seco del micelio) de *I. lacteus* BAFC 4684, *P. laxitexta* BAFC 4687, *Ph. uda* BAFC 4689, *F. portoricensis* BAFC 4680 y *Ps. flavidoalba* BAFC 4690 en GA-Cu-VA. Los ensayos se realizaron por triplicado graficando su media y desvío estándar

Respecto de las actividades enzimáticas, sólo se detectó actividad lacasa en los sobrenadantes de cultivo de *P. laxitexta* y *Ph. uda*, registrando valores máximos de  $4,69 \pm 0,94$  y  $1,07 \pm 0,07$  U/mL a los 28 días de crecimiento, respectivamente (Figura 1.3.5). En el caso de la actividad peroxidasa, ésta fue detectada sólo en *Ph. uda* ( $0,11 \pm 0,4$  U/mL), coincidiendo con los resultados obtenidos en medio agarizado, en el cual ésta fue la única cepa que mostró un índice de actividad LiP > 1.



**Figura 1.3.5:** Curvas de actividad lacasa de las cepas *I. lacteus* BAFC 4684, *P. laxitexta* BAFC 4687, *Ph. uda* BAFC 4689, *F. portoricensis* BAFC 4680 y *Ps. flavidoalba* BAFC 4690 cultivadas en medio GA-Cu-VA durante 28 días. *Ps. flavidoalba* no mostró actividad lacasa. Los ensayos se realizaron por triplicado graficando su media y desvío estándar

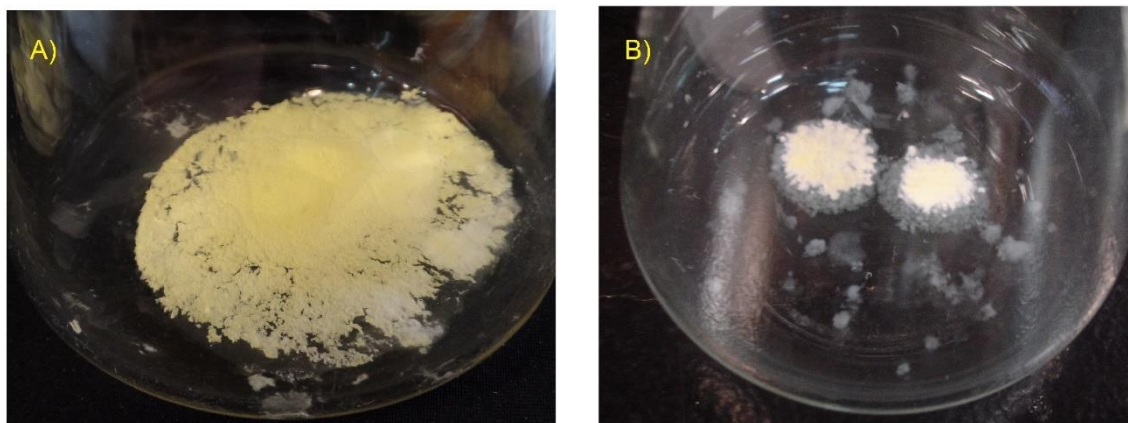


### 1.3.3.3. Producción de enzimas ligninolíticas por *Ph. uda* y *P. laxitexta* en medio líquido

A partir de los resultados de expresión de enzimas ligninolíticas se seleccionaron dos cepas para realizar los ensayos de inmovilización en soportes inertes: *Ph. uda* y *P. laxitexta*. En una primera etapa se investigó el efecto en la expresión de las enzimas de interés en medios conteniendo diferentes fuentes de nitrógeno y los inductores de actividad ligninolítica Cu y VA.

### 1.3.3.4. Toxicidad del cobre sobre *Ph. uda* y *P. laxitexta*

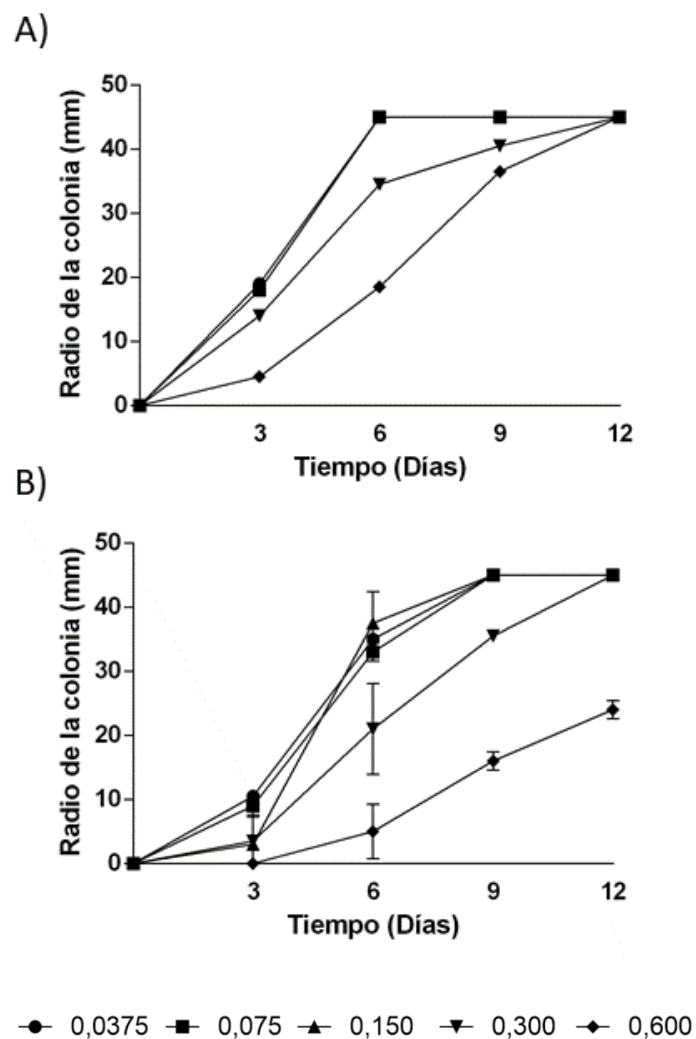
Las lacasas son oxidasas cuyo sitio activo contiene cuatro átomos de cobre que son cofactores esenciales para su función. Por otro lado, los genes codificantes de lacasas fúngicas poseen zonas regulatorias de la expresión que responden a metales pesados y/o xenobióticos, por lo que la presencia de cobre es primordial para obtener una alta producción de enzima activa (Piscitelli et al., 2011). Sin embargo, un exceso de cobre puede ser tóxico, produciendo una disminución en la tasa de crecimiento (Baldrian, 2003). En el primer ensayo en medio líquido GA se observó que la morfología de las colonias cambiaba notoriamente en ausencia o presencia de Cu (0,67 mM), lo que podría indicar posibles signos de toxicidad (Figura 1.3.6). Por ello se decidió evaluar el efecto de distintas concentraciones de cobre sobre el crecimiento de *Ph. uda* y *P. laxitexta*.



**Figura 1.3.6:** Aspecto de las colonias de *Ph. uda* desarrolladas en medio de cultivo líquido MG en el que formó una película única de micelio “mat” (alfombra) (A) y en medio GA-Cu-VA (B) conteniendo 0,67 mM  $\text{CuSO}_4$  en las que el inóculo se fragmentó y desarrolló varias colonias.



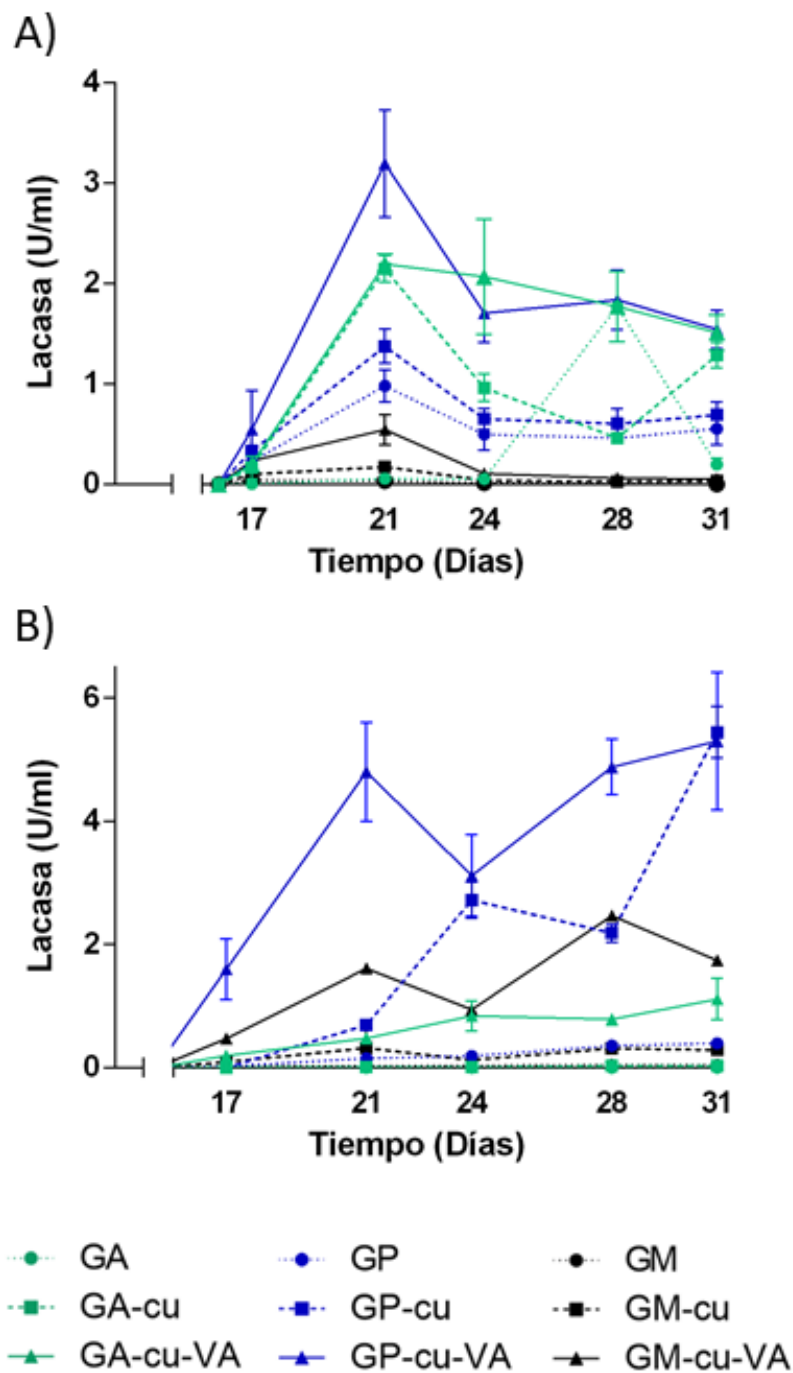
En ambos casos se observó una disminución significativa en la tasa de crecimiento con concentraciones de cobre mayores a 0,3 mM. Sin embargo, ambas cepas alcanzaron el mismo crecimiento final al día 12 de cultivo en concentraciones de cobre iguales o menores a 0,3 mM (Figura 1.3.7). En virtud de los resultados obtenidos, en los ensayos posteriores se redujo la concentración de cobre de 0,67 a 0,3 mM para reducir el efecto tóxico sobre la producción de biomasa.



**Figura 1.3.7:** Crecimiento radial de *P. laxitexta* (A) y *Ph. uda* (B) cultivadas en placas con medio MGA suplementado con sulfato de cobre en las concentraciones 0,0375; 0,075; 0,15; 0,3 y 0,6 mM. Los ensayos se realizaron por triplicado graficando su media y desvío estándar

#### **1.3.4. Análisis de condiciones de cultivo que favorecen la producción de enzimas ligninolíticas por *Ph. uda* y *P. laxitexta* en medio líquido**

Con el fin de incrementar la producción de lacasas y peroxidases por *P. laxitexta* y *Ph. uda* se evaluó el cultivo en medio líquido con diferentes fuentes de nitrógeno (Asparagina -GA-, peptona -GP- o extracto de malta -GM-), suplementados o no con cobre y veratril alcohol. Si bien no se detectó actividad peroxidasa en ninguna de las condiciones ensayadas, sí se observó actividad lacasa a partir del día 17 de cultivo con máximos al día 21 para *P. laxitexta* y al día 31 para *Ph. uda* (Figura 1.3.8). Las diferentes fuentes de nitrógeno ensayadas y los inductores de actividad ligninolítica agregados al medio de cultivo afectaron la producción de lacasa en los dos organismos estudiados. Los mayores títulos de lacasa se obtuvieron en ambos casos utilizando peptona como fuente de nitrógeno (GP) (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Tabla 1.3.2). Por otra parte, la presencia de cobre y veratril alcohol tuvo un efecto aditivo en la producción de lacasas en todos los medios ensayados. En las dos cepas, los máximos títulos de lacasa se registraron en el medio GP-Cu-VA (Cu 0,3 mM) al día 21,  $3,19 \pm 0,7$  U/mL (*P. laxitexta*) y  $4,80 \pm 0,80$  U/mL (*Ph. uda*) (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Tabla 1.3.2), por lo que este medio fue seleccionado para los ensayos de inmovilización.



**Figura 1.3.8:** Cinética de producción de lacasa por *P. laxitexta* (A) y *Ph. uda* (B) en diferentes medios de cultivo: GA (glucosa/ asparagina), GP (glucosa/peptona), GM (glucosa/malta) con agregado de cobre 0,3 mM (Cu) y veratril alcohol 2 mM (VA). Los ensayos se realizaron por triplicado graficando su media y desvío estándar

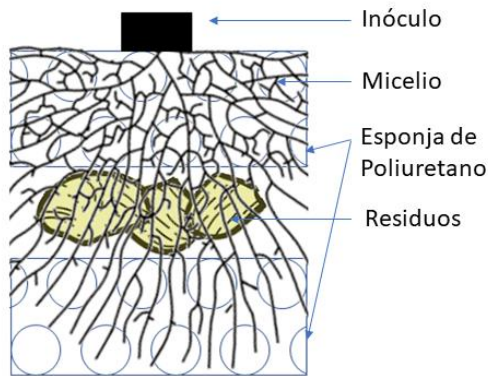
Medio de cultivo	Inductor enzimático	Act. lacasa (U/mL)	
		<i>P. laxitexta</i>	<i>Ph. uda</i>
GA	-	0,60 ± 0,012	0
	Cu	1,280 ± 0,12	0,013 ± 0,005
	Cu + VA	2,167 ± 0,074	0,480 ± 0,030
GP	-	0,984 ± 0,015	0,156 ± 0,015
	Cu	1,370 ± 0,163	0,695 ± 0,080
	Cu + VA	3,190 ± 0,067	4,800 ± 0,800
GM	-	0,060 ± 0,001	0
	Cu	0,161 ± 0,002	0,320 ± 0,029
	Cu + VA	0,580 ± 0,012	1,610 ± 0,050

**Tabla 1.3.2:** Crecimiento y producción de lacasa al día 21 de incubación de *Ph. uda* y *P. laxitexta* en los diferentes medios de cultivo: GA (glucosa/ asparagina), GP (glucosa/ peptona), GM (glucosa/ malta) con agregado de 0,3 mM cobre (Cu) y 2 mM veratril alcohol (VA). Los ensayos se realizaron por triplicado, los valores corresponden a su media y desvío estándar

### 1.3.5. Inmovilización de *P. laxitexta* y *Ph. uda* en soportes inertes mixtos

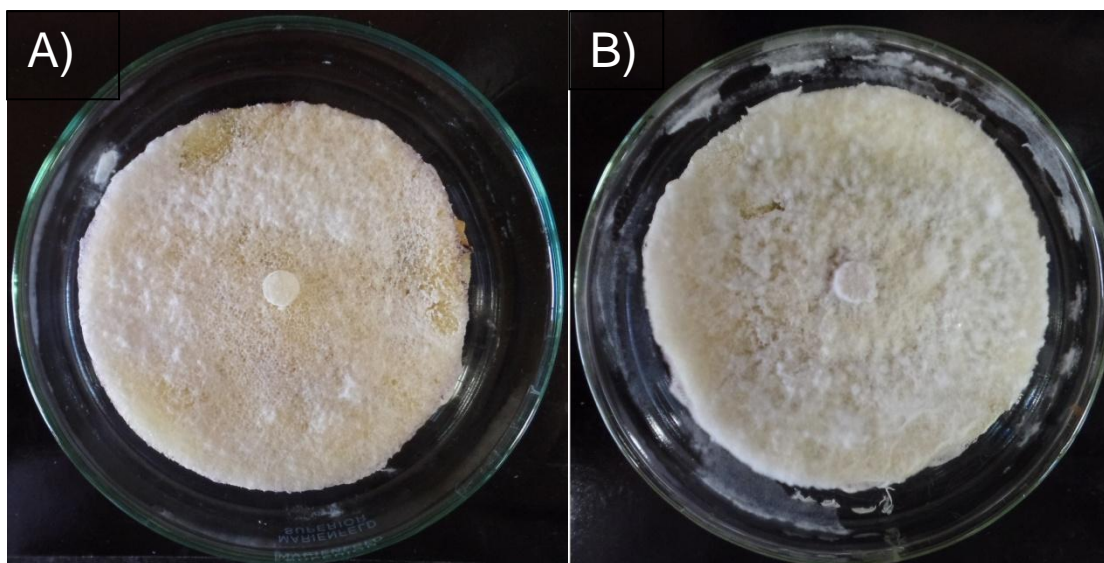
Con el fin de desarrollar un sistema eficiente para la remoción de colorantes sintéticos mediante la combinación de adsorción física y degradación biológica, se ensayó la inmovilización de *P. laxitexta* y *Ph. uda* en soportes inertes formados por espuma de poliuretano (PUF) y soportes mixtos conteniendo sustratos lignocelulósicos: cascarilla de soja (PUF-SH, SH: *soybean hulls*), tripa de celulosa agotada (PUF-SC, SC: *spent casings*) o paja de trigo (PUF-WS, WS: *wheat straw*).

Los soportes diseñados consistieron en dos discos de esponja de poliuretano de 3 mm de espesor superpuestos (PUF) o dos discos de PUF pero incluyendo una capa intermedia de sustratos lignocelulósicos (PUF-SH, PUF-WS, PUF-SC) (Figura 1.3.9). En este diseño, la estructura de la esponja permitió el desarrollo de las fermentaciones de forma aeróbica ya que retuvo el líquido en su malla generando una distribución homogénea y a su vez permitió el intercambio gaseoso debido a la amplia exposición de las superficies.

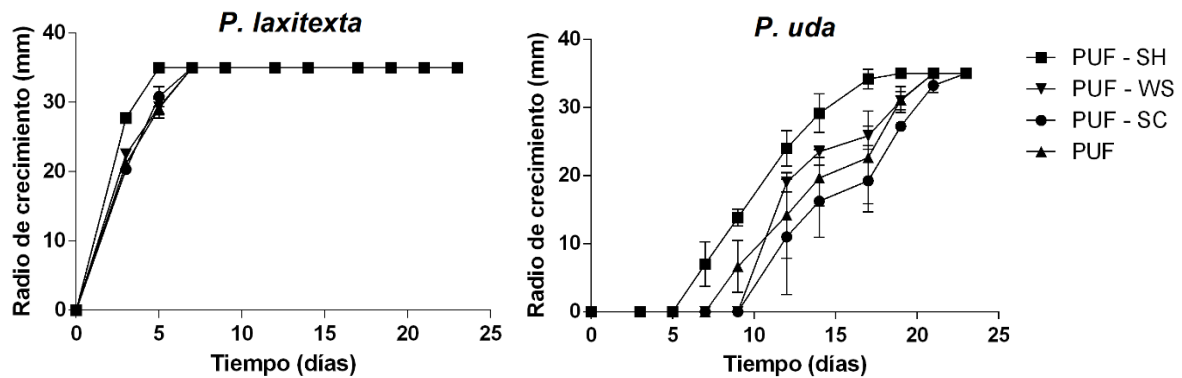


**Figura 1.3.9:** Esquema de los soportes diseñados compuestos por dos capas de esponja de poliuretano y una capa intermedia de sustratos lignocelulósicos.

En ambos casos las inmobilizaciones se realizaron embebiendo los soportes con medio GP-Cu-VA (Cu 0.3 mM) para promover el crecimiento fúngico inicial y la inducción de lacasas. *P. laxitexta* y *Ph. uda* fueron capaces de colonizar todos los soportes evaluados (Figura 1.3.10), aunque con diferentes velocidades. *P. laxitexta* colonizó rápidamente y cubrió toda la superficie de los soportes con cascarilla de soja luego de 5 días y a los 7 días de cultivo en el resto de los casos. Luego de 15 días de incubación se observó un aumento en la densidad de las colonias tornándose blancas y de aspecto algodonoso. *Ph. uda* creció más lentamente, mostró una etapa de adaptación (lag) de entre 7 y 12 días y colonizó la totalidad de la superficie de las esponjas luego de 18 días en los soportes que contenían cascarilla de soja y a los 20-23 días en el resto de los casos (Figura 1.3.11).

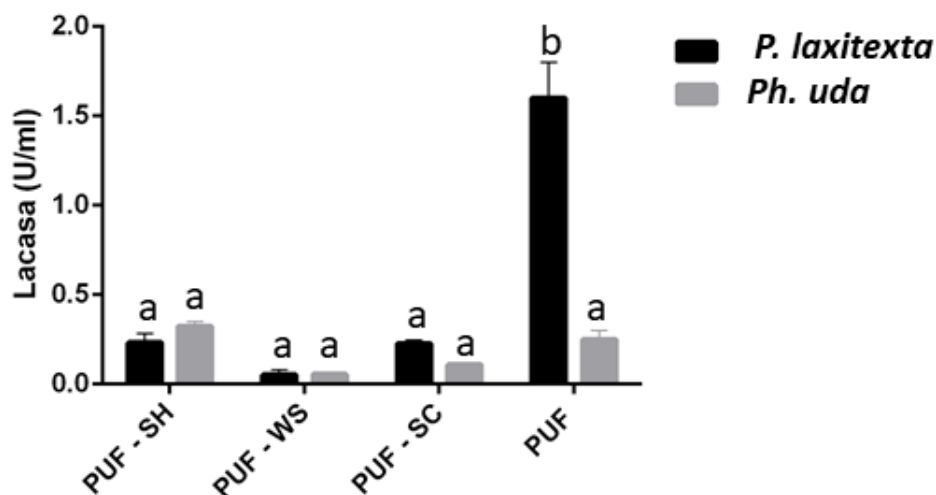


**Figura 1.3.10:** Morfología de las colonias de 21 días de crecimiento de *P. laxitexta* (A) y *Ph. uda* (B) cultivadas en el soporte esponja de poliuretano conteniendo cascarilla de soja (PUF-SH).



**Figura 1.3.11:** Cinética de crecimiento de *P. laxitexta* y *Ph. uda* en los sistemas inmovilizados. Los ensayos se realizaron por triplicado graficando su media y desvío estándar.

La producción de lacasas detectada en los cultivos de *P. laxitexta* inmovilizado en PUF, resultó significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) a la evaluada en los cultivos inmovilizados en presencia de los sustratos lignocelulósicos (Figura 1.3.12). En el caso la actividad lacasa de los cultivos de *Ph. uda* no mostraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).



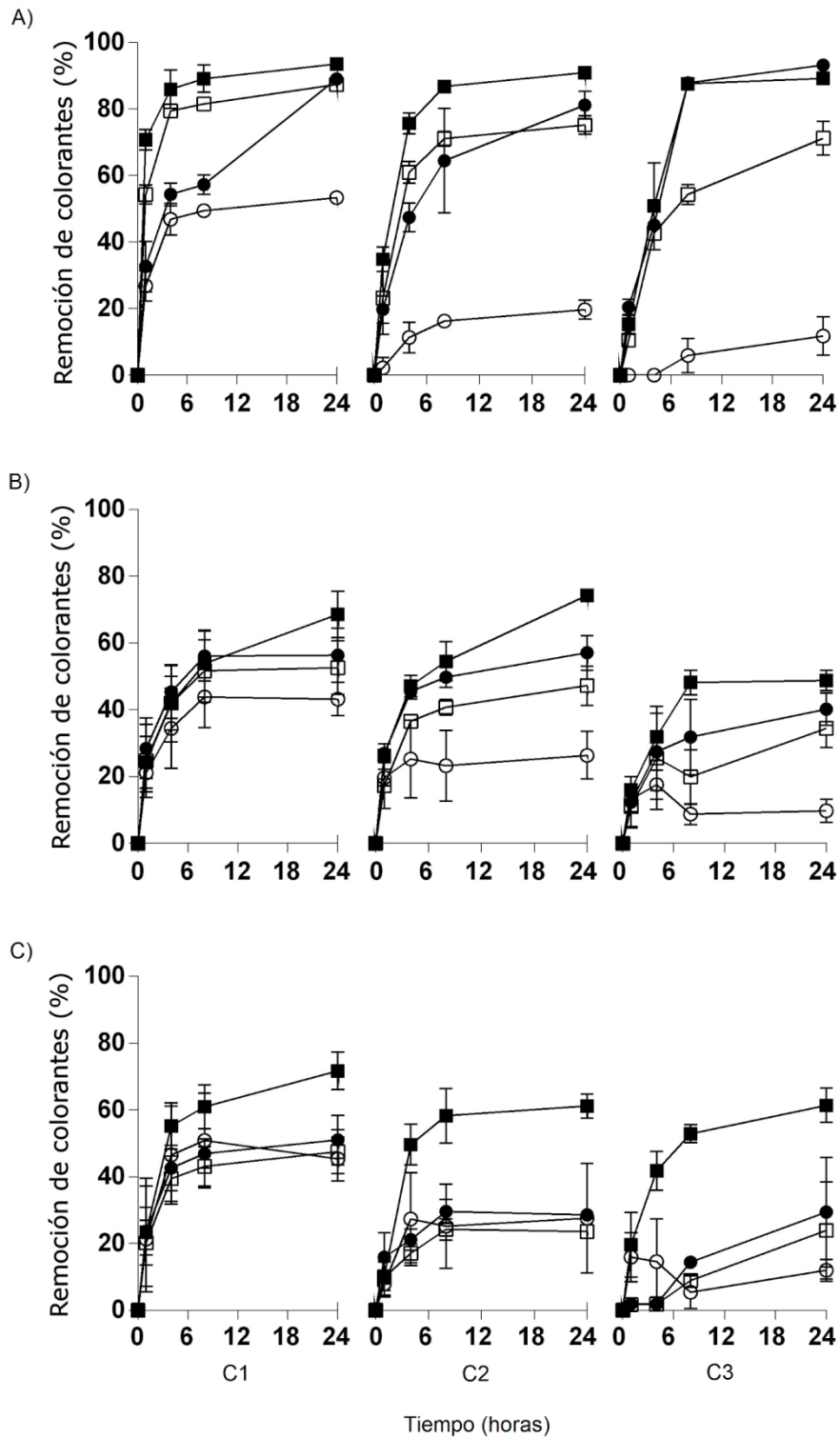
**Figura 1.3.12:** Actividad lacasa detectada en cultivos de 35 días de *P. laxitexta* y *Ph. uda* inmovilizados en los soportes mixtos constituidos por esponja de poliuretano y distintos sustratos lignocelulósicos: SC: Tripa de celulosa; WS: Paja de trigo; SH: Cascarrilla de soja y humedecidos con medio líquido GP-Cu-VA (Cu 0.3 mM). Los ensayos se realizaron por triplicado graficando su media y desvío estándar.

### **1.3.6. Remoción de colorantes industriales por *P. laxitexta* inmovilizada en PUF y PUF-SH.**

Dado que los cultivos de *P. laxitexta* crecieron más rápidamente y produjeron mayores títulos de lacasa que los de *Ph. uda*, los ensayos siguientes se realizaron con este hongo.

Los ensayos de remoción de colorantes se realizaron en tres ciclos de 24 h consecutivos e independientes, reemplazando los sobrenadantes tratados con soluciones frescas de colorante al inicio de cada ciclo. La remoción de VM por *P. laxitexta* inmovilizada tanto en PUF como PUF-SH fue altamente eficiente, alcanzando más de 90% en el primer ciclo de 24 h y más de 80% en el segundo y tercer ciclo (Figura 1.3.13, A). La remoción de RBBR se mantuvo constante en los dos primeros ciclos alcanzando un máximo de decoloración de 57% y 74% en PUF y PUF-SH respectivamente sin mostrar diferencias significativas (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Figura 1.3.13, B). Por otro lado, la remoción de Xi por *P. laxitexta* inmovilizada en PUF-SH fue mayor al 50% en todos los ciclos (Figura 1.3.13, C) mostrando la potencialidad de este sistema combinado para el tratamiento de efluentes con colorantes.

Asimismo, la adsorción de los colorantes en los soportes sin inocular fue mayor en PUF-SH que en PUF, pero menor respecto a los mismos soportes inoculados. A su vez, la capacidad de adsorción de los colorantes disminuyó en cada ciclo.



**Figura 1.3.13:** Remoción de VM (A), RBBR (B) y Xi (C) por *P. laxitexta* inmovilizada en esponjas de poliuretano (PUF) (●) o en esponjas de poliuretano conteniendo cascarilla de soja (PUF-SH) (■) y adsorción del colorante a los respectivos soportes no inoculados (○)(□). La remoción de los colorantes se realizó en tres ciclos consecutivos de 24 h de incubación, reemplazando los sobrenadantes por soluciones nuevas de colorante al inicio de cada ciclo. La remoción del colorante se representó como % respecto a la concentración inicial. Los ensayos se realizaron por triplicado, los errores corresponden a la desviación estándar.



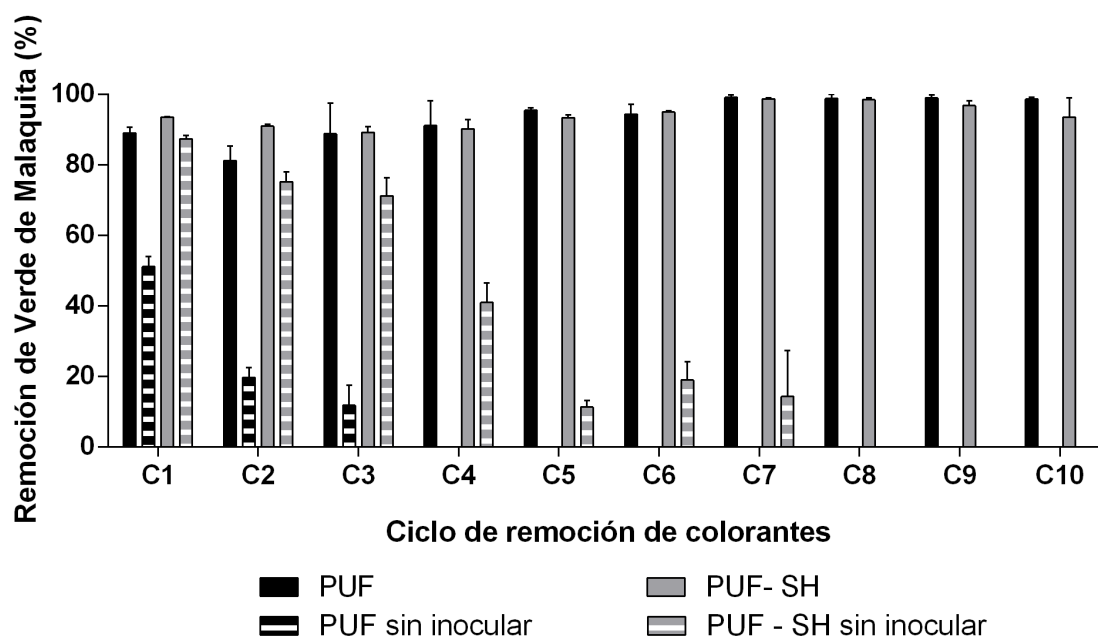
Se midió la actividad lacasa en las soluciones decoloradas al final de cada ciclo registrándose valores muy bajos en el primer y segundo ciclo (0,003-0,034 U/mL), que luego aumentaron en un orden de magnitud en el tercer ciclo (ANOVA,  $p < 0,05$ ), siendo mayores en los cultivos inmovilizados en PUF-SH (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Tabla 1.3.3). A pesar de esto, en los dos primeros ciclos se logró una remoción significativa de los colorantes.

	PUF			PUF-SH		
	C1	C2	C3	C1	C2	C3
<b>VM</b>	0,003 ± 0,001	0,005 ± 0,001	0,136 ± 0,007	0,005 ± 0,001	0,020 ± 0,001	0,270 ± 0,052
<b>RBBR</b>	0,003 ± 0,001	0,025 ± 0,003	0,057 ± 0,004	0,005 ± 0,001	0,031 ± 0,001	0,363 ± 0,041
<b>Xi</b>	0,003 ± 0,001	0,003 ± 0,001	0,066 ± 0,013	0,003 ± 0,001	0,034 ± 0,002	0,247 ± 0,012

**Tabla 1.3.3:** Actividad lacasa (U/mL) determinada al final de 3 ciclos consecutivos (C1-C2-C3) de remoción de Xi, VM o RBBR producida por *P. laxitexta* inmovilizada en PUF o PUF-SH. Los valores corresponden a la media de ensayos realizados por triplicado y desvío estándar.

Para clarificar los mecanismos involucrados en el proceso de remoción, se realizó un nuevo ensayo con VM aumentando el número de ciclos de decoloración a 10. En este ensayo los cultivos de *P. laxitexta* inmovilizados en PUF y PUF-SH mostraron más de 90% de remoción de VM al final de cada uno de los ciclos, mientras que en los soportes PUF y PUF-SH sin inocular decreció la capacidad de adsorción a un 10% luego del tercer y séptimo ciclo, respectivamente (Figura 1.3.14), indicando que éste no es el principal mecanismo involucrado en la remoción del colorante. Por otro lado, a pesar de que ambos sistemas mostraron una eficiencia de remoción similar, la actividad lacasa de los cultivos inmovilizados en PUF aumentó únicamente en el tercer y cuarto ciclo (ANOVA,  $p < 0,05$ ), mientras que en los soportes PUF-SH la actividad lacasa aumentó en el tercer ciclo y luego se mantuvo constante durante el resto del ensayo (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Tabla 1.3.4). Las diferencias en la producción de lacasa entre los tratamientos PUF y PUF-SH podrían indicar que es necesaria la presencia de SH para mantener los niveles de expresión de esta actividad durante el tratamiento. Sin embargo, la mayor producción de lacasa no pudo asociarse con la mayor eficiencia en

la remoción de colorante, lo que sugiere la existencia de otros mecanismos involucrados en el proceso.



**Figura 1.3.14:** C1-10: Ciclos de remoción de VM con *P. laxitexta* inmovilizado en el soporte PUF y PUF-SH con sus respectivos soportes no inoculados. Los ensayos se realizaron por triplicado graficando su media y desvío estándar.

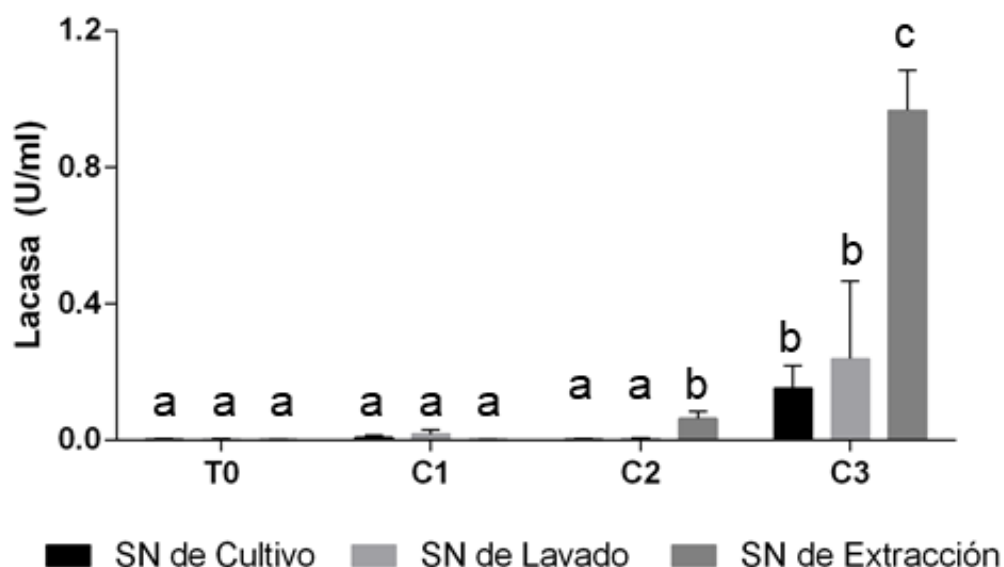
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
<b>PUF</b>	0,006 ± 0,001	0,0084 ± 0,001	0,174 ± 0,015	0,548 ± 0,031	-	-	-	-	-	-
<b>PUF-SH</b>	0,007 ± 0,001	0,031 ± 0,004	0,227 ± 0,013	0,124 ± 0,041	0,690 ± 0,040	0,848 ± 0,099	0,692 ± 0,048	0,932 ± 0,076	0,646 ± 0,059	0,510 ± 0,075

**Tabla 1.3.4:** Actividad lacasa (U/mL) de los sobrenadantes de los tratamientos de remoción del VM, luego de 24 h de incubación con *P. laxitexta* inmovilizada en PUF o PF-SH en diez ciclos consecutivos (C1 a C10). Los ensayos se realizaron por triplicado, los valores corresponden a la media y el error al desvío estándar.

### 1.3.7. Extracción de lacasas asociadas al micelio

Para determinar la posible presencia de lacasas asociadas al micelio se realizó una extracción sonicando el micelio de *P. laxitexta* inmovilizado, antes de ser expuesto al colorante VM y luego de finalizar cada uno de los tres ciclos de remoción de 24 h.

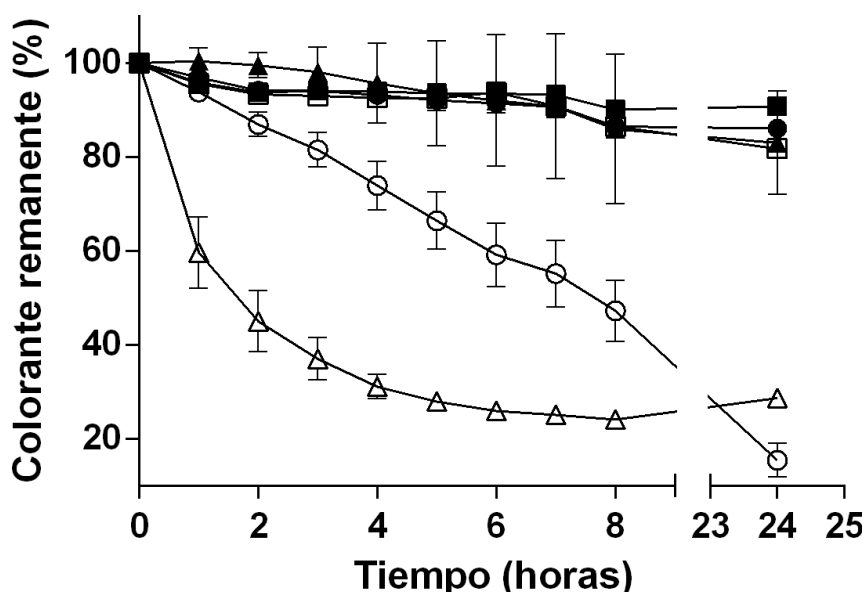
La actividad lacasa en los sobrenadantes de cultivo previa a la exposición a VM (T0) y después del primer ciclo de remoción del colorante (C1), no mostró diferencias respecto a los extractos de los cultivos sonicados. Sin embargo, los extractos de cultivos sonicados del segundo y tercer ciclo de remoción (C2 y C3) mostraron aproximadamente 10 veces más actividad que los sobrenadantes de cultivo confirmando la liberación de enzimas asociadas con el micelio (ANOVA,  $p < 0,05$ ) (Figura 1.3.15).



**Figura 1.3.15:** Actividad lacasa del micelio de *P. laxitexta* cosechado a partir de cultivos en el soporte PUF antes de ser expuestos al colorante VM (T0) y luego de cada uno de los ciclos de remoción (C1, C2 y C3). En cada una de las etapas se realizó la determinación antes de realizar la extracción (SN de cultivo), luego del lavado (SN de lavado) y luego de la extracción (SN de extracción). Los ensayos se realizaron por triplicado graficando su media y desvío estándar.

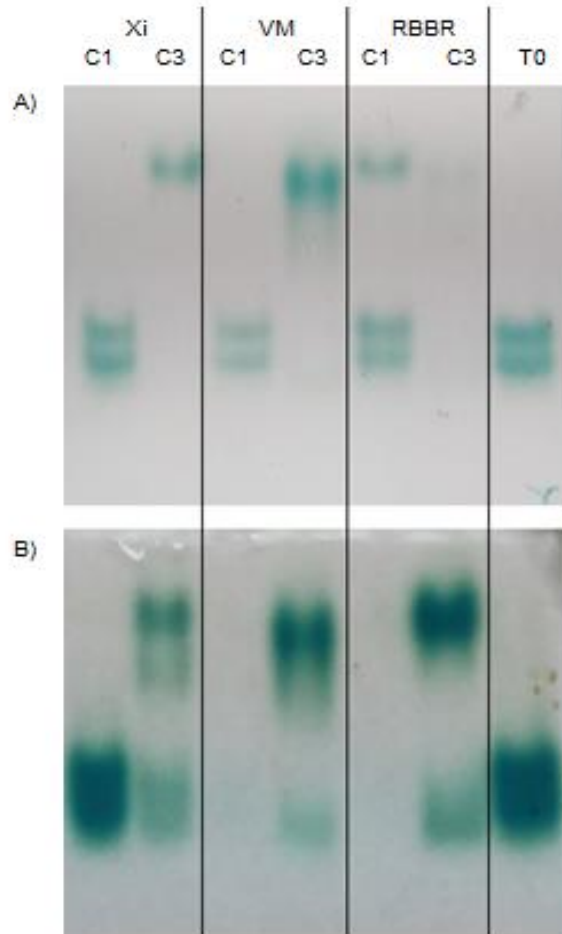
### 1.3.8. Inducción de la expresión de nuevas isoformas de lacasa con alta capacidad de decoloración por exposición a los colorantes

A fin de analizar las propiedades de las lacasas solubles expresadas por *P. laxitexta* inmovilizado se realizó un ensayo de decoloración de VM, RBBR y Xi utilizando como fuente de enzimas, los sobrenadantes de los ensayos de remoción de VM antes de ser expuestos al colorante (T0) y luego del ciclo C3. Aunque el sobrenadante del ensayo previo a la exposición con VM (T0) apenas alcanzó a decolorar el 10% de los tres compuestos ensayados, el sobrenadante del ciclo C3 de remoción de Verde de Malaquita fue capaz de decolorar respectivamente más del 70% y 90% de RBBR y VM luego de 24 h de incubación, respectivamente (Figura 1.3.16). Sin embargo, este extracto decoloró menos del 10% de Xi, indicando que las isoenzimas inducidas por VM son diferentes a las responsables de la decoloración de Xi observadas en los ensayos previos (Figura 1.3.14, C)



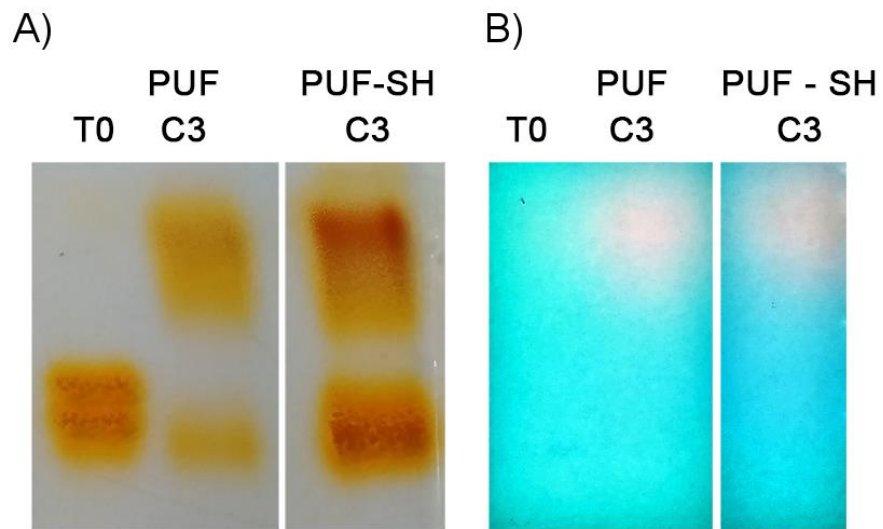
**Figura 1.3.16:** Decoloración de VM (círculos), RBBR (triángulos) y Xi (cuadrados) con los sobrenadantes de cultivo (conteniendo 50 U/L de lacasa) provenientes del ensayo de remoción del VM con *P. laxitexta* inmovilizado en PUF-SH antes de ser expuesto al colorante (símbolos negros) y luego del tercer ciclo (C3) (símbolos blancos). Las reacciones de decoloración se realizaron por triplicado a pH 3.5 y 30°C. Las barras de error corresponden a los desvíos estándar.

Estas diferencias entre las capacidades de decoloración de los sobrenadantes podrían explicarse por la inducción de isoformas de lacasas con diferente potencial de óxido-reducción en presencia del VM. Para buscar patrones isoenzimáticos que verifiquen esta hipótesis se analizaron los zimogramas de los sobrenadantes de los ensayos de remoción de colorantes en geles de poliacrilamida (PAGE) nativos. Los zimogramas revelados con ABTS mostraron la presencia de un patrón complejo de expresión de isoenzimas que varió según el sistema (PUF o PUF-SH) y el ciclo de remoción evaluado. En todos los casos se observó la expresión de una a dos isoformas de bajo peso molecular aparente en los sobrenadantes de los ensayos previos a la exposición al colorante (T0) que también se detectaron en los sobrenadantes del ciclo C1. Sin embargo, en el ciclo C3 estas isoformas dejaron de ser mayoritarias y fueron reemplazadas por al menos una isoforma de mayor peso molecular (Figura 1.3.17) que podría ser la responsable de la decoloración observada en la Figura 1.3.16. Dados los resultados se realizaron nuevos geles (Figura 1.3.17) en los que se sumaron los sobrenadantes de la remoción de RBBR y Xi correspondientes a los mismos soportes y ciclos. También se observó un cambio en el perfil de expresión de isoformas de lacasa en presencia de estos 2 colorantes y en los mismos ciclos, salvo en RBBR/PUF en el cual se detectó expresión de una banda de alto peso molecular en el ciclo C1. Asimismo, el patrón isoenzimático registrado en los sobrenadantes de los hongos inmovilizados en PUF fue levemente diferente, ya que no se detectaron isoformas de bajo peso molecular en el ciclo C3, mientras que en PUF-SH aún se pudo observar actividad de estas isoformas.



**Figura 1.3.17:** Zimogramas de actividad lacasa revelada con ABTS de los sobrenadantes provenientes de cultivos de *P. laxitexta* inmovilizados en PUF (a) y PUF-SH (b) previo a la exposición de los cultivos a los colorantes (T0) y luego del primer (C1) y tercer ciclo de decoloración (C3) de Xi, VM y RBBR.

Para determinar el rol de estas isoformas en la decoloración, se realizaron nuevos zimogramas utilizando los sobrenadantes de la remoción de VM y revelando la actividad lacasa con una solución 0,050 mM del mismo colorante. Tanto en los sobrenadantes provenientes de los ensayos con el hongo inmovilizado en PUF o PUF-SH se observó que sólo la isoforma de mayor peso molecular inducida en el ciclo C3 fue capaz de decolorar VM en el gel (Figura 1.3.18). Esto sugiere que sería esta isoenzima soluble una de las responsables de la decoloración por el hongo inmovilizado, sin que pueda descartarse la acción conjunta con otras enzimas o con las lacasas asociadas al micelio. El revelado en paralelo con DMP confirmó los patrones de bandas observados con ABTS.



**Figura 1.3.18:** Zimograma de actividad lacasa revelada con DMP (A) o el colorante VM (B). Las calles se sembraron con sobrenadantes provenientes de cultivos de *P. laxitexta* inmovilizados en PUF o PUF-SH obtenidos previo a la exposición al colorante (T0) y luego del tercer ciclo de remoción del VM (C3).

## 1.4. Discusión

### 1.4.1. Relevamiento de hongos corticioides y prospección de ligninasas

Las especies de hábito corticioide recolectadas y aisladas en la reserva “Costanera Norte – Ciudad Universitaria” correspondieron mayoritariamente al género *Peniophora*. Este género fue previamente encontrado en la reserva, siendo *P. laxitexta* y *P. bonariensis* especies reportadas únicamente en Buenos Aires y descritas por Gomez & Loewenbaum (1976). Por otro lado, se recolectó y aisló *Ps. flavidoalba*, de la cual no se registran reportes previos para la zona, aunque sí en el litoral de Uruguay (Gazzano, 1992).

En la reserva perteneciente al Centro de Investigaciones Antonia Ramos (CIAR) en el partido de Oberá (Misiones) se aislaron e identificaron 8 especies, entre éstas *I. lacteus* fue la más representada con 4 aislamientos. *I. lacteus* es considerada cosmopolita, y ha sido previamente aislada en la provincia de Misiones (Rodríguez et al., 2015). La especie *F. portoricensis* fue reportada varias veces en el mismo bioma (Gerlach et al., 2013; Motato-Vásquez et al., 2015), y también en América del Norte (Zhou et al., 2016). Por último, *Ph. uda* fue descrita sólo en una ocasión en América del Sur, en Colombia (Ruiz & Varela, 2006), siendo el de este trabajo el primer informe de la especie en la zona. Esta especie ha sido reportada principalmente en América del Norte, Europa, Irán, Etiopía y Marruecos (Nakasone, 1997) lo que podría indicar una introducción reciente a América del Sur.

Las especies identificadas en esta tesis se clasifican eco-fisiológicamente como HCPBs, pero para muchas de ellas no existen referencias de determinaciones de actividad ligninolítica, con la excepción de *I. lacteus* y *Ps. flavidoalba* las cuales fueron ampliamente estudiadas (De La Rubia et al., 2002; Novotný et al., 2009; Rodríguez-Rincón et al., 2010). La capacidad para degradar lignocelulosa ha sido investigada en algunas especies del género *Peniophora* por ej. *P. laxitexta* (Robles et al., 2011). Sin embargo, no existen reportes acerca de las otras especies encontradas en esta tesis: *P. bonariensis* y *P. multicistidiata*. De forma similar, *F. portoricensis* se destaca por su capacidad de degradación de madera (Ryvarden, 1982; Gerlach et al., 2013), pero tampoco han sido caracterizadas las enzimas involucradas en el deterioro. Por otro



lado, aunque se reportó la capacidad de *Ph. uda* para degradar el colorante Poly R-478, indicando una posible expresión de actividad peroxidasa (Freitag & Morrell, 1992), como así también su habilidad para degradar dibenzodioxinas policloradas (Kamei et al., 2005) y el pesticida organoclorado heptacloro (Xiao et al., 2011), tampoco se estudió la producción de ligninasas en esta especie.

Los resultados de la prospección de actividades enzimáticas revelaron que todas las cepas fueron capaces de producir al menos una de las actividades ligninolíticas evaluadas, salvo *P. bonariensis*. Estas cepas provienen de basidiomas encontrados en ramas caídas, que en algunos casos sólo presentaban pudriciones leves (ej. el sustrato del cual se aisló *P. bonariensis*). Sin embargo, es posible que algunos hongos de hábito corticioide no utilicen la madera como nutriente, pero sí como soporte para generar estructuras reproductivas y por lo tanto no presenten actividad ligninolítica (Larsson, 2007).

En todas las cepas la tasa de producción de actividad lacasa fue muy similar a la tasa de crecimiento y en consecuencia los índices de esta actividad resultaron cercanos o mayores a 1. La actividad lacasa, a diferencia de otras ligninasas como LiP y MnP, es expresada por muchos HCPBs de forma constitutiva, aunque en bajas concentraciones (Leonowicz et al., 1978). Esto podría explicar su detección durante todo el periodo de crecimiento, aunque su producción se incrementa en la fase de metabolismo secundario (Levin et al., 2010). Por otro lado, existe amplia evidencia de que compuestos fenólicos actúan como inductores de la expresión de isoformas de lacasas (De Souza et al., 2004). Teniendo en cuenta esto, es probable que la presencia del DMP, dada su naturaleza fenólica, haya tenido un efecto durante el crecimiento de las cepas o al menos cierto nivel de toxicidad reflejado en la disminución de la tasa de crecimiento (Figura 1.3.2), así como también en la inducción de actividad lacasa.

En la mayoría de los casos las actividades LiP y MnP se revelaron por detrás de los halos de crecimiento de las colonias (Índice enzimático <1), coherente con el hecho de que estas enzimas se asocian con la fase de metabolismo secundario. Este comportamiento ha sido reportado previamente (Zhao et al., 1996; Levin et al., 2004). Sólo *Ph. uda* mostró un comportamiento diferente con un índice enzimático >1. Esto podría deberse a una mayor difusión de la enzima con respecto a las producidas por otras cepas o a que el mecanismo por el cual este organismo decolora el Azure B no involucra únicamente la actividad LiP. La metodología utilizada para determinar esta actividad fue la desarrollada por Archibald (1992) y adaptada para evidenciar la

actividad enzimática en medio agarizado (Zhao et al., 1996). Esta técnica se basa en que dentro del coctel de enzimas con actividad ligninolítica la enzima LiP es la única capaz de decolorar Azure B, debido a que posee un potencial de oxidación mayor al resto de las peroxidasas y a que es la única capaz de oxidar compuestos no fenólicos sin mediadores o cosustratos. Sin embargo, recientemente se detectaron peroxidasas de menor potencial de óxido-reducción y/o lacasas que en combinación con mediadores oxidan sustratos no fenólicos. Uno de los mecanismos descritos corresponde al producido por *P. cinnabarinus* en el cual el metabolito ácido 3-hidroxiantranílico, intermediario de la síntesis de ácido cinnabarinico, actúa como mediador en la oxidación de ligninas no fenólicas por lacasas (Eggert et al., 1996). Incluso la lacasa purificada de *T. troglia* (de alto potencial redox) fue capaz de oxidar el Azure B en ausencia de mediadores (Grassi et al., 2011). Dado que en el presente trabajo los ensayos se realizaron con el cultivo fúngico, es posible que varias enzimas producidas por el hongo como lacasas, peroxidasas y compuestos asociados a la reducción de hierro involucrados en la producción de radicales hidroxilo en reacciones de Fenton, hayan contribuido a la decoloración (Arantes & Milagres, 2007).

#### **1.4.2. Selección de cepas en medio líquido para utilizarlas en la remoción de colorantes industriales**

Dados los resultados de la prospección enzimática en medio agarizado se seleccionaron 5 cepas, de las cuales sólo *P. laxitexta* y *Ph. uda* produjeron actividad lacasa en medio líquido. Debido a esto se las seleccionó para los ensayos posteriores.

Para la obtención de sistemas fúngicos inmovilizados aptos para la degradación de colorantes no sólo se requiere de hongos capaces de producir altos títulos de enzimas ligninolíticas, sino también tolerantes a la toxicidad de muchos de estos contaminantes y capaces de crecer y secretar enzimas en su presencia. Teniendo en cuenta esto y dado que otras especies pertenecientes al género *Phlebia* y *Peniophora* fueron descritas como buenas productoras de enzimas ligninolíticas (Silvério et al., 2013; Bonugli-Santos et al., 2016), se realizó una segunda selección en medio líquido variando las fuentes de nitrógeno y con el agregado de los inductores de actividad ligninolítica Cu y VA. Los cultivos realizados en medio conteniendo peptona fueron los que produjeron mayor actividad lacasa. Esto puede ser explicado por la naturaleza de

la fuente de nitrógeno. En trabajos previos se comprobó que las fuentes orgánicas favorecen el crecimiento y la producción de lacasa (Levin et al., 2010; Yang et al., 2016). Entre diversas fuentes de nitrógeno evaluadas, la mayor producción de lacasa por *T. trogii*, *Trametes villosa* y *Coriolus antarcticus* se registró con peptona (Levin et al., 2010). A su vez, la presencia de Cu incrementó la producción de esta enzima. El cobre es un conocido inductor de la expresión de lacasa y actúa al menos en dos niveles, a nivel proteico durante la traducción debido a que forma parte de su sitio activo, y a nivel transcripcional operando sobre elementos regulatorios de la transcripción (*enhancers*) cercanos a los promotores de los genes de lacasas como los llamados “Elementos de respuesta a metales” (*Metal response elements: MRE*) (Piscitelli et al., 2011; Yang et al., 2016). Por otro lado, el agregado de VA aumentó la producción de lacasas. Si bien se esperaba que este compuesto indujera la producción de peroxidasas, también se ha descrito su rol sobre la síntesis de lacasas (D’Souza et al., 1999; Yang et al., 2016; Zhuo et al., 2017). Tanto el cobre como distintos compuestos aromáticos fueron utilizados simultáneamente para incrementar la producción de lacasa en *Ganoderma lucidum* (Kuhar & Papinutti, 2014), *Lentinula edodes* (Cavallazzi et al., 2005) y *Lentinula strigosus* (Myasoedova et al., 2008), pero específicamente el uso conjunto de Cu y VA no es tan frecuente. La adición de Cu a cultivos semi-sumergidos de *Lentinus crinitus* creciendo en un medio con VA incrementó su producción de lacasa (Santana et al., 2018). El uso de VA y Cu también se evaluó en la optimización de la producción de lacasas en *G. lucidum* RCK 2011 crecido en fermentación en estado sólido (SSF), obteniéndose altos títulos enzimáticos en presencia de ambos compuestos (Sharma et al., 2019).

### **1.4.3. Inmovilización de las cepas seleccionadas y análisis de la producción enzimática y remoción de colorantes sintéticos**

La utilización de organismos inmovilizados como fuente de enzimas, tiene diversas ventajas sobre el uso de organismos libres: les otorga mayor resistencia a xenobióticos y a variaciones de pH (Kasinath et al., 2003; Silvério et al., 2013; Mainardi et al., 2018), permite el reuso de los sistemas (Sen et al., 2016) y facilita el intercambio de masa (Thongchul & Yang, 2003; Wucherpfennig et al., 2010). Diversos materiales se han ensayado como soportes para la inmovilización de hongos, tanto inertes como

metabolizables (naturales), los que también sirven como fuentes de nutrientes para mantener la viabilidad del hongo y la producción de enzimas. Uno de los principales problemas para la aplicación industrial de estos sistemas inmovilizados, es la preservación de su integridad, la cual se puede dañar en condiciones ambientales adversas o por efecto del metabolismo fúngico (Couto, 2009). Para favorecer la inmovilización de hongos productores de enzimas ligninolíticas, en este trabajo se intentó aprovechar una característica distintiva de los hongos de hábito corticioide: su capacidad para generar basidiomas resupinados o efusos, y en la mayoría de los casos asociados a un contexto monomítico (Donk, 1964; Larsson, 2007), considerando que esta morfología podría asociarse a un sistema de inmovilización fúngica con mejores características reológicas. De esta manera se diseñó un soporte formado por capas finas de esponja de poliuretano con o sin la incorporación de sustratos lignocelulósicos como fuente de nutrientes sobre los que se logró la inmovilización de *Ph. uda* (BAFC 4689) y *P. laxitexta* (BAFC 4687). En todos los casos se detectó la producción de lacasas, pero no de peroxidases, a pesar de que estas actividades habían sido observadas en el *screening* en placa, indicando que el sistema tiene el potencial para optimizarse mediante el estudio de la inducción de estas enzimas. Curiosamente, los títulos de lacasa detectados en los sobrenadantes de cultivo de *P. laxitexta* fueron mayores cuando creció inmovilizado sólo en el soporte inerte (ANOVA,  $p < 0,05$ ), a pesar de que los sustratos lignocelulósicos son conocidos inductores de esta actividad (Elishashvili & Kachlishvili, 2009). Tampoco se registraron diferencias entre las dos especies ni entre los sustratos, en los títulos de lacasa obtenidos, cuando se compararon los sistemas mixtos, a pesar de las diferencias en su composición. El uso de este tipo de estrategias es relativamente novedosa y aun requiere de la optimización del diseño, por ejemplo variando el tipo y cantidad de residuos lignocelulósicos, así como la composición del medio de cultivo empleado para humedecer el sistema. Dados los mayores títulos de lacasa obtenidos con *P. laxitexta*, los ensayos de remoción de colorantes se continuaron con este organismo inmovilizado en PUF o PUF-SH.

Los tratamientos de remoción se realizaron con los colorantes modelo RBBR, VM y Xi. Notablemente, cuando el hongo creció en PUF-SH las tasas de remoción de los colorantes fueron similares o hasta mayores a las registradas utilizando el soporte inerte, a pesar de las diferencias observadas en la actividad lacasa. De la misma manera los porcentajes de remoción de cada uno de los colorantes fueron similares

entre ciclos, pero sólo se detectaron títulos apreciables de lacasa en los sobrenadantes de cultivo del tercer ciclo de decoloración (ANOVA,  $p < 0,05$ ).

Esto podría deberse al efecto de enzimas extracelulares no valoradas, o a la adsorción diferencial de los colorantes al soporte/micelio y la acción de enzimas intracelulares o asociadas al micelio, o incluso mecanismos no enzimáticos (Arantes & Milagres, 2007; Jebapriya & Gnanados, 2013; Deshmukhet et al., 2016).

En *I. lacteus*, lacasas asociadas al micelio fueron las principales enzimas involucradas en la decoloración (Svobodová et al., 2008). De forma similar, el micelio de *Neopestalotiopsis* sp. resultó capaz de decolorar colorantes industriales, pero no el sobrenadante de cultivo, mostrando una posible actividad lacasa asociada a su micelio (Marzall-Pereira et al., 2019). El aumento en la actividad lacasa observado luego del tercer ciclo de decoloración (ANOVA,  $p < 0,05$ ), podría indicar además, la inducción de nuevas isoformas por efecto de la exposición del organismo al colorante. Esto fue verificado al utilizar estos sobrenadantes como fuente de enzimas en nuevos ensayos de decoloración. Los sobrenadantes obtenidos antes de exposición al colorante no tuvieron efecto en las nuevas decoloraciones, mientras que los provenientes de cultivos expuestos actuaron sobre el VM y el RBBR, pero no sobre la Xi, lo que podría deberse a la inducción de isoenzimas con distinto potencial de oxidación en respuesta a los colorantes. La presencia de estas isoenzimas también se confirmó mediante el estudio de los perfiles enzimáticos en geles, en los que se observó la inducción de nuevas lacasas con actividad decolorante en los sobrenadantes de los cultivos previamente expuestos al colorante. Por otro lado, la capacidad de decoloración de extractos enzimáticos con actividad lacasa puede variar dependiendo del potencial de oxidación de los colorantes (Yesilada et al., 2018) y de la enzima involucrada en el proceso, y considerando que el potencial oxidativo de distintas lacasas fúngicas puede variar incluso entre cepas de una misma especie (Arregui et al., 2019), es posible que el potencial de las lacasas expresadas por *P. laxitexta* (BAFC 4687) no les permita actuar sobre la Xi (Tavares et al., 2008; Ancona-Escalante et al., 2018).

La inducción de actividad lacasa por colorantes fue reportada también en otros HCPBs (Piscitelli et al., 2011). El colorante Xi, actúa a nivel de transcripción sobre el gen *lac1* en *T. villosa* (Yaver et al., 1996) y en *T. versicolor* sobre el gen *lcc* (Collins & Dobson, 1997). Colorantes antraquinónicos indujeron la producción de lacasa por *P. cinnabarinus* PC330 (Vanhulle et al., 2007). Por otro lado, las especies del género *Peniophora* contienen en sus genomas múltiples genes codificantes de actividad lacasa

(Nagy et al., 2016). En *P. cinerea* CCB204 se reveló la producción de al menos ocho isoformas de esta enzima (Moreira et al., 2014). Estas isoenzimas pueden tener diferente afinidad por los sustratos y esto afectar su potencial de decoloración (D´Souza et al., 2006; Michniewicz et al., 2008).

Otras especies del género *Peniophora* fueron estudiadas para el tratamiento de colorantes industriales, pero no *P. laxitexta*, siendo este el primer reporte para la especie. *P. cinerea* CCB204 fue seleccionada entre doce especies de HCPBs por su habilidad para decolorar efluentes textiles simulados, conteniendo los colorantes antraquinónicos Azul Brillante de Cibacron y Rojo Cibacron, registrándose un 77% de decoloración a pH 8,1 en 24 h (Moreira Neto et al., 2013). Las lacasas purificadas de este organismo fueron capaces de decolorar *in vitro* en presencia de altas concentraciones de sales, 90% del colorante RBBR (Moreira et al., 2014). Por otro lado, *Peniophora* sp. CBMAI 1063, aislado de bosques cercanos a la costa del sur de Brasil, fue utilizada para la decoloración del colorante Negro Reactivo 5 en condiciones de alta salinidad, detectándose un 98% de decoloración en 5 días, con una reducción del carbono orgánico total, y ausencia de metabolitos mutagénicos (Bonugli-Santos et al., 2016). En este caso la principal actividad ligninolítica relacionada con la decoloración fue la MnP y no la actividad lacasa como en *P. laxitexta*.

A pesar de la demostrada capacidad de numerosos HCPBs para la remoción de colorantes, el uso de sistemas fúngicos inmovilizados a escala industrial sigue siendo un desafío tecnológico (Rodríguez Couto, 2017). Recientemente se ha patentado un biocarrier laminar basado en un consorcio de hongos degradadores de madera inmovilizado en un sustrato lignocelulósico, para ser utilizado en la remoción de colorantes (Rodríguez & Cárdenas, 2018). El sistema desarrollado en esta tesis utilizando el hongo de hábito corticiode *P. laxitexta* inmovilizado en un soporte mixto constituido por esponja de poliuretano-cascarilla de soja, demostró también potencial para el tratamiento de efluentes coloreados. *P. laxitexta* creció formando una malla compacta que recubrió el soporte y permitió la reutilización del sistema sin que éste pierda su integridad luego de sucesivos ciclos de reutilización, removiendo eficientemente distintos colorantes.

## 1.5. Conclusiones

1. Se aislaron e identificaron 13 cepas de hongos con hábito de crecimiento corticioide, principalmente de los géneros *Irpex* y *Peniophora*, entre las que se encontró la especie *Phlebia (Mycoacia) uda*, siendo éste el primer registro para la región.
2. Se realizó un esquema secuencial de relevamiento de crecimiento y expresión de actividades lacasa y peroxidasa en medio agarizado y medio líquido de estas cepas, seleccionándose *Ph. uda* y *P. laxitexta* como candidatas para su inmovilización.
3. Tanto *P. laxitexta* como *Ph. uda* fueron capaces de colonizar los soportes inertes y mixtos diseñados en esta tesis, formando estructuras compactas capaces de producir lacasas.
4. *P. laxitexta* inmovilizado en el soporte inerte y en el mixto conteniendo cascarilla de soja fue capaz de remover eficientemente los colorantes Xi y RBBR en al menos tres ciclos de incubación consecutivos y el colorante VM en al menos 10 ciclos, comprobándose así su potencial para ser aplicado y reutilizado en tratamientos de remoción de colorantes.
5. Se determinó que la remoción de los colorantes se debió a un efecto conjunto de la adsorción física al soporte y al sustrato en los primeros ciclos, y a la actividad de enzimas secretadas solubles y asociadas al micelio.
6. Se confirmó la inducción de nuevas isoformas de lacasas en respuesta a la exposición a los colorantes.

– Capítulo 2 –

“Caracterización y prospección de enzimas involucradas en la degradación de lignocelulosa en cepas de *Geastrum*”



## 2.1. Hipótesis y objetivos

### Hipótesis

- La secuenciación y análisis de los transcriptomas de cepas de *Geastrum* obtenidas a partir de suelos calcáreos permitirá identificar transcriptos de enzimas lignocelulolíticas novedosas, con potencial biotecnológico.

### Objetivos

- Identificar condiciones de cultivo que promuevan el crecimiento de especies de *Geastrum* y la producción de enzimas lignocelulolíticas.
- Realizar la secuenciación y anotación funcional de los transcriptomas de las especies de *Geastrum* crecidas en sustratos lignocelulósicos.
- Identificar transcriptos codificantes de nuevas enzimas modificadoras de lignina mediante la prospección *in silico* de los transcriptomas obtenidos en este trabajo.

## 2.2. Materiales y Métodos

### 2.2.1. Microorganismos

Las cepas de *Geastrum schweinitzii* BAFC 3002, *Geastrum argentinum* BAFC 3282 y *Geastrum triplex* BAFC 3013 utilizadas en esta tesis fueron obtenidas del cepario BAFC (Buenos Aires Facultad de Ciencias) del Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Los cultivos se mantuvieron medio MGA a 4°C.

### 2.2.2. Cultivos líquidos de *Geastrum*

Las tres especies de *Geastrum* se cultivaron en dos tipos de medios inductores de enzimas lignolíticas: MG-Cu compuesto por extracto de malta 12,7 g/L, Glucosa 10 g/L y 100 µM CuSO<sub>4</sub> y en extractos de sustratos lignocelulósicos.

Los cultivos en medio MG-Cu se realizaron en Erlenmeyers de 100 mL conteniendo 20 mL de medio líquido ajustado a pHs 6, 7 u 8 con 1 M HCl o 1 M NaOH. El inóculo consistió en 1 disco de 6 mm de diámetro proveniente de cultivos incubados 45 días en medio MGA. Los cultivos se incubaron en condiciones estáticas 50 días a 28°C, en oscuridad y cosecharon por filtración utilizando embudos tipo Büchner y filtros de celulosa. El micelio filtrado se secó en estufa a 80°C durante 8 h y se pesó en balanza de precisión. Los sobrenadantes de cultivo fueron conservados en tubos a -20°C para determinaciones enzimáticas.

Los extractos de sustratos lignocelulósicos se obtuvieron hirviendo durante 1 h 20 g de cascarilla de soja, semilla de avena o paja de trigo en 100 mL de agua destilada. Se enfrió, se separó el líquido con tamiz y centrifugó a 5000 g durante 15 min. Una vez obtenidas las soluciones se trasvasaron 15 mL a Erlenmeyers de 150 mL y se autoclavaron durante 15 min a 121°C. Los medios de cultivo se inocularon con discos de agar de 25 mm<sup>2</sup> de una colonia de 25 días de crecimiento en MGA e incubaron en oscuridad, a 28°C, durante 45 días. Se tomaron muestras de los sobrenadantes de cultivo cada 10 días y guardaron a -20°C para realizar determinaciones enzimáticas.

En todos los casos se determinó la actividad lacasa y peroxidasa a 30°C y pH 3,6 y 5, respectivamente como se describe en la sección 1.2.9.1.

### 2.2.3. Fermentaciones en estado sólido (SSF) de *Geastrum*

*G. argentinum* y *G. schweinitzii* se cultivaron en frascos Erlenmeyer de 125 mL con 16 g de cascarilla de soja, semilla de avena o paja de trigo al 80% de humedad, el medio de cultivo se esterilizó en autoclave, se inoculó con 1 disco de agar de 25 mm<sup>2</sup> de una colonia de 25 días de crecimiento en MGA y se incubó en oscuridad, a 28°C, durante 45 días.

### 2.2.4. Extracción de ARN

Las extracciones de ARN total se hicieron a partir de cultivos de las tres especies de *Geastrum* crecidas en SSF en los distintos sustratos lignocelulósicos. Con el fin de seleccionar micelio en el mismo estado fisiológico, se tomaron secciones del cultivo correspondientes a las células en fase de crecimiento exponencial (margen de crecimiento de los cultivos) y que hayan colonizado completamente el sustrato.

Las muestras (200 mg) se molieron en un mortero con nitrógeno líquido para obtener un fino polvo al que se le agregó 1,25 mL/g de tejido de buffer de extracción (Tris-HCl 10 mM pH 9, SDS 1%, β-mercaptoetanol 1%). Una vez homogeneizadas, las soluciones se transfirieron a tubos de microcentrífuga y se agregó 1 volumen de fenol-cloroformo, mezclando por inversión durante 10 min, seguidos de una centrifugación a 15.000 g durante 15 min a 4°C para separar las fases. La fase acuosa se transfirió entonces a un nuevo tubo y se repitió la extracción con fenol-cloroformo. Para purificar el ARN extraído, la fase acuosa se precipitó agregando 1 volumen de LiCl 4 M (previamente enfriado a -20°C), se mezcló por inversión y se incubó a -4°C durante 2 h, seguido de una centrifugación a 12.000 g por 10 min a 4°C y resuspendió el *pellet* en 250 μL de agua libre de ARNasas. Luego se agregó un volumen de 3 M acetato de sodio pH 5,5 y dos volúmenes de etanol 100%, ambas soluciones a previamente enfriadas a -20°C, se agitó con vortex y se incubó -20°C durante toda la noche, seguida de una centrifugación a 12.000 g durante 30 min a -4°C. El *pellet* obtenido se lavó 2 veces con 500 μL etanol 75% frío, centrifugando a 12.000 g por 10 min cada vez. Una vez lavado, se retiró el etanol y se resuspendió el ARN en 50 μL de agua bidestilada libre de ARNasas. El ADN que pueda haber co-precipitado con el ARN total extraído se eliminó mediante un tratamiento con Turbo DNase (Thermo Fisher Scientific),

siguiendo las especificaciones del fabricante. La calidad del ARN extraído se verificó por electroforesis en geles de agarosa desnaturalizantes y libres de ARNasas y se cuantificó con un fluorómetro Qbit (Thermo Fisher Scientific). Todos los buffers y materiales utilizados en la extracción y purificación del ARN fueron libres de ARNasas

### **2.2.5. Preparación de las bibliotecas de ADNc y secuenciación**

Para realizar la secuenciación de los transcriptomas se purificó el ARNm a partir de las soluciones de ARN total utilizando el kit AMPure XP beads (Agencourt). Las soluciones de ARNm se cuantificaron con Qbit y a partir de 700 ng se prepararon las bibliotecas de secuenciación utilizando el kit NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep para Illumina (New England Biolabs). Este kit permite la fragmentación de los mensajeros (350-500 nt de largo), la síntesis del ADNc doble cadena, la ligación de adaptadores específicos y la amplificación por PCR de los fragmentos de ADNc indexados obtenidos. El ADNc correspondiente a cada cepa fue indexado (marcado) mediante la ligación de oligonucleótidos adaptadores específicos (NEBNext® Multiplex Oligos for Illumina, New England Biolabs). Las bibliotecas finales fueron mezcladas y secuenciadas en la plataforma MiSeq (Illumina Inc.) usando un kit V2 MiSeq para realizar una secuenciación 300+300 ciclos para obtener lecturas PE, utilizando el equipamiento disponible en el Laboratorio de Genómica, Biología Molecular y Evolución de Microbios Eucariotas, del Dr. Claudio Slamovitz en la Universidad de Dalhousie, Canadá.

### **2.2.6. Tratamiento de las secuencias y ensamblado de los transcriptomas**

La evaluación de la calidad de las lecturas y su corte (trimming) se realizó con el software Trimmomatic (Bolger et al., 2014). Los parámetros de corte para remover las secuencias de los adaptadores de Illumina y las bases de baja calidad se ajustaron a “suaves” (Phred = 5) según las recomendaciones de MacManes (2014), para promover el descubrimiento de transcriptos. La calidad de las lecturas se evaluó usando el programa FASTQC (Andrews, 2010) antes y después del corte. Las lecturas filtradas se ensamblaron *de novo* utilizando el software Trinity (Haas et al., 2013) con el valor

preestablecido de tamaño de Kmer = 25. Para disminuir el número de ensamblados repetitivos se utilizó el programa CD-HIT-EST (Li & Godzik, 2006) con valor de corte de 95% de identidad de transcriptos. Para evaluar la completitud del transcriptoma ensamblado se realizó una comparación con la base de datos “Basidiomycota” de OrthoDb v9 con el software BUSCO v2 (Benchmarking Universal Single-CopyOrthologs) (<https://busco.ezlab.org/>) (Simão et al., 2015).

### 2.2.7. Anotación Funcional

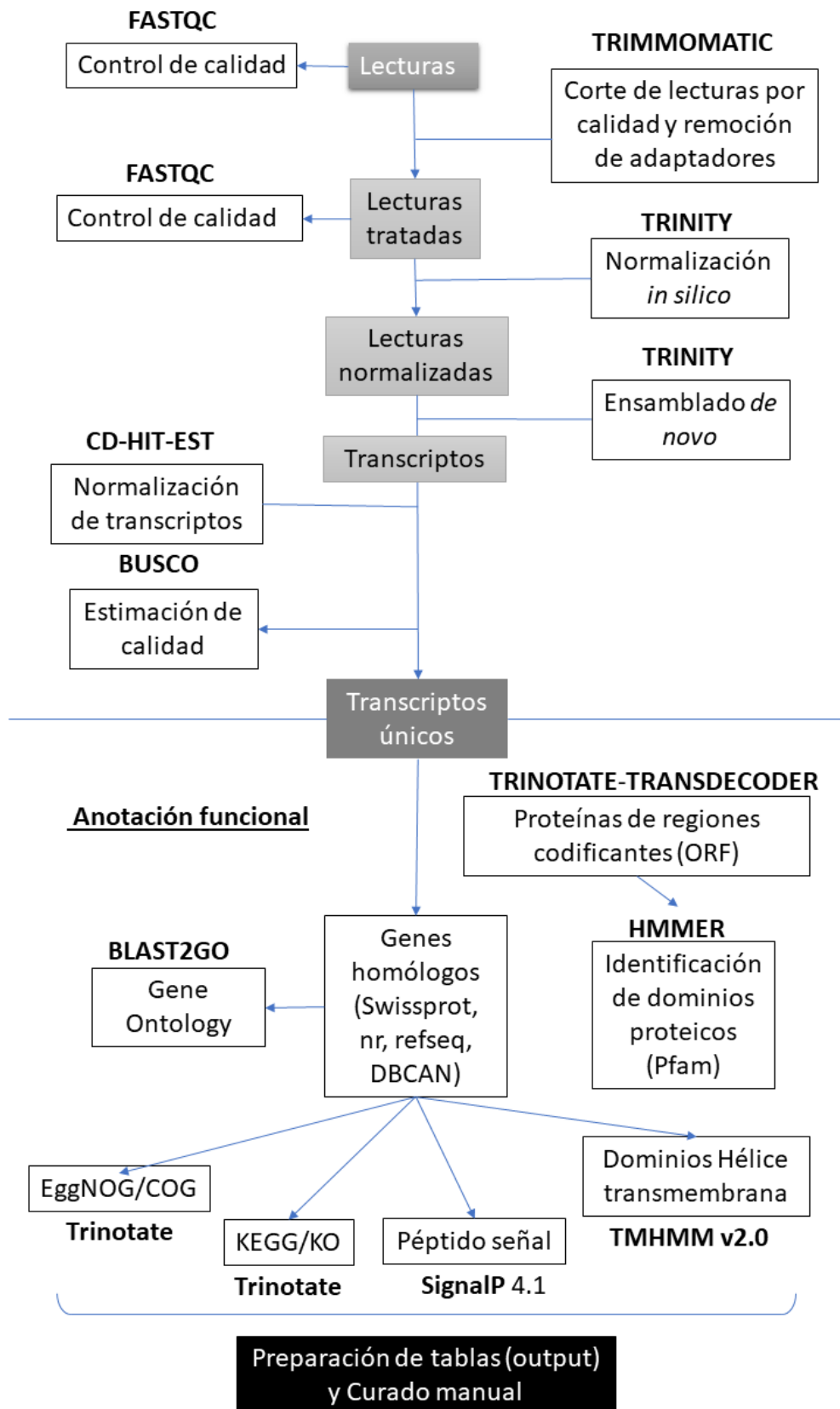
La anotación funcional automática y el análisis general de los transcriptomas de *G. argentinum* y *G. schweinitzii* se realizaron utilizando el *pipeline* Trinotate (Bryant et al., 2017). Usando los contigs ensamblados y filtrados y las secuencias aminoacídicas traducidas para cada ORF predicho se realizaron búsquedas por similitud con los algoritmos Blastx y Blastp de BLAST (NCBI - <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), contra las bases de datos de secuencias proteicas SwissProt (EMBL – EBI <http://www.expasy.org/sprot/>- Acceso 09-2018) de SIB, non-redundant (nr) (NCBI - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/> - Acceso 09-2018) y RefSeq del NCBI (NCBI - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>- Acceso 09-2018), en todos los casos con un valor de corte de e-value=  $10^{-5}$ .

La búsqueda de dominios proteicos se realizó utilizando las bases de datos HMMER (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/>- Acceso 09-2018) y Pfam (<http://pfam.xfam.org/> - Acceso 09-2018) (Finn et al., 2014; 2011), y la predicción de las secuencias de péptidos señal y dominios hélice transmembrana se realizó utilizando los servidores SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Petersen et al., 2011) y TMHMM v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) (Krogh et al., 2001), respectivamente.

Los resultados de Blastx realizados con Trinotate se utilizaron en el software Blast2GO suite para anotar los transcriptos con información Gene Ontology (GO).

La búsqueda de transcriptos correspondientes a familias de proteínas de Enzimas Activas en Carbohidratos (CAZymes - <http://www.cazy.org/>) se realizó utilizando el programa CAZymes Analysis Toolkit (CAT) (<http://cricket.ornl.gov/cgi-bin/cat.cgi>) (Park et al., 2010). El curado y refinamiento de las identidades se realizó de forma manual comparando los resultados de CAT con las anotaciones de Trinotate.

## Tratamiento de las secuencias y ensamblado de los transcriptomas



**Figura 2.2.1:** Esquema de la metodología utilizada el tratamiento de secuencias y ensamblado (MyM 2.2.6) y la anotación funcional de los transcriptos (MyM 2.2.7)

## **2.2.8. Extracción enzimática de los cultivos**

Se realizaron extracciones acuosas a partir de muestras de los cultivos en SSF utilizados para la extracción de ARN. Para esto se tomaron 0,3 g del cultivo en las mismas condiciones que se describieron en la sección 2.2.3, se le agregaron 3 mL de agua destilada y se incubaron en agitación a 150 rpm durante 1 h. El contenido luego se filtró por vacío utilizando embudos tipo Büchner con filtro de celulosa y se centrifugó a 4°C a 5.000 g por 10 min. Los sobrenadantes se separaron en alícuotas y almacenaron a -20°C para realizar determinaciones enzimáticas.

## **2.2.9. Determinaciones enzimáticas**

### **2.2.9.1. Endo- $\beta$ -D-1,4-glucanasa**

La actividad Endo- $\beta$ -D-1,4-glucanasa (endoglucasa, E.C. 3.2.1.4) se determinó espectrofotométricamente utilizando como sustrato 0,4 mL de una solución de carboximetilcelulosa (CMC) al 0,5% en buffer acetato de sodio 50 mM, pH 4,8 (Wood & Bhat, 1988) a la que se le agregó 0,1 mL de los extractos enzimáticos. La reacción se incubó a 50°C durante 30 min. Los azúcares reductores liberados se determinaron con el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS). Una unidad de actividad enzimática (UE) de Endo- $\beta$ -D-1,4-glucanasa se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu$ mol de azúcares reductores por minuto en las condiciones de pH y temperatura de reacción.

### **2.2.9.2. Exo- $\beta$ -D-1,4-glucanasa**

La actividad Exo- $\beta$ -D-1,4-glucanasa (exoglucanasa, E.C. 3.2.1.91) se determinó espectrofotométricamente utilizando como sustrato 0,4 mL de una solución de celulosa cristalina al 1% en buffer acetato de sodio 50 mM, pH 4,8 (Wood & Bhat, 1988) a la que se le agregó 0,1 mL de los extractos enzimáticos. La reacción se incubó a 50 °C durante 30 min. Los azúcares reductores liberados se determinaron con el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS). Una unidad de actividad enzimática (UE) de Exo- $\beta$ -D-1,4-glucanasa se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu$ mol de azúcares reductores por minuto en las condiciones de pH y temperatura de reacción.

### **2.2.9.3. Amilasa total**

La actividad Amilasa total se determinó espectrofotométricamente utilizando como sustrato 0,4 mL de una solución de almidón soluble al 2% en buffer acetato de sodio 50 mM, pH 5 (Pandey et al., 2000) a la que se le agregó 0,1 mL de los extractos enzimáticos. La reacción se incubó a 50°C durante 30 min. Los azúcares reductores liberados se determinaron con el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS). Una unidad de actividad enzimática (UE) de amilasa total se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu$ mol de azúcares reductores por minuto en las condiciones de pH y temperatura de reacción.

### **2.2.9.4. Actividad $\beta$ -glucosidasa**

La actividad  $\beta$ -glucosidasa (EC 3.2.1.21) se determinó espectrofotométricamente utilizando como sustrato 0,45 mL de una solución de p-nitrofenil  $\beta$ -D-glucopiranosido (pNPG) en buffer acetato de sodio 50 mM, pH 4,8 (Wood & Bhat, 1988) a la que se le agregó 0,05 mL de los extractos enzimáticos. La reacción se incubó a 50°C durante 30 min y se detuvo con 1 mL de buffer Clark y Lubs (Clark & Lubs, 1916). El p-nitrofenol liberado producto de la reacción se determinó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia de la solución a 430 nm. Se definió una unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu$ mol de p-nitrofenol por minuto en las condiciones del ensayo.

### **2.2.9.5. Cuantificación de azúcares reductores**

La concentración de azúcares reductores en las reacciones enzimáticas se determinó mediante el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). Para esto se incubaron 0,5 mL de muestra con 0,5 mL del reactivo DNS y se llevó a ebullición por 5 min. Luego se disminuyó la temperatura de las reacciones rápidamente en un baño a 0°C y se determinó espectrofotométricamente la absorbancia a 540 nm. Los valores de concentración de azúcares reductores se estimaron por extrapolación en una curva de calibración realizada con glucosa. El reactivo DNS se preparó disolviendo 1 g de DNS en 20 mL de NaOH 2 M, el cual se mezcló con 50 mL de una



solución de tartrato de sodio/potasio 0,6 g/L y una vez homogeneizado se llevó a 100 mL con agua destilada.

## 2.3. Resultados

### 2.3.1. Evaluación de distintas condiciones de cultivo para el crecimiento y la expresión de enzimas ligninolíticas en *Geastrum*

Debido al escaso conocimiento existente acerca de la fisiología de representantes del género *Geastrum*, probablemente justificado por sus bajas tasas de crecimiento (Tabla 2.3.1), se evaluaron diferentes medios para promover el crecimiento y la expresión de enzimas lignocelulolíticas en *G. argentinum*, *G. triplex* y *G. schweinitzii*. Para ello, las tres cepas se crecieron en tres condiciones distintas: medios líquidos en presencia de cobre o de extractos de sustratos lignocelulósicos complejos y SSF utilizando sustratos lignocelulósicos.

	<i>G. argentinum</i>	<i>G. triplex</i>	<i>G. schweinitzii</i>
Tasa de crecimiento (mm/día)	1,90 ± 0,01	0,52 ± 0,01	0,81 ± 0,01

**Tabla 2.3.1:** Tasa de crecimiento de *G. argentinum*, *G. triplex* y *G. schweinitzii* en medio MG. Los ensayos se realizaron por triplicado indicando su media y desvío estándar.

#### 2.3.1.1 Cultivo y producción de ligninasas en medio líquido MG-Cu a distintos pH

Como diversas especies del género *Geastrum* son conocidas por crecer en suelos con pH neutro y alcalino, se realizó un primer ensayo en medio MG a distintos pHs (6, 7 y 8) y suplementado con Cu (MG-Cu) como inductor de ligninasas.

Sólo *G. schweinitzii* fue capaz de crecer en todos los pHs analizados, mientras que *G. triplex* creció a pHs 6 y 7 y *G. argentinum* sólo a pH 6 (Tabla 2.3.2). Respecto de las actividades enzimáticas valoradas, en *G. schweinitzii* se detectó actividad lacasa en todas las condiciones evaluadas, siendo mayores los títulos enzimáticos en los cultivos a pH 7 (1,2 U/mL) mientras que la actividad peroxidasa total se registró únicamente en los cultivos a pH 6. En el caso de *G. triplex* sólo se detectó actividad lacasa a pH 6 (2,3 U/mL) mientras que la actividad peroxidasa se detectó a pHs 6 y 7,

con un máximo a pH 7 (0,38 U/mL). *G. argentinum* creció sólo a pH 6 y produjo 2,7 U/mL de actividad lacasa. Por otro lado, en todos casos el pH de los medios se mantuvo estable durante todo el cultivo a pesar de no utilizarse soluciones buffer.

Parámetro	pH del medio	<i>G. argentinum</i>	<i>G. triplex</i>	<i>G. schweinitzii</i>
Crecimiento	6	+	+	+
	7	-	+	+
	8	-	-	+
Lacasa (U/mL) (pH 3,6)	6	2,70 ± 0,32	2,36 ± 0,01	0,29 ± 0,05
	7	-	N/D	1,20 ± 0,10
	8	-	-	0,15 ± 0,02
Peroxidasa (U/mL) (pH 5)	6	0,010 ± 0,001	0,06 ± 0,01	0,02 ± 0,01
	7	-	0,38 ± 0,03	N/D
	8	-	-	N/D

**Tabla 2.3.2:** Crecimiento de *G. argentinum*, *G. triplex* y *G. schweinitzii* en medio MG-Cu a pHs 6, 7 y 8 y actividades lacasa y peroxidasa total, en los sobrenadantes de cultivo, determinadas a pHs 3,6 y 5, respectivamente; N/D: actividad no detectada. Los ensayos se realizaron por triplicado graficando su media y desvío estándar.

### 2.3.1.2. Cultivo en sustratos lignocelulósicos

Dado que en su hábitat natural las especies de *Geastrum* evaluadas en esta tesis fueron capaces de colonizar sustratos lignocelulósicos parcialmente degradados (Zamora et al., 2013a; 2013b), se evaluó el crecimiento de *G. argentinum*, *G. triplex* y *G. schweinitzii* en SSF utilizando semillas de avena, paja de trigo y cascarilla de soja; y en cultivos líquidos con extractos provenientes de la maceración de los mismos sustratos. Las tres cepas fueron capaces de crecer en los extractos de los tres sustratos lignocelulósicos, sin embargo, el crecimiento fue mayor en el extracto de cascarilla de soja (Tabla 2.3.3). En el caso del extracto de semillas de avena *G. triplex* mostró un crecimiento moderado, mientras que tanto *G. argentinum* como *G. schweinitzii* mostraron un crecimiento mucho menor. Para los cultivos en SSF, la cascarilla de soja también soportó el crecimiento de las tres cepas de *Geastrum*, mientras que en paja de trigo sólo pudo crecer *G. schweinitzii* y en semillas de avena, *G. argentinum* y *G. triplex* (Tabla 2.3.3, Figura 2.3.1).

Estos resultados indicarían que cada una de estas tres especies posee una fisiología diferente, que le permite crecer utilizando distintos sustratos lignocelulósicos lo que podría reflejarse en una expresión de distintos grupos de enzimas lignocelulolíticas.

### Avena



### Cascarilla de Soja



*G. argentinum*

*G. triplex*

*G. schweinitzii*

**Figura 2.3.1:** Ejemplos de cultivos en semilla de avena (fila superior) y cascarilla de soja (fila inferior) de *G. argentinum*, *G. triplex* y *G. schweinitzii* luego de 20 días de incubación.

		<i>G. argentinum</i>	<i>G. triplex</i>	<i>G. schweinitzii</i>
<b>Avena</b>	SSF	+	++	-
	Extracto	+	++	+
<b>Paja de trigo</b>	SSF	-	-	+
	Extracto	++	++	++
<b>Cascarilla de soja</b>	SSF	+++++	++++	+++
	Extracto	++++	++++	+++

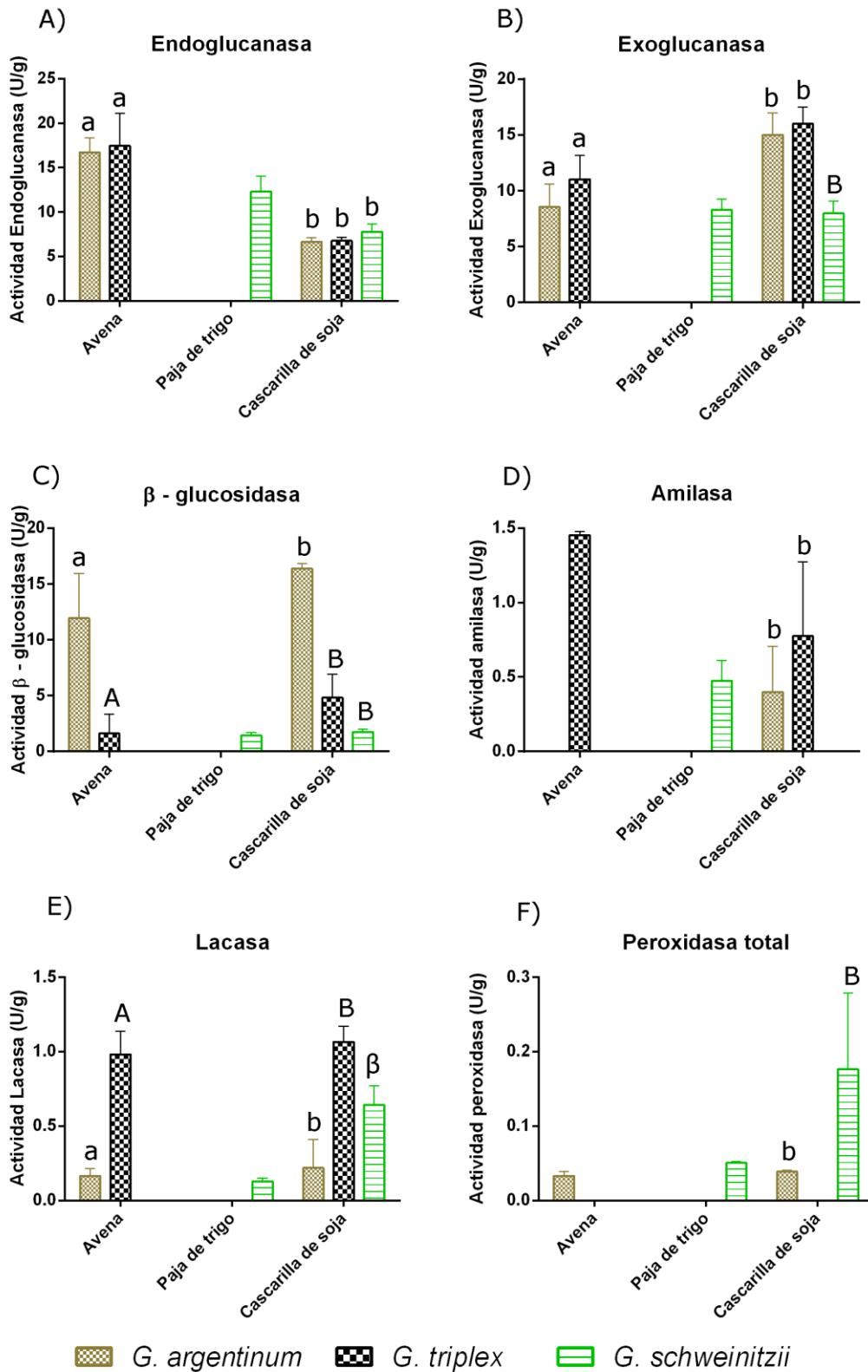
**Tabla 2.3.3:** Determinación semicuantitativa del crecimiento de *G. argentinum*, *G. triplex* y *G. schweinitzii* luego de 45 días de incubación en SSF utilizando semillas de avena, paja de trigo o cascarilla de soja como sustrato o en medio líquido conteniendo el extracto proveniente de su maceración.

### 2.3.1.3. Producción de lignocelulasas en sustratos lignocelulosicos

Los sobrenadantes de *G. argentinum*, *G. triplex* y *G. schweinitzii* cultivados en semillas de avena, paja de trigo y cascarilla de soja se cosecharon al día 35 de crecimiento y se determinaron las actividades lacasa, peroxidasa total, endoglucanasa, exoglucanasa,  $\beta$ -glucosidasa y amilasa.

Los cultivos de *G. argentinum* y *G. triplex* crecidos en semilla de avena mostraron producción de glucanasas y  $\beta$ -glucosidasas, indicando que podrían estar utilizando la celulosa como fuente de carbono, aunque en el caso de *G. triplex*, la detección de actividad amilasa, indicaría que este organismo también está utilizando el almidón presente en el endosperma de las semillas. El análisis de las actividades enzimáticas en los extractos de los cultivos en paja de trigo, en los cuales sólo fue capaz de crecer *G. schweinitzii*, mostraron que este hongo puede sintetizar glucanasas,  $\beta$ -glucosidasas y amilasas específicas para la utilización de este sustrato. En el caso de la cascarilla de soja, este sustrato pudo sostener el crecimiento de las tres cepas, *G. argentinum* y *G. triplex* produjeron glucanasas,  $\beta$ -glucosidasas y amilasas, mientras que *G. schweinitzii* sólo produjo títulos detectables de actividad glucanasa y  $\beta$ -glucosidasa (Figura 2.3.2).

Respecto de las actividades ligninolíticas, las tres especies expresaron lacasas en los sustratos en los que crecieron, aunque *G. triplex* produjo los mayores títulos (Figura 2.3.2 E). Por otro lado, sólo se detectó actividad peroxidasa en bajos títulos en los cultivos de *G. argentinum* y *G. schweinitzii*, mientras que esta actividad no se detectó en los cultivos de *G. triplex* (Figura 2.3.2 F), a pesar de que este hongo había sido capaz de expresar peroxidases en medio líquido MG-Cu (Tabla 2.3.2).



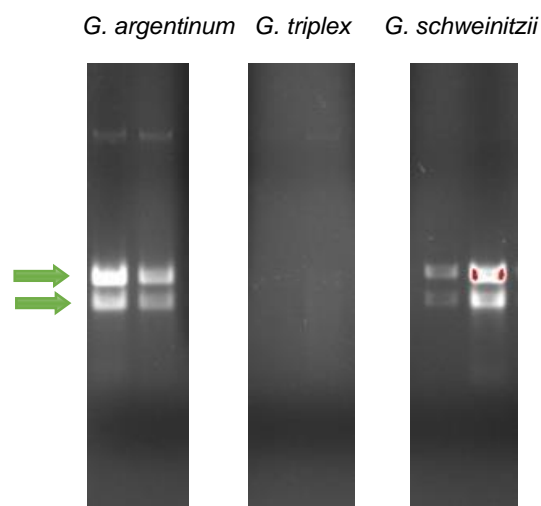
**Figura 2.3.2:** Actividad endoglucanasa (A), exoglucanasa (B), β-glucosidasa (C), amilasa (D), lacasa (E) y peroxidasa (F) determinadas en extractos de cultivo en SSF de *G. argentinum*, *G. triplex* y *G. schweinitzii* en semilla de avena, paja de trigo y cascarilla de soja. Todos los ensayos se realizaron por triplicado, la barra de error corresponde al desvío estándar de las determinaciones. Se aplicó el test de anova de 2 factores y se analizó la diferencia entre tratamientos, representándose las diferencias dentro de cada tratamiento “sustrato” como a y A en avena y b, B y β para cascarilla de soja.

### **2.3.2. Secuenciación y anotación de los transcriptomas de *G. argentinum* y *G. schweinitzii* crecidos en cascarilla de soja**

De acuerdo con los resultados obtenidos y a los antecedentes bibliográficos para cada hongo, se decidió avanzar con la secuenciación de los transcriptomas de los tres organismos crecidos en SSF en cascarilla de soja. *G. argentinum* es una especie aislada y caracterizada inicialmente en nuestro país (Zamora et al., 2014) y de las tres fue la que mostró la mayor velocidad de crecimiento y colonización del sustrato. En el caso de *G. schweinitzii* fue la especie en la que se cuantificó la mayor actividad peroxidasa en los tres sustratos lignocelulósicos evaluados y la única que pudo crecer a pHs 6, 7 y 8 en el medio MG-Cu. Respecto de *G. triplex*, se decidió estudiarla porque mostró actividad lacasa, amilasa y celulasa, aunque esta especie ya estaba listada como candidata para su secuenciación en el proyecto 1000 Fungal Genomes del Departamento de Energía de EEUU (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/programs/fungi/1000fungalgenomes.jsf>).

#### **2.3.2.1. Extracción de ARN y preparación de las bibliotecas de ADNc**

Las extracciones de ARN total se realizaron a partir del micelio cosechado luego de 35 días de crecimiento en SSF utilizando cascarilla de soja como sustrato. Para mejorar el rendimiento y calidad del ARN obtenido se ensayaron distintos protocolos de extracción, utilizando finalmente una combinación de extracción fenólica con precipitación con LiCl (Materiales y Métodos). Si bien este protocolo permitió obtener ARN total a partir del micelio de *G. argentinum* y *G. schweinitzii*, el rendimiento fue muy bajo para *G. triplex* (Figura 2.3.3), por lo que se decidió proseguir sólo con la secuenciación de los dos primeros.



**Figura 2.3.3:** Determinación cualitativa de dos extracciones de ARN total de *G. argentinum*, *G. triplex* y *G. schweinitzii*. Las flechas señalan las bandas correspondientes a los ARN ribosomales 28S y 18S.

### 2.3.2.2. Secuenciación y ensamblado *de novo*

Para obtener las secuencias de los transcriptomas de *G. argentinum* y *G. schweinitzii* se utilizó la tecnología Illumina y el kit de secuenciación Miseq V2 que permite obtener lecturas apareadas de hasta 300 pb. En total se obtuvieron 279 Mpb para *G. argentinum* y 593 Mpb para *G. schweinitzii* las cuales fueron filtradas por calidad (trimming) y se eliminaron las secuencias adaptadoras. Estas lecturas se ensamblaron *de novo* utilizando el programa de libre acceso Trinity (Haas et al., 2013), resultando en 20.145 y 23.275 contigs de más de 201 bp para *G. argentinum* y *G. schweinitzii*, respectivamente (Tabla 2.3.4).

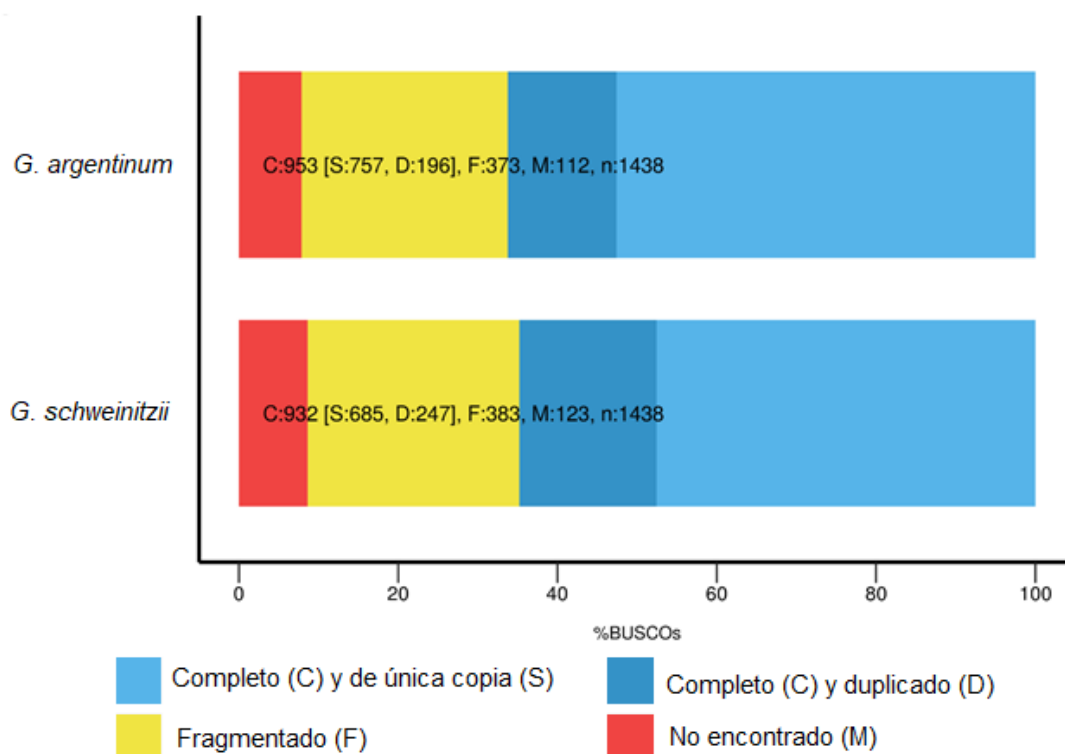
	<i>G. argentinum</i>	<i>G. schweinitzii</i>
Lecturas totales (Mpb)	279	593
Número de contigs	22.014	23.275
Contigs más largos (pb)	15.714	10.045
Numero de contigs > 1K nt	8.040	10.342
Media de los contigs (pb)	1.058	1.109
Mediana de contigs (pb)	689	900



N50 contig (pb)	1.630	1.744
-----------------	-------	-------

**Tabla 2.3.4:** Resumen de las secuenciaciones y ensamblados de los transcriptomas de *G. argentinum* y *G. schweinitzii* crecidos en cascarilla de soja. Lecturas totales: Número de lecturas obtenidas luego de la secuenciación. Contigs más largos: tamaño del transcripto ensamblado más largo. Media y mediana de los contig: respecto del largo en pb de estos. N50 contig: la longitud de los contigs tal que usando contigs de igual o mayor tamaño produce la mitad de las bases del genoma.

Con el fin de evaluar el contenido génico de los transcriptomas se realizó una búsqueda de genes ortólogos en la sección Basidiomycota de la base de datos OrthoDb v9 mediante el programa BUSCO v2.0. Mediante esta estrategia se infiere que tan completo está un set de genes (los transcriptomas) en base a un conjunto de genes altamente conservados y ortólogos al grupo perteneciente de las especies estudiado (sección Basidiomycota de OrthoDb). Los genes son considerados “completos” cuando su largo se encuentra entre dos desviaciones estándar respecto a la media de los genes de la base de datos. En esta búsqueda se obtuvo un 59,1% de transcriptos completos (48,9 de copia única y 10,2% duplicados), 30,7% fragmentados y 10,2% faltantes para *G. argentinum* y 64,8% de transcriptos completos (47,6% copia única, 17,2% duplicados), 26,6% fragmentados y 8,6% faltantes para *G. schweinitzii* (Figura 2.3.4). Dada la similitud de porcentajes obtenidos entre las dos especies, se infiere un bajo sesgo en el contenido génico, lo que permite realizar comparaciones entre los transcriptomas.



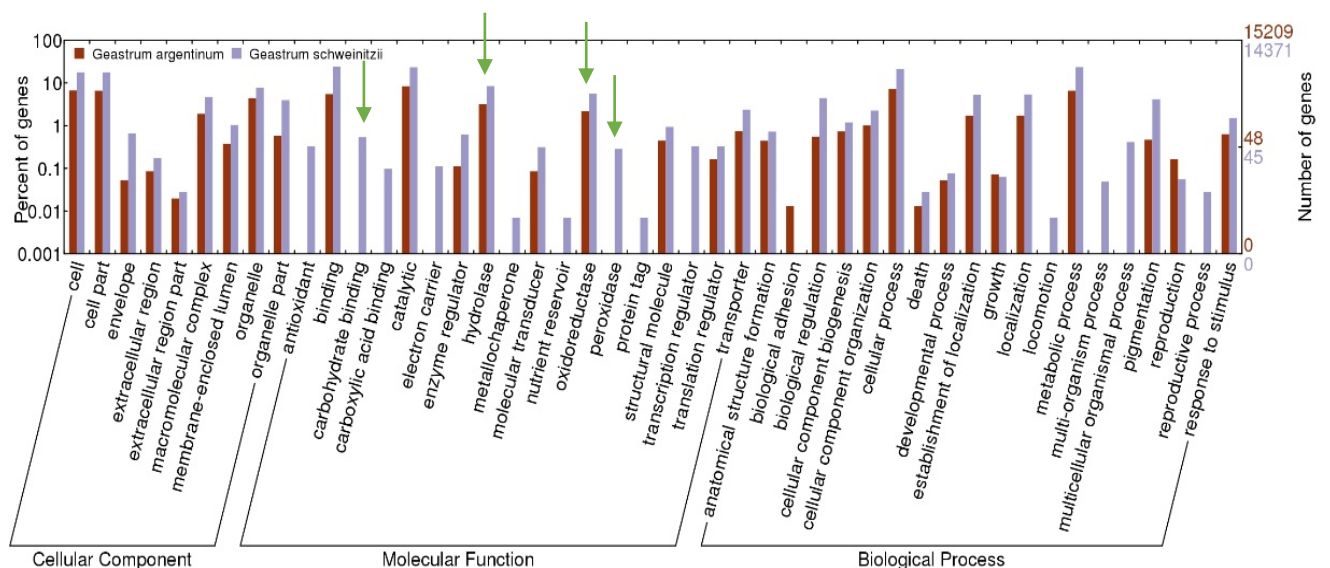
**Figura 2.3.4:** Completitud de los transcriptomas de *G. argentinum* y *G. schweinitzii* cultivados en cascarilla de soja. Cada color y los números en el grafico indican los transcriptos completos (C) de copia única (S) o duplicados (D), los transcriptos fragmentados (F) y los que no se encontraron respecto de un grupo de genes conservados en Basidiomycetes (n).

### 2.3.2.3. Análisis y anotación funcional de los transcriptomas de *G. argentinum* y *G. schweinitzii*

Para la anotación funcional de los transcriptos ensamblados se combinaron distintos programas de anotación y búsqueda automática, para luego realizar un curado manual de los transcriptos de interés. En una primera etapa, se realizó la anotación en forma automática utilizando el software Trinotate, mediante el cual los transcriptos y los correspondientes ORF predichos se contrastaron utilizando los algoritmos Blastx contra la base de datos de secuencias proteicas Swissprot y Blastp, contra las bases de datos de secuencias proteicas non-redundant (nr) y la sección Fungi de RefSeq del NCBI, obteniéndose similitud con proteínas anotadas para 14.412 y 12.144 contigs de *G. argentinum* y *G. schweinitzii*, respectivamente. Los resultados de las búsquedas mostraron una alta similitud con secuencias del hongo del orden Geastrales *Sphaerobolus stellatus* con 73,38% y 74,03% (15.173 y 10.670 hits) de los ORFs, y el resto de los transcriptos distribuidos entre diversas especies, siendo la segunda más

representada *Leucoagaricus* sp. SymC.cos (311 y 258 hits) 2,05% y 1,79% seguida de *Piloderma croceum* F 1598 con 1,71% y 1,16% (260 y 216 hits).

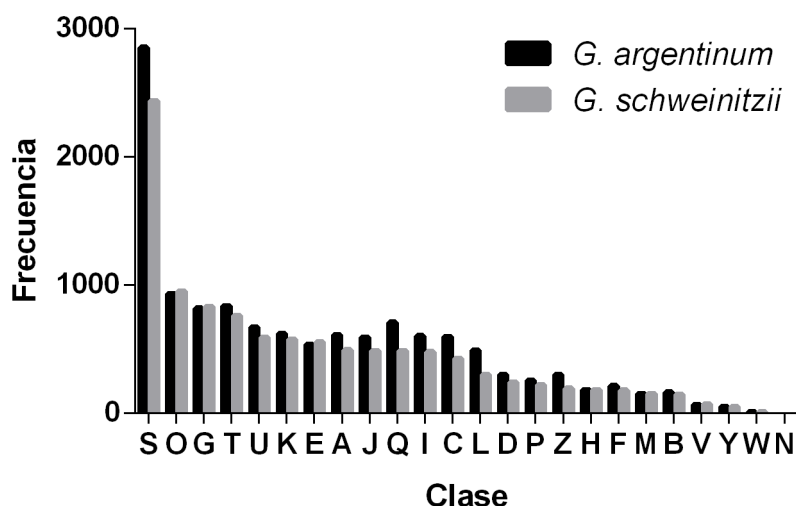
Para obtener las anotaciones de “Gene ontology” (GO) que describe los productos génicos asociados a términos de procesos biológicos, componentes celulares y función molecular se utilizó la herramienta Blast2GO, basada en los resultados de Blastp sobre con la base de datos non redundant (NCBI), asignando 8.449 y 24.572 términos GO a 15.209 y 14.371 transcritos de *G. argentinum* y *G. schweinitzii*, respectivamente. La distribución de los términos GO en ambas cepas fue similar: 38% y 31% en componentes celulares, 35% y 37% en procesos biológicos y 27% y 31% en funciones moleculares. Los términos fueron también clasificados en subgrupos, siendo mayormente representado en procesos biológicos: procesos celulares (36,5% y 32,7%), procesos metabólicos (33,5% y 36,1%); en compartimentos celulares: partición celular (31,8% y 32,9%) y organelas (21,2% y 14,3%); y en funciones moleculares la porción mayoritaria fue asignada a actividad catalítica (54% y 44%), binding (34,5 % y 45,7%). Por otro lado, también se encontraron términos GO relevantes en las categorías relacionadas a la degradación de lignocelulosa como “actividad oxidorreductasa”, “actividad hidrolasa”, “carbohydrate biding” y “peroxidase” (Figura 2.3.5) lo que evidencia la potencial capacidad de degradación de estos organismos.



**Figura 2.3.5:** Comparación de las anotaciones de Gene Ontology (GO) de los transcriptomas de *G. argentinum* y *G. schweinitzii* asignados a 15.209 y 14.371 transcritos. Las anotaciones se clasificaron en componentes celulares (cellular component), funciones moleculares (molecular function), procesos biológicos (biological process). El porcentaje de los genes

representa al número de genes en cada categoría en referencia al total de genes. Se marcaron con flecha los términos relacionados con la degradación de lignocelulosa.

El software Trinotate también se utilizó para anotar los transcriptos contra la base de datos eggNOG (evolutionary genealogy of genes: Non-supervised Orthologous Groups). Esta base de datos está compuesta por genes agrupados por ortología y sus anotaciones funcionales. Las anotaciones fueron clasificadas en 24 categorías funcionales y también asignadas sus funciones putativas. A pesar de la diferencia entre la cantidad de transcriptos anotados para *G. argentinum* y *G. schweinitzii* (12.557 y 10.804 transcriptos), los perfiles de clasificación de genes para las 2 cepas mostraron la misma tendencia (Figura 2.3.6). La categoría más representada fue "función desconocida" (S) (22,72% y 22,55%) seguida de "modificaciones postraduccionales, recambio proteico, chaperonas" (O) (7,04% and 8,78%) y "transporte de carbohidratos y metabolismo" (G) (6,51% y 7,68%). El alto porcentaje de proteínas con función desconocida es esperable en hongos, siendo aproximadamente un 40% en especies conocidas (Ellison et al, 2014), como también debido a la escasa información genética disponible para el orden Geastrales.



S: Sin predicción de función (desconocida).

O: Chaperonas moleculares y funciones relacionadas

G: Metabolismo y transporte de carbohidratos

T: Señal de traducción

U: Tráfico intracelular, secreción y transporte de vesículas

K: Transcripción

E: Metabolismo y transporte de aminoácidos

A: Procesamiento de ARN y modificación

J: Traducción, incluyendo estructuras ribosomales y biogénesis

Q: Metabolismo secundario, biosíntesis, transporte y catabolismo

I: Metabolismo de lípidos

C: Producción y conversión de energía

L: Replicación, recombinación y reparación.

D: División celular y particionamiento de cromosomas.

P: Transporte de iones inorgánicos y metabolismo.

Z: Citoesqueleto

H: Metabolismo y coenzimas.

F: Metabolismo y transporte de nucleótidos

M: Estructura de la pared celular y biogénesis de membrana externa

B: Estructura y dinámica cromática

V: Mecanismos de defensa

Y: Estructura nuclear

W: Estructuras extracelulares

N: Movilidad celular

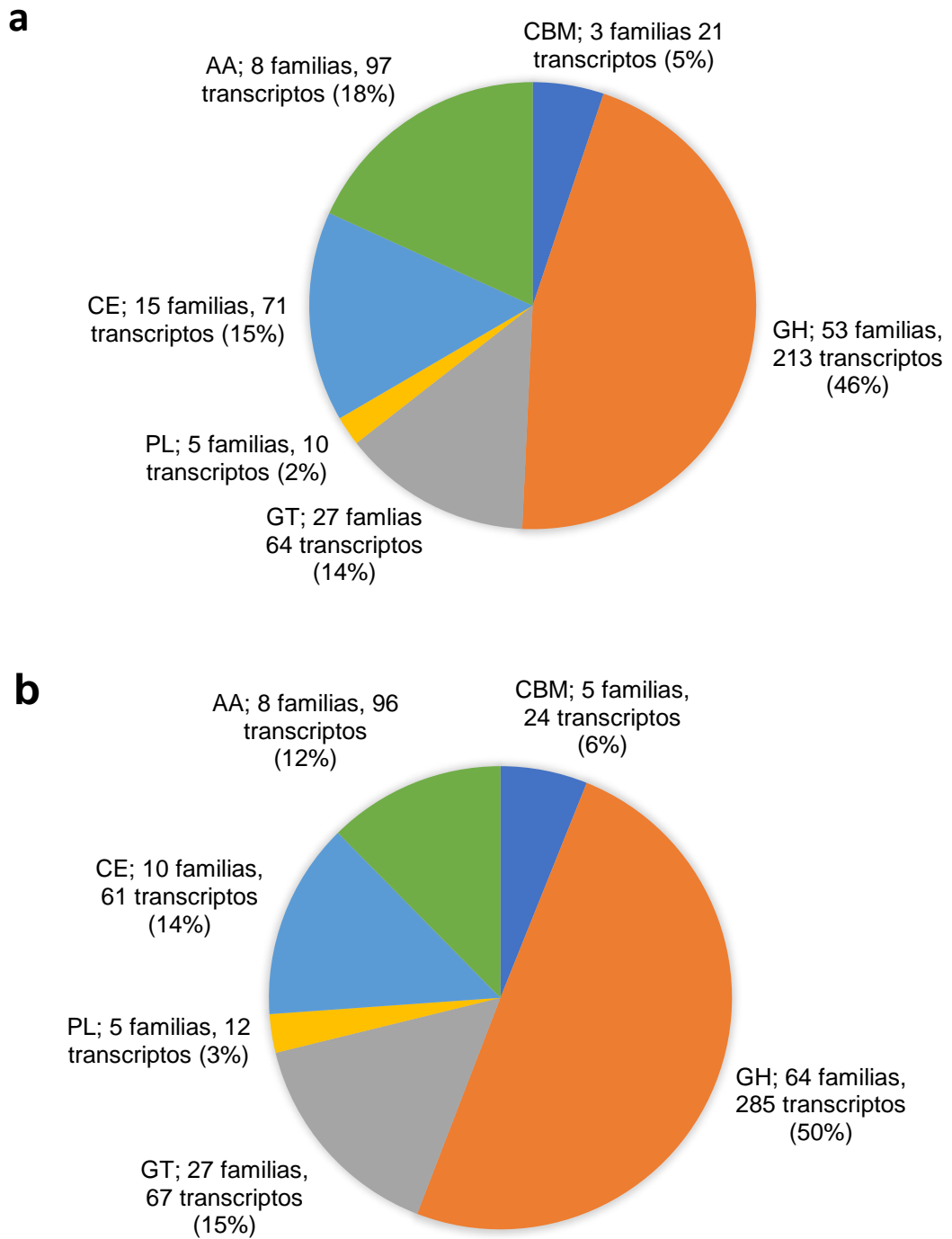
**Figura 2.3.6:** Frecuencia de grupos de proteínas ortólogas identificadas a partir de la base de datos de NCBI.

La identificación de dominios proteicos conservados en las secuencias traducidas de los ORFs se realizó contrastándolos con las bases de datos HMMER y Pfam. En esta búsqueda se identificaron 11.108 y 13.236 dominios proteicos, siendo los más abundantes para ambas cepas: Dominios Protein-kinasa, Citocromo P450, Superfamilia Facilitador Mayor, Dominios WD de 40 repeticiones, Dehidrogenasa de cadena corta, motivos de reconocimiento de ARN. A su vez, entre los 50 dominios más representados se encontraron algunos asociados a la degradación de lignocelulosa como “Celulasa, Familia Glicosil Hidrolasa 5”, “GMC oxidoreductasa” y “Familia Carboxilesterasa”. También se encontraron funciones asociadas a elementos génicos móviles en el transcriptoma de *G. schweinitzii* como “Polipéptidos gag de LTR copia-type” y “Transcriptasa reversa (DNA polimerasa RNA-dependiente)” y, en el

transcriptoma de *G. argentinum* el dominio “Ciclopropano sintetasa de ácido micólico” se vio altamente representado.

### **2.3.3. Análisis de los transcritos codificantes de Enzimas Activas sobre Carbohidratos (CAZymes) en los transcriptomas de *G. argentinum* y *G. schweinitzii***

Las secuencias proteicas codificadas por los transcritos obtenidos fueron contrastadas con la base de datos especializada dbCAN (<http://bcb.unl.edu/dbCAN2/>) de Enzimas Activas sobre Carbohidratos (CAZymes) utilizando el algoritmo BLASTp. Las secuencias para las que se obtuvieron identidades fueron comparadas con las anotaciones de Trinotate y curadas manualmente. Para esto se utilizaron como criterios la anotación de los resultados de las búsquedas por homología en las bases de datos (Swissprot, nr y Refseq), los dominios conservados en cada grupo y la presencia de péptidos señal de secreción. Como resultado se identificaron un total de 467 y 444 secuencias codificantes de CAZymes representadas por 118 y 124 familias para *G. argentinum* y *G. schweinitzii*, respectivamente. Para ambas especies la distribución de los transcritos fue similar: 27 familias de glicosiltransferasas (GT) (64 y 67 ORFs), 5 familias de pectinliasas (PL) (10 y 12 ORFs), 8 familias de actividades auxiliares (AA) (97 y 96 ORFs), 15 y 10 familias de esterasas de carbohidratos (CE) (71 y 61 ORFs), 53 y 64 familias de glicosil hidrolasas (GH) (213 y 285 ORFs) y 3 y 5 familias de módulos de unión a carbohidratos (21 y 24 ORFs) para *G. argentinum* y *G. schweinitzii* respectivamente (Figura 2.3.7).



**Figura 2.3.7:** Distribución de familias de enzimas activas sobre carbohidratos (CAZymes) codificadas por los transcritos expresados por *G. argentinum* (a) y *G. schweinitzii* (b) cultivados en cascarilla de soja. En las figuras se graficaron los porcentajes de transcritos correspondientes a Glicosil Hidrolasas (GH), Glicosiltransferasas (GT), Pectín Liasas (PL), Esterasas de Carbohidratos (CE), Módulos de unión a carbohidratos (CBM) y Actividades Auxiliares (AA).

### 2.3.3.1. Enzimas degradadoras de celulosa

En ambas especies se identificaron transcriptos que codifican todas las actividades necesarias para la degradación de celulosa.

En el transcriptoma de *G. argentinum* se identificaron dos secuencias codificantes de endoglucanasas de la familia GH5, tres secuencias parciales de exoglucanasas de la familia GH7 (celobiohidrolasa II, EC. 3.2.1.91), una de ellas conteniendo un dominio de unión a carbohidratos CBM1 (*Carbohydrate Binding Motif* 1), pero ninguna exoglucanasa de la familia GH6 (celobiohidrolasa I, EC. 3.2.1.176), y 11  $\beta$ -glucosidasas de las familias GH1 y GH3 (Tabla 2.3.5).

*G. schwenitzii* expresa cuatro endoglucanasas de la familia GH5 (EC. 3.2.1.4), una de ellas conteniendo un dominio CBM1, dos exoglucanasas de la familia GH7 y una de la familia GH6, así como 5  $\beta$ -glucosidasas de las familias GH1 y GH3 (Tabla 2.3.5).

Otra familia enzimática involucrada en la degradación de celulosa son las monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMO), las cuales se encuentran clasificadas en CAZy como AA9. Estas enzimas clivan mediante reacciones oxidativas la estructura de la celulosa cristalina, permitiendo el acceso de las celulasas hidrolíticas a las regiones recalcitrantes de la celulosa mejorando la eficiencia de degradación del sustrato (Bissaro et al., 2018). La cantidad de isoenzimas de AA9 encontradas en el transcriptoma fue de 10 y 6 transcriptos para *G. argentinum* y *G. schweinitzii*.

Las enzimas con actividad celobiosa dehidrogenasa clase 1 (CDH, EC 1.1.99.18) secretadas por los hongos Basidiomycetes se clasifican como AA3\_1 por CAZy y se caracterizan por oxidar principalmente los enlaces  $\beta$ -1,4 de oligosacáridos que tienen como extremo reductor glucosa o manosa (Hildén et al., 2000). Los representantes de la familia AA3\_1 se encuentran relacionados con la degradación de la celulosa cristalina y presentan dos dominios que durante este proceso hacen posible la transferencia de electrones a un pequeño dominio citocromo (CYT) y al dominio flavodehidrogenasa de LPMOs, los cuales actúan también en la oxidación de azúcares. Estas enzimas se encuentran representadas por una isoenzima en ambos transcriptomas.



ID	Actividad	Familia CAZY	Blast	% de identidad	S. secreción	T. completo		
GARG3683	β-1,4-endoglucanasa	GH5	Endoglucanase 1 ( <i>Robillarda sp.</i> ) (P23044.2)	52	No	No		
GARG19335			Endoglucanase 1 ( <i>Robillarda sp.</i> ) (P23044.2)	57	Si	Si		
GARG4586	Celobiohidrolasa	GH7	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohidrolase ( <i>Aspergillus terreus</i> ) (Q0CMT2.1)	81	No	No		
GARG19921			Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohidrolase B ( <i>Aspergillus niger</i> ) (A2QAI7.1)	77	No	No		
GARG4271		GH7-CBM1	Probable 1,4-beta-D-glucan cellobiohidrolase ( <i>A. terreus</i> ) (Q0CMT2.1)	70	No	No		
GARG15694	β-1,4-glucosidasa	GH1	Beta-glucosidase 1B ( <i>P. chrysosporium</i> ) (Q25BW4.1)	75	Si	Si		
GARG15695			Beta-glucosidase 1B ( <i>P. chrysosporium</i> ) (Q25BW4.1)	75	Si	Si		
GARG15044		GH3	Probable beta-glucosidase I ( <i>Aspergillus oryzae</i> )(Q2U8Y5.1)	44	Si	Si		
GARG12841			Probable beta-glucosidase K ( <i>A. oryzae</i> )(Q5BA18.1)	28	No	Si		
GARG18018			Beta-glucosidase B ( <i>Aspergillus nidulans</i> )(Q5BFG8.1)	38	No	No		
GARG12714			Probable beta-glucosidase K ( <i>A. oryzae</i> )(Q5BA18.1)	39	No	Si		
GARG15839			Probable beta-glucosidase A ( <i>A. nidulans</i> )(Q5B5S8.2)	51	Si	Si		
GARG15840			Probable beta-glucosidase A ( <i>A. nidulans</i> )(Q5B5S8.2)	50	Si	Si		
GARG19996			Probable beta-glucosidase J ( <i>Aspergillus fischeri</i> )(A1DNN8.1)	54	Si	No		
GARG16484			Probable beta-glucosidase L ( <i>A. nidulans</i> )(Q5B9F2.1)	46	Si	Si		
GARG2759			Probable beta-glucosidase L ( <i>A. nidulans</i> )(Q0CEF3.1)	44	Si	Si		
GARG884			Celobiosa dehidrogenasa	AA3-1	Cellobiose dehydrogenase ( <i>P. chrysosporium</i> ) (Q01738.1)	55	Si	No
GARG16435			LPMO	AA9 (GH61)	Probable endo-beta-1,4-glucanase D ( <i>A. niger</i> )(A2R5N0.1)	45	Si	SI
GARG7782					Polysaccharide monooxygenase Cel61a ( <i>Talaromyces thermophilus</i> )(G2Q9T3.1)	41	No	No
GARG2231	Probable endo-beta-1,4-glucanase D ( <i>A. fischeri</i> )(A1DBS6.1)	43			No	No		
GARG1527	Endoglucanase-7 ( <i>Trichoderma reesei</i> ) (Q7Z9M7.3)	40			No	No		
GARG18748	Cellulose-growth-specific protein ( <i>Agaricus bisporus</i> ) (Q00023.1)	50			Si	Si		
GARG1904	Cellulose-growth-specific protein ( <i>A. bisporus</i> ) (Q00023.1)	32			No	No		
GARG10711	Cellulose-growth-specific protein ( <i>A. bisporus</i> ) (Q00023.1)	30			Si	Si		
GARG5060	AA9-CBM1	Cellulose-growth-specific protein ( <i>A. bisporus</i> ) (Q00023.1)			43	Si	Si	

**Tabla 2.3.5:** Enzimas degradadoras de celulosa en *G. argentinum*. ID: Identidad asignada a los transcritos. Actividad: función putativa asignada a la secuencia proteica codificada por cada transcritos, Familia CAZY: familia asignada según la base de datos CAZY. Blast: mejor resultado de la búsqueda en sección Protein de la base de datos nr usando el programa blastp con su porcentaje de identidad, Señal de secreción y si el transcritos corresponde a un ORF completo (T. Completo)

ID	Actividad	Familia CAZY	Blast	% de identidad	S. secreción	T. completo
GSCH23909	β-1,4-endoglucanasa	GH5	Endoglucanase ( <i>A. bisporus</i> )(P07982.1)	59	No	No
GSCH03124			Mn dependoglucanase Eg5A ( <i>A. bisporus</i> )(Q66NB7.2)	74	No	No
GSCH09854			Mn dependoglucanase Eg5A ( <i>A. bisporus</i> )(Q66NB7.2)	73	No	No
GSCH12451		GH5-CBM1	Endoglucanase 3(Q12624.1)	49	Si	Si
GSCH02383	Celobiohidrolasa	GH7	1,4-beta-cellobiohidrolase ( <i>A. bisporus</i> )(Q92400.1)	50	Si	Si
GSCH06576			1,4-beta-cellobiohidrolase ( <i>A. bisporus</i> )(Q92400.1)	65	No	No
GSCH00809		GH6	Exoglucanase 3 ( <i>A. bisporus</i> ) (P49075.1)	66	Si	Si
GSCH10222	β-1,4-glucosidasa	GH1	Beta-glucosidase ( <i>P. chrysosporium</i> ) (Q25BW4.1)	73	No	Si
GSCH10223			Beta-glucosidase ( <i>P. chrysosporium</i> ) (Q25BW4.1)	73	No	Si
GSCH21458			Beta-glucosidase ( <i>P. chrysosporium</i> ) (Q25BW4.1)	66	No	Si
GSCH21459			Beta-glucosidase ( <i>P. chrysosporium</i> ) (Q25BW4.1)	76	No	Si
GSCH18092			Beta-glucosidase ( <i>P. chrysosporium</i> ) (Q25BW4.1)	33	Si	Si
GSCH07444		GH3	Probable beta-glucosidase K ( <i>A. nidulans</i> ) (Q5BA18.1)	27	Si	Si
GSCH26021			Probable beta-glucosidase L ( <i>A. terrus</i> ) (Q0CEF3.1)	45	Si	Si
GSCH16228			Probable beta-glucosidase K ( <i>A. nidulans</i> )(Q5BA18.1)	42	Si	Si
GSCH16105			Probable beta-glucosidase A ( <i>A. fischeri</i> ) (A1D451.1)	50	Si	Si
GSCH18136			Probable beta-glucosidase I ( <i>Aspergillus clavatus</i> ) (A1CA51.1)	44	No	Si
GSCH05922	Celobiosa dehidrogenasa	AA3-1	Cellobiosedehydrogenase ( <i>P. chrysosporium</i> ) (Q01738.1)	68	Si	Si
GSCH02066	LPMO	AA9 (GH61)	Cellulose-growth-specific protein ( <i>A. bisporus</i> ) (Q00023.1)	30	Si	Si
GSCH07564			Cellulose-growth-specific protein ( <i>A. bisporus</i> ) (Q00023.1)	33	Si	Si
GSCH08286			Probable endo-beta-1,4-glucanase D ( <i>A. nidulans</i> )	36	No	No
GSCH20277			Probable endo-beta-1,4-glucanase D ( <i>A. nidulans</i> )	34	Si	Si
GSCH07449			Cellulose-growth-specific protein ( <i>A. bisporus</i> ) (Q00023.1)	34	No	No
GSCH24368			Cellulose-growth-specific protein( <i>A. bisporus</i> ) (Q00023.1)	73	No	No

**Tabla 2.3.6:** Enzimas degradadoras de celulosa en *G. schweinitzii*. ID: Identidad asignada a los transcritos. Actividad: función putativa asignada a la secuencia proteica codificada por cada transcritos, Familia CAZY: familia asignada según la base de datos CAZY. Blast: mejor resultado de la búsqueda en sección Protein de la base de datos nr usando el programa blastp con su porcentaje de identidad, Señal de secreción y si el transcritos corresponde a un mensajero completo (T. completo)

### **2.3.3.2. Enzimas involucradas en la degradación de hemicelulosa**

Todas las actividades enzimáticas que pueden actuar en la degradación de hemicelulosa se vieron representadas en ambos transcriptomas (Rytioja et al., 2014) (Tabla 2.3.7 y 2.3.8). En ambas especies se expresaron transcritos codificantes de glicosil hidrolasas que degradan las principales cadenas de los arabinoxilanos presentes en plantas:  $\beta$ -1,4-endoxilanasas (EC 3.2.1.8) de las familias GH10 y GH11, algunas de ellas conteniendo dominios de unión a carbohidratos como CBM1, característico de hongos y de unión a xilano y arabinofuranosidasas, destacándose la presencia de una enzima de la familia GH54 conteniendo un dominio CBM42 que reconoce L-arabinofuranósidos. Además, se detectaron transcritos que codifican enzimas que hidrolizan los sustituyentes de las cadenas laterales más abundantes en las paredes celulares de la soja como  $\alpha$ -galactosidasas y  $\alpha$ -fucosidasas, así como  $\beta$ -xilosidasas de las familias GH3 y GH43 que intervienen en la obtención de los monómeros de xilosa a partir de la xilobiosa generada por las endoxilanasas.

ID	Actividad	Familia CAZY	Blast	% de identidad	S. de secreción	T. completo
GARG6230	Xiloglucan $\beta$ -1,4-endoglucanasa	GH12	g. h. family 12 protein ( <i>Dichomitus squalens</i> ) (XP_007363419.1)	75	Si	Si
GARG3521			g. h. family 12 protein ( <i>Heterobasidion irregulare</i> ) (XP_009542041.1)	72	Si	Si
GARG7407	$\alpha$ -arabinofuranosidasa	GH51	hypothetical protein ( <i>A. bisporus</i> ) (XP_007333737.1)	61	No	No
GARG7407			hypothetical protein ( <i>A. bisporus</i> ) (XP_007333737.1)	45	No	No
GARG12171			hypothetical protein ( <i>A. bisporus</i> ) (XP_007333737.1)	44	Si	Si
GARG3322			hypothetical protein ( <i>A. bisporus</i> ) (XP_007333737.1)	50	Si	Si
GARG15009			hypothetical protein ( <i>A. bisporus</i> ) (XP_007333737.1)	45	Si	Si
GARG17359		GH54 - CBM42	fungal alpha-L-arabinofuranosidase ( <i>Punctularia strigosozonata</i> ) (XP_007386112.1)	83	Si	Si
GARG19590	$\alpha$ -xilosidasa	GH31	g. h. family 31 protein ( <i>Fomitiporia mediterranea</i> ) (XP_007261213.1)	68	Si	Si
GARG8026			sugar hydrolase ( <i>P. strigosozonata</i> ) (XP_007380054.1)	68	Si	Si
GARG17019	$\alpha$ -fucosidasa	GH29	alpha-L-fucosidase ( <i>Kockovaella imperatae</i> ) (XP_021870850.1)	54	Si	Si
GARG15588			alpha-L-fucosidase ( <i>K. imperatae</i> ) (XP_021870850.1)	58	Si	Si
GARG2689			alpha-L-fucosidase ( <i>K. imperatae</i> ) (XP_021870850.1)	51	Si	Si
GARG14532		GH95	g. h. family 95 protein ( <i>H. irregulare</i> ) (XP_009552850.1)	55	Si	Si
GARG10090	$\alpha$ -1,4-galactosidasa	GH27	alpha-galactosidase ( <i>P. strigosozonata</i> ) (XP_007388130.1)	69	Si	Si
GARG7853			g. h. family 27 protein ( <i>H. irregulare</i> ) (XP_009549751.1)	79	Si	Si
GARG18412		GH27 - CBM35	g. h. family 27 protein ( <i>H. irregulare</i> ) (XP_009549751.1)	80	Si	Si
GARG4571	$\beta$ -1,4-galactosidasa	GH35	g. h. family 35 protein ( <i>Schizophyllum commune</i> ) (XP_003030581.1)	76	No	No
GARG10156			g. h. family 35 protein ( <i>H. irregulare</i> ) (XP_009548227.1)	66	Si	Si
GARG3892			g. h. family 35 protein ( <i>Serpula lacrymans</i> ) (XP_007321104.1)	54	No	No
GARG6791			hypothetical protein ( <i>Postia placenta</i> ) (XP_024336504.1)	81	No	No
GARG5288			g. h. family 35 protein ( <i>F. mediterranea</i> ) (XP_007270765.1)	65	Si	Si
GARG16585			g. h. family 35 protein ( <i>Stereum hirsutum</i> ) (XP_007304408.1)	58	No	No
GARG7326			g. h. family 35 protein ( <i>Phanerochaete carmosa</i> ) (XP_007398136.1)	62	Si	Si
GARG21653			g. h. family 35 protein ( <i>H. irregulare</i> ) (XP_009549020.1)	67	No	No
GARG7634			g. h. family 35 protein ( <i>F. mediterranea</i> ) (XP_007270765.1)	62	Si	Si
GARG7140			GH10 - CBM 1	hypothetical protein ( <i>A. bisporus</i> ) (XP_007330618.1)	72	Si
GARG272	$\beta$ -1,4-xilosidasa	GH3	beta-xylosidase ( <i>Gloeophyllum trabeum</i> ) (XP_007867506.1)	65	Si	Si
GARG8236		GH43	g. h. family 43 protein ( <i>K. imperatae</i> ) (XP_021871614.1)	34	Si	Si

<b>GARG13624</b>			g. h. family 43 protein ( <i>H. irregulare</i> ) (XP_009540390.1)	63	Si	Si
<b>GARG8178</b>			g. h. family 43 protein ( <i>H. irregulare</i> ) (XP_009540390.1)	67	No	No
<b>GARG8354</b>	$\alpha$ -glucuronidasa	GH67	Hypotetical protein ( <i>Gymnopilus dilepis</i> ) (PPQ73418.1)	70	Si	Si
<b>GARG10140</b>	$\beta$ -1,4-endomananasa	GH5	hypothetical protein ( <i>T. versicolor</i> ) (XP_008036739.1)	33	Si	Si
<b>GARG8317</b>		GH5-CBM1	CEL4a mannanase ( <i>F. mediterranea</i> ) (XP_007262621.1)	77	Si	Si
<b>GARG15957</b>	$\beta$ -1,4-manosidasa	GH2	g. h. family 2 protein ( <i>G. trabeum</i> ) (XP_007862101.1)	66	Si	Si
<b>GARG3382</b>			predicted protein ( <i>Fibroporia radiculosa</i> ) (XP_012181583.1)	73	Si	No
<b>GARG10537</b>			g. h. ( <i>F. mediterranea</i> ) (XP_007266411.1)	64	Si	Si
<b>GARG17905</b>			g. h. ( <i>T. versicolor</i> ) (XP_008044867.1)	61	Si	No

**Tabla 2.3.7:** Enzimas degradadoras de hemicelulosa en *G. argentinum*. ID: Identidad asignada a los transcritos. Actividad: función putativa asignada a la secuencia proteica codificada por cada transcritos, Familia CAZY: familia asignada según la base de datos CAZy. Blast: mejor resultado de la búsqueda contra la sección Protein de la base de datos non-redundant (NCBI) con su porcentaje de identidad.

ID	Actividad	Familia CAZY	Blast	% de identidad	S. secreción	T. completo
GSCH06027	Xiloglucan $\beta$ -1,4-endoglucanasa	GH12	g. h. family 12 protein ( <i>D. squalens</i> ) (XP_007363419.1)	70	No	No
GSCH03640			g. h. family 12 protein ( <i>H. irregulare</i> ) (XP_009542041.1)	76	No	No
GSCH21085		GH74 - CBM1	hypothetical protein ( <i>S. hirsutum</i> ) (XP_007307739.1)	77	No	No
GSCH03696			hypothetical protein ( <i>H. irregulare</i> ) (XP_009541712.1)	79	No	No
GSCH14946	$\alpha$ -arabinofuranosidasa	GH51	g. h. family 51 protein ( <i>S. commune</i> ) (XP_003027750.1)	61	Si	No
GSCH19310			hypothetical protein ( <i>A. bisporus</i> ) (XP_007333737.1)	54	Si	Si
GSCH20197		GH54 - CBM42	fungal alpha-L-arabinofuranosidase ( <i>P. strigosozonata</i> ) (XP_007386112.1)	78	Si	Si
GSCH23595	$\alpha$ -xilosidasa	GH31	sugar hydrolase ( <i>P. strigosozonata</i> ) (XP_007380054.1)	68	No	No
GSCH13667			g. h. family 31 protein ( <i>F. mediterranea</i> ) (XP_007261213.1)	67	Si	Si
GSCH02490	$\alpha$ -fucosidasa	GH29	g. h. ( <i>S. hirsutum</i> ) (XP_007303791.1)	51	No	No
GSCH07997			g. h. ( <i>S. hirsutum</i> ) (XP_007303791.1)	67	No	No
GSCH24033			alpha-L-fucosidase ( <i>K. imperatae</i> ) (XP_021870850.1)	53	Si	Si
GSCH09711			alpha-L-fucosidase ( <i>S. hirsutum</i> ) (XP_007304824.1)	50	Si	Si
GSCH21853		GH95	g. h. family 95 protein ( <i>S. lacrymans</i> ) (XP_007323277.1)	53	Si	Si
GSCH21855			g. h. family 95 protein ( <i>T. versicolor</i> ) (XP_008041035.1)	55	Si	Si
GSCH21858			g. h. family 95 protein ( <i>F. mediterranea</i> ) (XP_007262398.1)	52	Si	Si
GSCH22518			$\alpha$ -1,4-galactosidasa	GH27	g. h. family 27 protein ( <i>P. carnosa</i> ) (XP_007397248.1)	64
GSCH23032	g. h. family 27 protein ( <i>S. lacrymans</i> ) (XP_007313733.1)	50			No	No
GSCH05335	g. h. family 27 protein ( <i>P. carnosa</i> ) (XP_007393296.1)	68			Si	Si
GSCH11226	predicted protein ( <i>F. radiculosa</i> ) (XP_012184904.1)	46			No	No
GSCH15005	alpha-galactosidase ( <i>P. strigosozonata</i> ) (XP_007388130.1)	71			Si	Si
GSCH12880	GH27 - CBM35	g. h. family 27 protein ( <i>H. irregulare</i> ) (XP_009549751.1)		71	Si	Si
GSCH12788	$\beta$ -1,4-galactosidasa	GH35		g. h. family 35 protein ( <i>S. commune</i> ) (XP_003039036.1)	68	No
GSCH07252			g. h. family 35 protein ( <i>H. irregulare</i> TC 32-1] XP_009549020.1)	61	Si	No
GSCH21915			g. h. family 35 protein ( <i>F. mediterranea</i> ) (XP_007270765.1)	66	Si	Si
GSCH05417			g. h. family 35 protein ( <i>S. commune</i> ) (XP_003039036.1)	65	Si	No
GSCH20717			hypothetical protein ( <i>G. trabeum</i> ) (XP_007866190.1)	64	No	No
GSCH07253			g. h. family 35 protein ( <i>S. commune</i> ) (XP_003030581.1)	67	No	No
GSCH02261			g. h. family 35 protein ( <i>P. strigosozonata</i> ) (XP_007379760.1)	47	No	No

GSCH20716			hypothetical protein ( <i>G. trabeum</i> ) (XP_007866190.1)	56	No	No
GSCH05469			hypothetical protein ( <i>T. versicolor</i> ) (XP_008037305.1)	55	Si	No
GSCH14428	β-1,4-endoxilanasas	GH10	endo-1,4-beta-xylanase ( <i>A. bisporus</i> ) (XP_006459473.1)	68	Si	Si
GSCH14429			endo-1,4-beta-xylanase ( <i>A. bisporus</i> ) (XP_006459473.1)	70	Si	Si
GSCH00257			hypothetical protein ( <i>G. trabeum</i> ) (XP_007869125.1)	54	No	No
GSCH00781			hypothetical protein ( <i>A. bisporus</i> ) (XP_006454928.1)	63	Si	No
GSCH24413		GH11	g. h. family 11 protein ( <i>S. commune</i> ) (XP_003038466.1)	79	No	No
GSCH22913			hypothetical protein ( <i>A. bisporus</i> ) (XP_006454928.1)	59	No	No
GSCH14213	β-1,4-xilosidasa	GH3	beta-xylosidase ( <i>G. trabeum</i> ) (XP_007867506.1)	65	Si	Si
GSCH10633		GH43	g. h. family 43 protein ( <i>Coniophora puteana</i> ) (XP_007766730.1)	64	Si	Si
	α-glucuronidasa	GH67	Hypotetical protein ( <i>G. dilepis</i> ) (PPQ73418.1)	59	Si	Si
GSCH04711	β-1,4-endomananasa	GH5	g. h. family 5 protein ( <i>H. irregulare</i> ) (XP_009545732.1)	63	Si	Si
GSCH20471			g. h. family 5 protein ( <i>H. irregulare</i> ) (XP_009541843.1)	43	Si	Si
GSCH14280		GH5-CBM1	CEL4a mannanase ( <i>F. mediterranea</i> ) (XP_007262621.1)	74	Si	Si
GSCH14941	β-1,4-manosidasa	GH2	hypothetical protein ( <i>F. mediterranea</i> ) (XP_007272211.1)	40	No	No
GSCH13459			g. h. ( <i>S. hirsutum</i> ) (XP_007298979.1)	52	No	No
GSCH10482			predicted protein ( <i>F. radiculosa</i> ) (XP_012181583.1)	81	No	No
GSCH12340			g. h. ( <i>D. squalens</i> ) (XP_007371541.1)	58	No	No
GSCH15442			g. h. family 2 protein ( <i>P. placenta</i> ) (XP_024336912.1)	67	Si	Si
GSCH20765			g. h. ( <i>F. mediterranea</i> ) (XP_007266411.1)	65	Si	Si

**Tabla 2.3.8:** Enzimas degradadoras de hemicelulosa en *G. schweinitzii*. ID: Identidad asignada a los transcritos. Actividad: función putativa asignada a la secuencia proteica codificada por cada transcritos, Familia CAZY: familia asignada según la base de datos CAZY. Blast: mejor resultado de la búsqueda contra la sección Protein de la base de datos non-redundant (NCBI) con su porcentaje de identidad.

Entre los transcritos encontrados GSCH14436 y GARG8354 codifican potenciales  $\alpha$ -glucuronidasas de la familia GH67. La base de datos CAZY tiene reportadas 555 secuencias de proteínas de esta familia de las cuales sólo 26 corresponden a Eucariotas y ninguna de estas a Basidiomycetes. Debido a esto se realizó una búsqueda en la sección Basidiomycetes de la base de datos nr (NCBI), obteniendo como resultado únicamente dos proteínas homólogas, una proteína putativa perteneciente a la familia de las GH67 del genoma borrador de *Sphaerobolus stellatus* (KIJ48597.1) y una proteína hipotética del genoma borrador de *Gymnopilus dilepis* (PPQ73418.1). Los transcritos GSCH14436 y GARG8354 codifican para proteínas 831 y 780 aminoácidos y comparten un alto grado de similitud entre ellas (84,1%), ambas con un péptido señal de 15 aminoácidos. Para confirmar la identidad de los transcritos se comparó y alineó la secuencia traducida con proteínas fúngicas y bacterianas previamente caracterizadas (Figura 2.3.8). Ambas secuencias comparten entre un 59-70% de identidad (ID%) con enzimas de la familia GH67 fúngicas y entre un 36-45% con las bacterianas. El alineamiento muestra que los aminoácidos involucrados en el sitio activo están presentes en las secuencias de ambas cepas de *Geastrum*. Los aminoácidos que se involucran en la hidrólisis identificados como E292 para la GH67 de *Cellvibrio japonicus* (1GQL\_B) (Nagy et al., 2003) y de *Pseudomonas cellulose* (B3PC73) (Nurizzo et al., 2002) alinean con E285 de las secuencias de GH67 putativas de ambas cepas. Por otro lado, se encontraron los residuos E393 y D365 propuesto como la base catalítica para *C. japonicus*, *P. cellulose* y *Aspergillus niger* (Q96WX9) (de Vries et al., 2002).

```

B3PC73      ---QTEDGYDMWLRYPQPIADQTLTKTYQKQIRHLHVAGDSPTINAAAAELQRGLSGLLNK  57
1GQL_B     -----EDGYDMWLRYPQPIADQTLTKTYQKQIRHLHVAGDSPTINAAAAELQRGLSGLLNK  55
Q96WX9     -----EDGYDGWLRYPVSCDLRQALPSHVLLNSTKGSPIETAGRELKAGFQSILST  55
GSCH14436  SLVAAEDGLNGWLRYPVSCDLRQALPSHVLLNSTKGSPIETAGRELKAGFQSILST  60
GARG8354   SLVAAEDGLNGWLRYPVSCDLRQALPSHVLLNSTKGSPIETAGRELKAGFQSILST  60
           *** : **** : : : : . : .* ** : * : : : .

B3PC73      PIVARDEK----LKDYSLVIGTPDINSPLIASLNLGERLQALGAEGYLLEQTRINKRHVVI  113
1GQL_B     PIVARDEK----LKDYSLVIGTPDINSPLIASLNLGERLQALGAEGYLLEQTRINKRHVVI  111
Q96WX9     NLTSR---PFQCNSSSILVATLDEYRQR--CRDIN-VPELDPDGFWLQSE----GDTVR  105
GSCH14436  KPLLAHLSDKL--EGTSVIVGTIDGYTKA--VGKLNGLPQLELDGYWLSTK----GRTVQ  112
GARG8354   EPKLVHSVGKEKNGFSSVIVGTIDGYIEA--AGKLN-LPQIEGDGFWLSTK----GRTIQ  113
           *:::.* * : : : : * . : :

B3PC73      VAANSVGVLYGSFHLRLRIQTQHAEKLSLSSAPRLQHRVNVHWDNLNRVVERGYAGLS  173
1GQL_B     VAANSVGVLYGSFHLRLRIQTQHAEKLSLSSAPRLQHRVNVHWDNLNRVVERGYAGLS  171
Q96WX9     ILGKDARGALYGAYEYLAMVA-QRNF SRVAYATSPHAPIRWNQWDNMDGSIERGYGGAS  164
GSCH14436  ILGQNERGALYGAFEYLSMLA-QGNFSEVAYASNPHAPIRWNQWDNLDGSIERGYGGPS  171
GARG8354   ILGLNERGALYGAYEYLSMLA-QGNFSQVAYASNPHAPIRWNQWDNLDGSIERGYGGPS  172
           : . . * .***: . * : : * : : : : : * : * ** :***: : :****.* *

```



B3PC73 LWDWGSLPNYLAPRYTDYARINASLGINGTVINNVNADPRVLSQFLQKIAALADAFRPY 233  
1GQL\_B LWDWGSLPNYLAPRYTDYARINASLGINGTVINNVNADPRVLSQFLQKIAALADAFRPY 231  
Q96WX9 IFFKDGTVVEDMAPVEQYARLLASIRINAIVVNNVNaNATLLLLENMKG LGRIADACRPY 224  
GSCH14436 IFFANGTVVQDLTRVGOYARLLASIGINGIVVNNVNaNADPNILSSQNMQGLARIADIMRPY 231  
GARG8354 IFFANGTVVQNLTRAGEYARLLASIGINGIVVNNVNaNADANILSAQNMQGLARIADVMRPY 232  
:: .. :\*\*\*: \*\*: \*\*. \*:\*\*\*\*\*: :\* : : : : : \*\* \*\*

B3PC73 GIKMYLSINFNSPRAFGDVTADPLDPRVQVQWVKTRAQKIYSYIPDFGGFLVKADSEGGQP 293  
1GQL\_B GIKMYLSINFNSPRAFGDVTADPLDPRVQVQWVKTRAQKIYSYIPDFGGFLVKADSEGGQP 291  
Q96WX9 GVQIGISLNFASPEDLGGNTYDPLDPGVIAWQNI TDSLTYVYVDMAGYLVKADSEGGQP 284  
GSCH14436 GVLTYNRTLAEGANLFAKALQPHNGI VMFRAFVYN-QLNESDWKADRANA AAVQFFKDLDG 291  
GARG8354 GVQVIGISLNFASQLIGGLNTFDPLDPSVIDFWSNITNQLYQHVPDLAGYLVKANSEGGQP 292  
\*::: :\*:\*\* \*\* . :\*::\* \*\*\*\*\* \* :\*.. : : \* :\*:\*\*.\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

B3PC73 GPQGYGRDHAEGANMLAAALKPFGGVVFWRAFVYHPDIE-----DRFRGAYDEFMPLDG 347  
1GQL\_B GPQGYGRDHAEGANMLAAALKPFGGVVFWRAFVYHPDIE-----DRFRGAYDEFMPLDG 345  
Q96WX9 GPDTYNRTLSQGANLFARALQPYGGVLMYRAFVYDDNLNESDWKADRANA AAVEYFKDLDG 344  
GSCH14436 GPLTYNRTLAEGANLFAKALQPHNGI VMFRAFVYN-QLNESDWKADRANA AAVQFFKDLDG 350  
GARG8354 GPLTYNRTLADGANLFAKPLRLHNGI VMFRAFVYNDQLNESDWTADRANA AAVQFFTGDLG 352  
\*\* \*. \* :\*:\*\*:\* \* : . \*::\*:\*\*\*\*\*. : : \*\* .. \* : \* \*\*

B3PC73 KFADNVILQIKNGPIDFQPREPFSALFAGMSRTNMMMEFQITQ EYFGFATHLAYQGPLFE 407  
1GQL\_B KFADNVILQIKNGPIDFQPREPFSALFAGMSRTNMMMEFQITQ EYFGFATHLAYQGPLFE 405  
Q96WX9 QFENVVIIQIKYGPIDFQVREPTSPLFANLYHTNTAIELEVSQ EYLGQQCHLVYLPPLWK 404  
GSCH14436 EFDDNVVQIKYGPIDFQIREPASPLFANLRKTNAAIELOVTQ EYLGQQCHLVYLPPLWQ 410  
GARG8354 KFDDNVVQIKYGPIDFQVREPTSPLFAYLRNTNTAIELOVTQ EYLGQQCHLMYHPPLWQ 412  
.\* :\*:\*\*:\* \*\* \* \*\* \* \* : . \* :\*:\*\*:\* \*\* \* \*\* : :

B3PC73 ESLKTETHARGEESTIGNILEGKVFKTRHTGMAGVINPGTDRNWTGHFFVQSSWYAFGRM 467  
1GQL\_B ESLKTETHARGEESTIGNILEGKVFKTRHTGMAGVINPGTDRNWTGHFFVQSSWYAFGRM 465  
Q96WX9 TVLDFDLRVDHKPSMVRDIISGQRFNRTLGGWA AVVNVGTNRTWLGSHLAMS NLYAYGRL 464  
GSCH14436 TILGFDLRVDNKTSLVRDIIGGKTFKRPLSGSAAVNVGTNLTWLGSHLAMS NLYAYGRL 470  
GARG8354 TILGFDLRVDNRVSLVRDIIGGKTFNRPLSGSAAVNVGTNRTWLGSHLAMS NLYAYGRL 472  
\* : : . \* : :\*: \* : \* : \* \* . \* \* \*\* : \* \* . . \* . \*\* :\* :

B3PC73 AWDHQISAATAADEWLRMTFSNQPAFIEPVKQMLLVSREAGVNYRSPLGLTHLYS-QGDH 526  
1GQL\_B AWDHQISAATAADEWLRMTFSNQPAFIEPVKQMLLVSREAGVNYRSPLGLTHLYS-QGDH 524  
Q96WX9 AWSPTDESEQILEDWTRLTIFGQNHVINTISDMSMTSWPAYENY TGNLGIQTLTDLILYTH 524  
GSCH14436 AWPNTADSQNIVRDWSILTFGHDNDVVDITITQSMESWPAYENHSGNLGIQTLTDLILFTH 530  
GARG8354 AWPNTVDSQDIVQDWSRLTFGLDHHVVDITITQLSMESWPTYENYSGNLGIQTLTDLILFTH 532  
\*\* . : : \* :\*\* : : : : : : \* : \* : . \*\* : \* . \*

B3PC73 YGPAPWTDLPR-ADWTAVYYHRASKTGIGFNRTK-TGSNALAQYPEPIAKAWGDLNSVP 584  
1GQL\_B YGPAPWTDLPR-ADWTAVYYHRASKTGIGFNRTK-TGSNALAQYPEPIAKAWGDLNSVP 582  
Q96WX9 YGPNPATQDNNGWGQW-----TRADHDSVGM DRTIRNGTGYTGQYPEEVARVYESLESTP 579  
GSCH14436 FGNPASQDNNGWGQW-----TRADHLTIGMDRTVANGTGFSGQYPAEIASMYENIETTP 585  
GARG8354 FGNPASQDNNGWGQW-----TRADHLTIGMDRTVSNGTGFSGQYPAEVASMYEHIDTTP 587  
:\* \* :\*: . : \* \*\* : :\*:\*\* . \* . . \*\* : \* : : : : \*

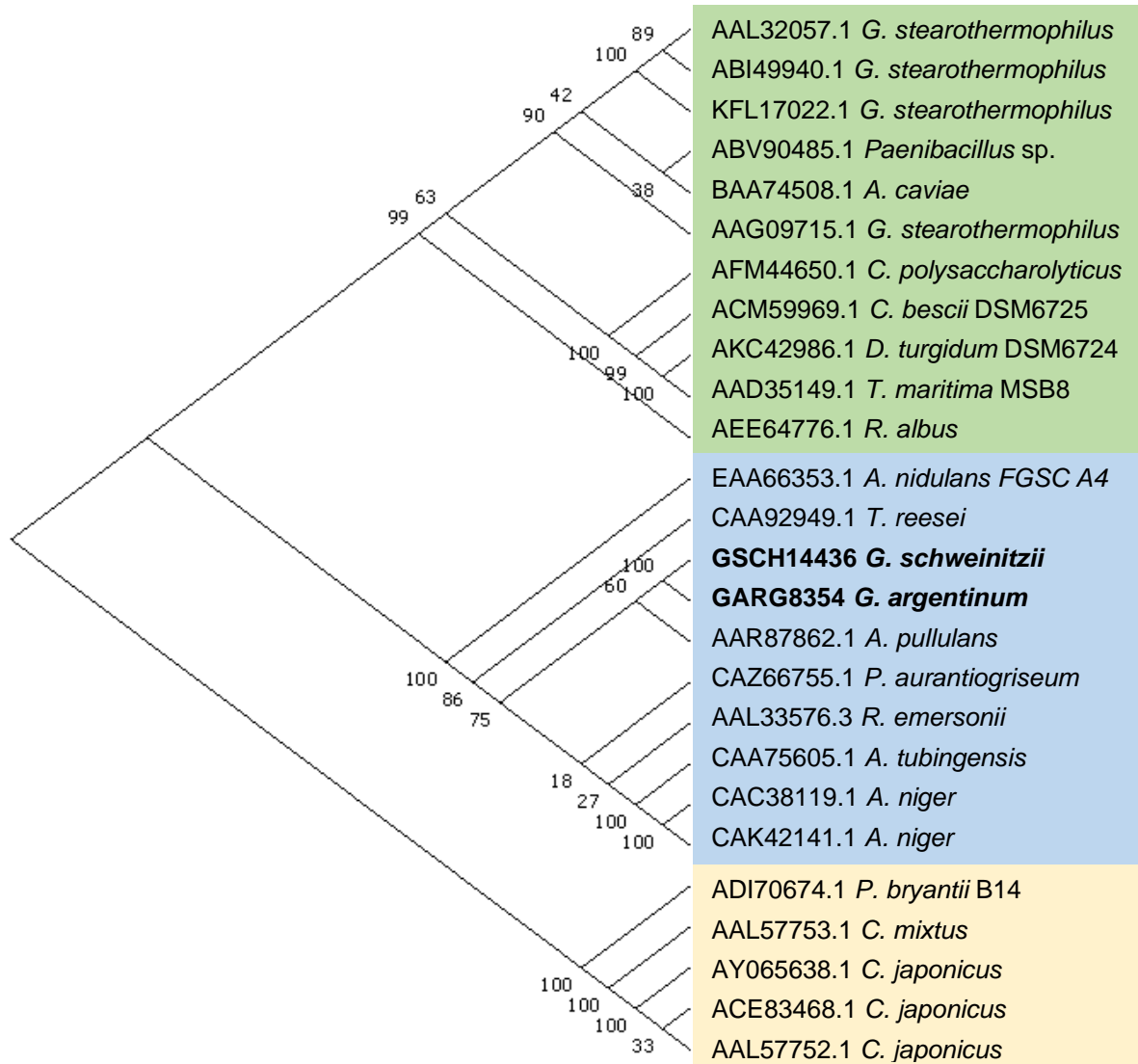
B3PC73 EDLILWFHHLSDHRMQSGRNWLQELVHKYYQGVQV RAMQRTWDQQEAYVDAARFAQVK 644  
1GQL\_B EDLILWFHHLSDHRMQSGRNWLQELVHKYYQGVQV RAMQRTWDQQEAYVDAARFAQVK 642  
Q96WX9 DDLVLFHHPVWTHRLHSGVTVIQHFYNAHYAGAEAAHG FVRQWESLEGLIDRERYEAMR 639  
GSCH14436 DELLLWFHVVNYTHRLNSGKTVIQFYDAHYAGAKTVQTFVPLWESLKGKID DARFNDVL 645  
GARG8354 DDLVLFHHPVYTQRLKSGKTVIQHFYDAHYAGANTAQTFVTRWESLEGGKIDDERYS DIL 647  
: : \* :\* : : : \* : . : \* \* . : : : \* . . : \* \* : :

B3PC73 ALLQVQEREAVRWRNSCVLYFQSVAGRPI PANYEQPE---HDLEYKMLARTTYVPEPWH 701  
1GQL\_B ALLQVQEREAVRWRNSCVLYFQSVAGRPI PANYEQPE---HDLEYKMLARTTYVPEPWH 699  
Q96WX9 SRLVYQAGHSIVWRDAINNFFYNTGIPDVAGR VGHHPWRIEAE SMRLDGYQTYTVSPFE 699  
GSCH14436 FRVKYQAGHSLVWRDAVVDDYNNLSGIPDEANRVGNHPWRIEAE SMELQGYETYTVNPF 705  
GARG8354 FRFKFQAGHSIVWRDAVVNFYNNLSGIPDEAKRVGNHPWRIEAE SMVLDGYQPYAVNPF 707  
. \* . : : \* : : : : \* \* \* . : \* : . \* . \* : :

B3PC73	PASSSRVLK-----	710
1GQL_B	PASSSRVLK-----	708
Q96WX9	AASNTTAIIITTSNSTTGTARTSIKAPSGVYDIGVNYDLYGGQSKWTLVSGDKVVGQWLG	759
GSCH14436	TASNTTAIVTTSNTTVGIASATKLNKSGTYDIAVNYFDLIGGKAHYRILLNDKILGEWVG	765
GARG8354	TASNTMAIVTISNTTAGTASTKINFKSDTYDVAINYYDLIGGKAHYRVSLNDKMLGEWVG	767
	**.: .:	
B3PC73	-----	710
1GQL_B	-----	708
Q96WX9	DMEHNSLGHTPSIYLDGHSATRITFHGVGIRQGDQLKIVGEANGVEPAPLDYIVLLPPGLVD	819
GSCH14436	NNE-DTLGHAPSQYLDGHSATRITFKDIKIRKGDLEVVGTPDGIEPAPIDYVSILPQGMVD	824
GARG8354	NNE-DILGHAPSTFLDGHSATRITFKNVKIRKGDTLKIVGTPDGIEPAPIDYVAILPKGIVD	826

**Figura 2.3.8:** Alineamiento de las secuencias traducidas de los transcritos GSCH14436 y GARG8354 clasificados como  $\alpha$ -glucuronidasa (GH67) de *G. argentinum* y *G. schweinitzii* y las proteínas caracterizadas B3PC73 de *Pseudomonas cellulosa*, 1GQL\_B de *Cellvibrio japonicus* y Q96WX9 de *Aspergillus niger*. Los residuos correspondientes al sitio activo se marcaron en celeste. Los resultados del alineamiento se indicaron como “\*” perfecto, “:” sitio donde se exhibe una similitud fuerte), “.” sitio donde se exhibe una similitud débil. El criterio para distinguir una similitud fuerte corresponde a un Score entre aa correspondiente a la una matriz PAM250 mayor a 0,5 y débil, para un score menor o igual a 0,5.

Para confirmar que los transcritos pertenecen a la familia de GH67 se reprodujo la filogenia realizada por Shallom et al. (2004) pero incluyendo nuevas secuencias de enzimas caracterizadas y las encontradas en los transcriptomas de *G. argentinum* y *G. schweinitzii*. El resultado del análisis obtuvo un árbol con alto grado de consenso conteniendo 3 grupos marcados, el grupo I y II de origen bacteriano (Figura 2.3.9 en verde y amarillo) y el grupo III con secuencias de origen fúngico en el que se agrupan las de *Geastrum* (Figura 2.3.9, en celeste).



**Figura 2.3.9:** Análisis filogenético de glicosil hidrolasas 67 (GH67) realizadas a partir de las secuencias analizadas por Shallom et al. (2004), nuevas enzimas caracterizadas y las secuencias de los transcritos GSCH14436 y GARG8354 correspondientes a putativas GH67 de *G. schweinitzii* y *G. argentinum*. El árbol resultante reprodujo la relación entre las secuencias, quedando también agrupadas las proteínas correspondientes al grupo I y II de origen bacteriano (color verde y amarillo) y el III de origen fúngico (color celeste).

### **2.3.3.3. Enzimas degradadoras de pectina**

En los transcriptomas de *G. schweinitzii* y *G. argentinum* se encontraron los transcriptos codificantes de las principales actividades reportadas de intervenir en la degradación de pectina. En concordancia con la alta proporción de ramnogalactouranos presentes en las paredes celulares de la soja, se encontraron múltiples transcriptos codificando actividades ramnogalactouronasa y ramnosidasa, así como pectin-liasas y estererasas relacionadas a la deconstrucción de la pectina (Tabla 2.3.9 y 2.3.10).

ID	Actividad	Familia CAZY	Blast	% de identidad	S. secreción	T. completo
GARG2348	Endo-/exo-(ramno)galacturonasas	GH28	hypothetical protein ( <i>Kwoniella dejecticola</i> ) (XP_018265841.1)	79	No	No
GARG9591			hypothetical protein ( <i>D. squalens</i> ) (XP_007360882.1)	61	Si	Si
GARG9987			extracellular exo-polygalacturonase ( <i>S. hirsutum</i> ) (XP_007309344.1)	63	Si	Si
GARG17531			endo-polygalacturonase PG1 ( <i>T. versicolor</i> ) (XP_008043465.1)	71	Si	Si
GARG17222	$\alpha$ -ramnosidasa	GH78	hypothetical protein ( <i>A. bisporus</i> ) (XP_006461114.1)	76	Si	Si
GARG20349			Six-hairpin glycosidase ( <i>T. versicolor</i> ) (XP_008040692.1)	64	Si	Si
GARG12338	Endoarabinanasa	GH43	Arabinanase/levansucrase/invertase ( <i>D. squalens</i> ) (XP_007367948.1)	69	Si	Si
GARG20325	$\beta$ -1,4-endogalactanasa	GH53	g. h. family 53 protein ( <i>H. irregulare</i> ) (XP_009551149.1)	79	Si	No
GARG366	Glucuronil insaturado hidrolasa	GH88	d-4,5 unsaturated-glucuronyl hydrolase-like protein ( <i>G. trabeum</i> ) (XP_007863704.1)	59	Si	Si
GARG2721	Ramnogalacturonaninsat. hidrolasa	GH105	g. h. family 105 protein ( <i>P. strigosozonata</i> ) (XP_007388008.1)	54	Si	Si
GARG19393			g. h. family 105 protein ( <i>H. irregulare</i> ) (XP_009543214.1)	62	No	Si
GARG21776			Six-hairpin glycosidase ( <i>C. puteana</i> ) (XP_007768567.1)	62	Si	Si
GARG4790	Pectin liasa	PL1	hypothetical protein ( <i>A. bisporus</i> ) (XP_006457984.1)	73	Si	No
GARG10131	Pectato liasa	PL1	hypothetical protein ( <i>A. bisporus</i> ) (XP_007326530.1)	80	Si	Si
GARG6476		PL3	polysaccharide lyase family 3 protein ( <i>S. commune</i> ) (XP_003038571.1)	68	Si	Si
GARG962	Pectinmetil esterasa	CE8	carbohydrate esterase family 8 protein ( <i>F. mediterranea</i> ) (XP_007265528.1)	40	Si	Si
GARG9436			carbohydrate esterase family 8 protein ( <i>T. versicolor</i> ) (XP_008044893.1)	74	Si	Si
GARG9155			hypothetical protein ( <i>F. mediterranea</i> ) (XP_007265526.1)	60	Si	Si
GARG14361	Ramnogalacturonan acetil esterasa	CE12	hypothetical protein ( <i>A. bisporus</i> ) (XP_007325201.1)	63	Si	No
GARG19552	Feruloil esterasa	CE1	tannase and feruloyl esterase ( <i>S. hirsutum</i> ) (XP_007307816.1)	62	No	Si
GARG17341			tannase and feruloyl esterase ( <i>S. hirsutum</i> ) (XP_007303767.1)	54	No	No
GARG15582			tannase and feruloyl esterase ( <i>S. hirsutum</i> ) (XP_007303767.1)	52	No	Si
GARG15585			tannase and feruloyl esterase ( <i>S. hirsutum</i> ) (XP_007303767.1)	53	No	Si
GARG6024			tannase and feruloyl esterase ( <i>S. hirsutum</i> ) (XP_007298442.1)	48	Si	Si
GARG17589			tannase and feruloyl esterase ( <i>S. hirsutum</i> ) (XP_007303767.1)	58	No	No

**Tabla 2.3.9:** Enzimas degradadoras de pectina en *G. argentinum*. ID: Identidad asignada a los transcritos. Actividad: función putativa asignada a la secuencia proteica codificada por cada transcritos, Familia CAZY: familia asignada según la base de datos CAZY. Blast: mejor resultado de la búsqueda contra la sección Protein de la base de datos non-redundant (NCBI) con su porcentaje de identidad.

ID	Actividad	Familia CAZY	Blast	% de identidad	S. secreción	T. completo
GSCH22889	Endo-/exo-(ramno)galacturonasas	GH28	extracellular exo-polygalacturonase ( <i>S. hirsutum</i> ) (XP_007309344.1)	65	No	No
GSCH06080			extracellular exo-polygalacturonase ( <i>S. hirsutum</i> ) (XP_007309344.1)	32	Si	Si
GSCH17288			pectin lyase-like protein ( <i>D. squalens</i> ) (XP_007371504.1)	65	Si	Si
GSCH02138			hypothetical protein ( <i>D. squalens</i> ) (XP_007360882.1)	63	Si	Si
GSCH03876			endo-polygalacturonase PG1 ( <i>F. mediterranea</i> ) (XP_007266762.1)	80	No	No
GSCH05681			rhamnogalacturonan-hydrolase ( <i>F. mediterranea</i> ) (XP_007269365.1)	76	No	No
GSCH23942			rhamnogalacturonan-hydrolase ( <i>F. mediterranea</i> ) (XP_007269365.1)	68	Si	No
GSCH06483			endo-polygalacturonase PG1 ( <i>T. versicolor</i> ) (XP_008043465.1)	70	No	No
GSCH02213	α-ramnosidasa	GH78	Six-hairpin glycosidase ( <i>T. versicolor</i> ) (XP_008040692.1)	64	Si	Si
GSCH21983			hypothetical protein ( <i>A. bisporus</i> ) (XP_006461114.1)	77	Si	Si
GSCH04973	Endoarabinanasa	GH43	arabinofuranosidase ( <i>S. hirsutum</i> ) (XP_007298951.1)	62	Si	Si
GSCH07511			g. h. family 43 protein ( <i>H. irregulare</i> ) (XP_009540390.1)	62	Si	Si
GSCH24264			g. h. family 43 protein ( <i>S. lacrymans</i> ) (XP_007313217.1)	64	Si	No
GSCH01409			g. h. family 43 protein ( <i>H. irregulare</i> ) (XP_009545960.1)	63	Si	No
GSCH07658	β-1,4-endogalactanasa	GH53	g. h. family 53 protein ( <i>H. irregulare</i> ) (XP_009551149.1)	73	No	No
GSCH19705	Glucuronil insaturado hidrolasa	GH88	g. h. family 88 protein ( <i>S. lacrymans</i> ) (XP_007321574.1)	58	Si	Si
GSCH04895	Ramnogalacturonaninsat. hidrolasa	GH105	g. h. family 105 protein ( <i>P. strigosozonata</i> ) (XP_007388008.1)	54	Si	Si
GSCH19320			g. h. family 105 protein ( <i>P. strigosozonata</i> ) (XP_007382111.1)	63	No	Si
GSCH26221	Pectin liasa	PL1	pectin lyase-like protein ( <i>P. strigosozonata</i> ) (XP_007388381.1)			
GSCH11672	Pectato liasa	PL1	hypothetical protein ( <i>A. bisporus</i> ) (XP_006457984.1)	83	Si	Si
GSCH05522			hypothetical protein ( <i>A. bisporus</i> ) (XP_006457984.1)	89	Si	Si
GSCH24512		PL3	polysaccharide lyase family 3 protein ( <i>S. commune</i> ) (XP_003038571.1)	72	No	Si
GSCH12265	Pectinmetil esterasa	CE8	pectin lyase-like protein ( <i>D. squalens</i> ) (XP_007366217.1)	70	Si	Si
GSCH13661			carbohydrate esterase family 8 protein ( <i>Laccaria bicolor</i> ) (XP_001876322.1)	53	Si	Si
GSCH22569			hypothetical protein ( <i>A. bisporus</i> ) (XP_006462923.1)	69	No	No
GSCH20574	Ramnogalacturonan acetil esterasa	CE12	SGNH hydrolase ( <i>S. hirsutum</i> ) (XP_007309673.1)	65	Si	Si
GSCH12964	Feruloil esterasa	CE1	tannase and feruloyl esterase ( <i>S. hirsutum</i> ) (XP_007303767.1)	53	No	Si
GSCH13099			carbohydrate esterase family 1 protein ( <i>F. mediterranea</i> ) (XP_007265302.1)	66	No	Si

GSCH14026			alpha/beta-hydrolase ( <i>S. hirsutum</i> ) (XP_007304055.1)	58	No	Si
GSCH15246			tannase and feruloyl esterase ( <i>S. hirsutum</i> ) (XP_007298442.1)	60	No	Si
GSCH17936			tannase and feruloyl esterase ( <i>S. hirsutum</i> ) (XP_007307816.1)	50	No	Si

**Tabla 2.3.10:** Enzimas degradadoras de pectina en *G. schweinitzii*. ID: Identidad asignada a los transcritos. Actividad: función putativa asignada a la secuencia proteica codificada por cada transcritto, Familia CAZY: familia asignada según la base de datos CAZy. Blast: mejor resultado de la búsqueda contra la sección Protein de la base de datos non-redundant (NCBI) con su porcentaje de identidad.

#### **2.3.3.4. Enzimas involucradas en la degradación de almidón**

En ambos transcriptomas se encontraron múltiples transcritos que codifican enzimas relacionadas a la hidrólisis de almidón incluyendo  $\alpha$ -amilasas de la familia GH13 y glucoamilasas de la familia GH15, conteniendo sólo el dominio catalítico o unidas a CBMs de reconocimiento de almidón como los CBM20 (en ambas GH13 y GH15) y CBM48 (sólo en GH13), así como  $\alpha$ -glucosidasas de la familia GH31. La presencia de estos transcritos podría indicar una expresión constitutiva de los mismos o una inducción debida a restos de almidón en las cascarillas de soja utilizadas como sustrato para el crecimiento de *Geastrum* (Tabla 2.3.11 y 2.3.12).



ID	Actividad	Familia CAZY	Blast	% ID	S. secreción	T. completo
GARG17052	α-amilasa	GH13	g. h. family 13 protein ( <i>L. bicolor</i> ) (XP_001883734.1)	72	No	No
GARG20049			g. h. family 13 protein ( <i>T. versicolor</i> ) (XP_008038819.1)	51	No	No
GARG19786			g. h. family 13 protein ( <i>F. mediterranea</i> ) (XP_007261354.1)	58	No	No
GARG12647	Glucoamilasa	GH15	g. h. family 15 protein ( <i>S. lacrymans</i> ) (XP_007319126.1)	73	No	No
GARG8827	α-1,4-glucosidasa	GH31	g. h. family 31 protein ( <i>P. carnosus</i> ) (XP_007396394.1)	64	Si	No
GARG21339			alpha-glucosidase( <i>D. squalens</i> ) (XP_007369267.1)	68	No	No
GARG19363			alpha-glucosidase( <i>G. trabeum</i> ) (XP_007866465.1)	65	Si	Si
GARG18243			hypothetical protein ( <i>G. trabeum</i> ) (XP_007861518.1)	70	No	No
GARG18085			g. h. family 31 protein ( <i>H. irregulare</i> ) (XP_009541863.1)	68	No	No
GARG9709			g. h. family 31 protein ( <i>C. puteana</i> ) (XP_007767916.1)	68	No	No

**Tabla 2.3.11:** Enzimas degradadoras de almidón en *G. argentinum*. ID: Identidad asignada a los transcritos. Actividad: función putativa asignada a la secuencia proteica codificada por cada transcritos, Familia CAZY: familia asignada según la base de datos CAZy. Blast: mejor resultado de la búsqueda contra la sección Protein de la base de datos non-redundant (NCBI), con su porcentaje de identidad y estado del transcritos (Completo o parcial).

ID	Actividad	Familia CAZY	Blast	% de identidad	S. secreción	T. completo
GSCH02706	α-amilasa	GH13	g. h. family 13 protein ( <i>S. hirsutum</i> ) (XP_007308650.1)	40	No	No
GSCH04252			g. h. family 13 protein ( <i>S. commune</i> ) (XP_003028057.1)	58	No	No
GSCH16382			g. h. ( <i>G. trabeum</i> ) (XP_007862200.1)	80	Si	Si
GSCH22619		GH13 – CBM 20	g. h. family 13 protein ( <i>C. puteana</i> ) (XP_007771716.1)	58	No	No
GSCH08803			secreted alpha-amylase ( <i>G. trabeum</i> ) (XP_007868421.1)	70	No	No
GSCH23962		GH13 – CBM 48	g. h. family 13 protein ( <i>P. placenta</i> ) (XP_024337184.1)	76	Si	Si
GSCH17833	Glucoamilasa	GH15	g. h. family 15 protein ( <i>S. lacrymans</i> ) (XP_007319126.1)	69	Si	Si
GSCH09757		GH15 – CBM20	glucoamylase ( <i>D. squalens</i> ) (XP_007364090.1)	66	No	No
GSCH05687			g. h. family 15 protein ( <i>S. lacrymans</i> ) (XP_007319841.1)	71	No	No
GSCH21651	α-1,4-glucosidasa	GH31	g. h. family 31 protein ( <i>P. carnososa</i> ) (XP_007389752.1)	65	Si	Si
GSCH02247			hypothetical protein ( <i>P. strigosozonata</i> ) (XP_007381730.1)	55	Si	Si
GSCH08092			g. h. family 31 protein ( <i>H. irregulare</i> ) (XP_009541863.1)	70	No	No
GSCH05132			g. h. family 31 protein ( <i>P. carnososa</i> ) (XP_007396394.1)	67	No	No
GSCH11723			g. h. family 31 protein ( <i>P. carnososa</i> ) (XP_007396394.1)	63	No	No
GSCH15623			alpha-glucosidase ( <i>D. squalens</i> ) (XP_007369267.1)	60	Si	Si
GSCH08616			alpha-glucosidase ( <i>G. trabeum</i> ) (XP_007866465.1)	66	Si	Si

**Tabla 2.3.12:** Enzimas degradadoras de almidón en *G. schweinitzii*. ID: Identidad asignada a los transcritos. Actividad: función putativa asignada a la secuencia proteica codificada por cada transcritos, Familia CAZY: familia asignada según la base de datos CAZY. Blast: mejor resultado de la búsqueda contra la sección Protein de la base de datos non-redundant (NCBI), con su porcentaje de identidad y estado del transcritos (Completo o parcial).

## 2.3.4. Enzimas modificadoras de lignina

### 2.3.4.1. Oxidasas multicobre

Se encontraron 14 y 13 transcriptos correspondientes a oxidasas multicobre (MCOs) en los transcriptomas de *G. argentinum* y *G. schweinitzii*. Aunque la mayoría de estos transcriptos resultaron tener un alto porcentaje de identidad con secuencias codificantes de lacasas putativas, sólo 2 de *G. argentinum* y 6 de *G. schweinitzii* fueron anotados como correspondientes a lacasas ya que codifican proteínas completas que contienen las cuatro secuencias conservadas L1, L2, L3 y L4 relacionadas a los dominios de unión a cobre en estas enzimas (Tablas 2.3.13 y 2.3.14). Los transcriptos completos GARG10038, GARG10036 y GSCH23905 de *G. argentinum* y *G. schweinitzii* comparten un alto %ID con una secuencia de *Hypsizygyus marmoreus* anotada como lacasa 2 (KYQ35319.1). Sin embargo, ni esta secuencia ni las codificadas por los transcriptos de *G. argentinum* y *G. schweinitzii* tienen los sitios conservados de unión a cobre L1 y L2 por lo que fueron anotadas como oxidasas multicobre.

Transcripto	Función putativa	Blast	%aa ID
GARG15472	Lacasa	multicopper oxidase ( <i>Sphaerobolus stellatus</i> SS14) (KIJ45860.1)	73%
GARG2726	Lacasa	Laccase-1 ( <i>Leucoagaricus</i> sp. SymC.cos) (KXN81384.1)	62%
GARG10036	MCO	Laccase-2 ( <i>Hypsizygyus marmoreus</i> ) (KYQ35319.1)	59%
GARG10038	MCO	Laccase-2 ( <i>H. marmoreus</i> ) (KYQ35319.1)	60%
GARG9424	MCO	multicopper oxidase ( <i>S. stellatus</i> SS14) (KIJ45864.1)	52%
GARG20346	MCO	laccase 5 ( <i>Lentinus sajor-caju</i> ) (CAD45381.1)	61%
GARG1120	MCO	hypothetical protein ( <i>Sistotremastrum suecicum</i> ) (KZT43398.1)	75%
GARG2236	MCO	multicopper oxidase ( <i>S. stellatus</i> SS14) (KIJ31689.1)	69%
GARG2367	MCO	multicopper oxidase ( <i>S. stellatus</i> SS14) (KIJ23523.1)	76%
GARG3038	MCO	multicopper oxidase ( <i>S. stellatus</i> SS14) (KIJ37532.1)	81%
GARG3129	MCO	multicopper oxidase ( <i>S. stellatus</i> SS14) (KIJ53597.1)	75%
GARG18451	MCO	laccase ( <i>P. strigosozonata</i> HHB-11173 SS5) (XP_007381236.1)	67%
GARG19790	MCO	multicopper oxidase ( <i>S. stellatus</i> SS14) (KIJ37532.1)	67%
GARG7135	MCO	multicopper oxidase ( <i>S. stellatus</i> SS14) (KIJ51820.1)	64%
GARG18058	Fet3	Ferroxidase ( <i>Jaapia argillacea</i> MUCL 33604) (KDQ60117.1)	61%

**Tabla 2.3.13:** Oxidasas multicobre de *G. argentinum*. ID: Identidad asignada a los transcriptos. Actividad: función putativa asignada a la secuencia proteica codificada por cada transcripto, Blast: mejor resultado de la búsqueda contra la sección Protein de la base de datos non-redundant (NCBI) con su porcentaje de identidad.

Transcripto	Función putativa	Blast	% aa ID
<b>GSCH16427</b>	Lacasa	multicopper oxidase ( <i>S. stellatus</i> SS14) (KIJ45860.1)	71%
<b>GSCH04810</b>	Lacasa	multicopper oxidase ( <i>S. stellatus</i> SS14) (KIJ32231.1)	78%
<b>GSCH12280</b>	Lacasa	multicopper oxidase ( <i>S. stellatus</i> SS14) (KIJ32231.1)	79%
<b>GSCH17722</b>	Lacasa	multicopper oxidase ( <i>S. stellatus</i> SS14) (KIJ45864.1)	54%
<b>GSCH17721</b>	Lacasa	Laccasei soform 2 ( <i>H. irregulare</i> TC 32-1] (XP_009545277.1)	63%
<b>GSCH19125</b>	Lacasa	multicopper oxidase ( <i>S. stellatus</i> SS14) (KIJ44817.1)	71%
<b>GSCH23905</b>	MCO	laccase-2 ( <i>H. marmoreus</i> ) (KYQ35319.1)	58%
<b>GSCH18496</b>	MCO	multicopper oxidase ( <i>S. stellatus</i> SS14) (KIJ44817.1)	72%
<b>GSCH08253</b>	MCO	Laccasei soform 2 ( <i>H. irregulare</i> TC 32-1) (XP_009545277.1)	63%
<b>GSCH08630</b>	MCO	multicopper oxidase ( <i>S. stellatus</i> SS14) (KIJ53597.1)	73%
<b>GSCH22443</b>	MCO	laccase ( <i>Moniliophthora roreri</i> MCA 2997] (XP_007849995.1)	60%
<b>GSCH22679</b>	MCO	multicopper oxidase ( <i>S. stellatus</i> SS14) (KIJ53597.1)	69%
<b>GSCH00354</b>	Fet 3	multicopper oxidase ( <i>S. stellatus</i> SS14) (KIJ51820.1)	64%

**Tabla 2.3.14:** Oxidasas multicobre de *G. schweinitzii*. ID: Identidad asignada a los transcritos. Actividad: función putativa asignada a la secuencia proteica codificada por cada transcritos, Blast: mejor resultado de la búsqueda contra la sección Protein de la base de datos non-redundant (NCBI) con su porcentaje de identidad

Los 8 transcritos para lacasas expresados por *G. argentinum* y *G. schweinitzii* contienen ORFs que codifican secuencias peptídicas de entre 524 y 552 aminoácidos, acorde con lo observado para las lacasas de tres dominios fúngicas y bacterianas. Todas ellas mostraron la presencia de péptidos señal de secreción de 20 a 24 aminoácidos, pesos moleculares teóricos de 57,6-60,5 kDa, y un PI teórico entre 5,23-6,48 (Tabla 2.3.15).

Transcripto	Largo (pb)	Cadena peptídica (aa)	M. molecular (kDa)	S. de clivaje	PI teórico
<b><i>G. schweinitzii</i></b>					
<b>GSCH_12280</b>	1796	534	58,5	24-25: ISA-DV	5,9
<b>GSCH_16427</b>	3516	536	58,2	23-24: AHA-AT	6,48
<b>GSCH_04810</b>	1828	551	60,5	20-21: SLG-AT	5,42
<b>GSCH_19125</b>	1793	547	59,1	20 -21: ANA-AT	5,47
<b>GSCH_17721</b>	1737	526	57,6	22 -23: VFA-AQ	5,23
<b>GSCH_17722</b>	2078	539	58,6	20-21: AAG-AT	5,93
<b><i>G. argentinum</i></b>					
<b>GARG_2726</b>	1670	524	56,8	20 -21: ANA-AT	5,3
<b>GARG_15471</b>	2015	534	57,6	20-21: SLG-AT	5,94

**Tabla 2.3.15:** Caracterización in silico de las secuencias de las lacasas: largo en pares de bases de los transcritos, largo de la cadena peptídica predicha, masa molecular estimada, sitio de clivaje del péptido señal de secreción y pi teórico.

El análisis de identidad de las ocho secuencias aminoacídicas predichas entre sí se encuentra en el rango entre 43 - 83%, siendo las de mayor similitud GSCH16427 y GARG15471 con 83% seguido de GSCH17721 con GARG2726 con 76,9%. En el caso de estas secuencias el porcentaje de similitud entre estas proteínas es mayor que el encontrado con otras lacasas reportadas en la sección Protein de NR (NCBI). Contrario a esto las secuencias predichas de los transcriptos GSCH12280, GSCH19125, GSCH17722 y GARG2726 poseen un grado mayor de similitud con los resultados encontrados en NR que con las lacasas de los transcriptomas de *G. schweinitzii* y *G. argentinum*, lo que podría indicar que constituyen secuencias únicas de estas especies (Tabla 2.3.16).

	<b>GSCH 12280</b>	<b>GSCH 16427</b>	<b>GSCH 04810</b>	<b>GSCH 19125</b>	<b>GSCH 17721</b>	<b>GSCH 17722</b>	<b>GARG 2726</b>	<b>GARG 15471</b>	<b>NR</b>
<b>GSCH12280</b>	-	50,8	76,9	47,4	53,8	45,2	50,7	49,4	79,1
<b>GSCH16427</b>	51,0	-	47,4	62,9	51,1	51,4	48,9	<b>83,4</b>	71,4
<b>GSCH04810</b>	<b>76,9</b>	47,4	-	45,9	53,2	45,1	50,5	48,0	78,1
<b>GSCH19125</b>	47,2	62,9	45,9	-	49,4	51,3	48,5	64,3	71,8
<b>GSCH17721</b>	53,8	51,1	53,2	49,3	-	45,4	63,5	50,2	63,5
<b>GSCH17722</b>	45,8	51,4	45,4	51,2	45,4	-	43,4	51,2	54,1
<b>GARG2726</b>	50,6	49,1	50,5	48,5	63,5	43,4	-	<b>48,9</b>	73,0
<b>GARG15471</b>	49,4	<b>84,0</b>	48,5	65,0	50,6	52,3	<b>49,6</b>	-	62,6

**Tabla 2.3.16:** Porcentaje de similitud entre las lacasas putativas y del mejor resultado en la base de datos non redundant NR (NCBI) (teniendo como referencia los porcentajes presentados en la Tabla 2.3.14)

El alineamiento de las secuencias aminoacídicas predichas correspondientes a las 8 lacasas muestra la presencia de los 10 residuos H responsables de la unión a los átomos de cobre distribuidos en cuatro regiones conservadas (L1 a L4) (Figura 2.3.10). Las regiones L1 y L3 son consideradas específicas para lacasas dentro de la familia de oxidasas multicobre (Kumar et al., 2003; Copete et al., 2015). A pesar de esto se observaron variaciones en las secuencias correspondientes a la región L3, como también a L2 y L4 (Figura 2.3.10).

Las secuencias correspondientes a la región L3 presentan los residuos H, G y L de la secuencia consenso, salvo por GSCH17722 en la que la L esta reemplazada por una treonina (T). En esta misma región también observamos que el residuo prolina (P) se ve cambiado por una alanina (A) en las secuencias GSCH16427, GSCH19125, GARG15471 y GARG15472.

En la región L4 se encuentran los residuos asociados al centro de unión a cobre T1. Entre estos, los residuos HCH están directamente relacionados con la coordinación del átomo de cobre mononuclear, mientras que en una posición cercana (10 posiciones hacia el extremo C-terminal de la C altamente conservada) se encuentra un ligando relativamente débil que se asocia al cobre en posición axial. La identidad del ligando axial es importante debido a que se cree podría influir en el potencial de óxido-reducción del centro T1 (Pardo & Camarero, 2015). En las 8 lacasas predichas por los transcriptomas de *Geastrum* analizados este residuo fue una L, que es el encontrado generalmente en lacasas de potencial medio de óxido-reducción (Figura 2.3.10, L marcado en rosa). Asociados también a la formación del centro de unión a cobre T1, encontramos residuos pertenecientes a la signature L4 que a su vez forman parte del bolsillo de unión a sustratos. La identidad de estos residuos puede modificar la capacidad de transferencia de electrones sin modificar el potencial de óxido-reducción de la enzima y en la especificidad de sustratos (Xu et al., 1996). Entre los residuos identificados como integrantes de estos bolsillos encontramos el tripéptido ubicado en las posiciones 12, 13 y 14 de la región signature L4 (representada en el consenso como X3) las cuales en los transcriptos caracterizados como lacasas de *Geastrum* se las encuentra como LE(AGV) (Figura 2.3.10, marcado en gris) siendo el residuo 14 el único variable.

```

GSCH17722  ATTKQYTLNVAAGNIAPDGFNVRVASLVNGQFPGPIISANKGDKIKVTVNNKLTDPTRRS 60
GSCH19125  ADSVAKDWTLQTTSIAPDGFERTAAALVNGLYPGPLLSANKGDSITVNVHNQLNDDNIRKS 60
GSCH16427  -ATVQLNWNIAAKTISP DGFNRTSALVNGQYPGPLLKANKGDTVLVTVNNKLADPNMRRS 59
GARG15471  -ATVKNLFDLAAKTISP DGFNRTAADVNGQYPGPLLKANKGDTVFVTVNNNLANPNMRQS 59
GSCH12280  ---VNYQFNIVNGNIAPDGFMRNGILVNNIFPGTLIQANKNDVLHINTSVQLVNPAMRRA 57
GSCH04810  AGDVNYQFNIVNGNSPDGLQRDAILVNGIFPGTLIQANKNDVLHINTSVQTTDQTMRRP 60
GSCH17721  -AQVLMQLETNNRVIAPDGFERSAALMDGTFPGTFIKATKGDLLLLNVSNKLNLDPMRRS 59
GARG2726   -ATVLYQLPIVNAPTSSDGFERIGVLANGTDPGPTLAFHKGDRALINVTTSALTDPSMRRS 59
          : **: * . : :. ** : *. * :.. : :*
```

```

L1        HWHGxxxxxxxxxDGxxxxxQCPI
GSCH17722  TSIHWHGLFQHHNTENDGAAFVSQCPIGPGNSYTYLLETD 100
GSCH19125  TSIHWHGIFQSRNAQNDGSPFVTQCPIAPNNSFTYQLTLG 100
GSCH16427  TSIHWHGIFQPRNAEDDGSPFVTQCPIAPNHTYTYKLVLG 99
GARG15471  TSVHWHGIFQPRNAEDDGSPFVTQCPIAPNHTYTYKLVLG 99
GSCH12280  TSIHWHGLFQKRTASEDGPAMVNQCPIASGFSYTYDIPLN 97
GSCH04810  TSIHWHGLFQKRTNSEDGPAMVNQCPIASGHSYTYDIPLN 100
GSCH17721  TSIHWHGLFQHRRTNDADGPAFVSQCPIAPNHTFLYNIPLR 99
GARG2726   TSIHWHGLFQARTAGNDGPAMVTQCPVSPNHTFLYNFSLA 99
          **:****:** :. ** :*:***:.. : : *
```

L2 GTxWYHSHxxxQYCDGLxGx (FLIM)

GSCH17722 SQAGTFWYHSHLSTQYTDGVRGALIIYDPHDPQKHLYDVDDASTVVALSDWYHRPAPELF 160
GSCH19125 DQAGTFWYHSHLSTQYVDGIRGPLVIYDPNDPHKNLYDIDDESTVITLSDWYHTPAGLST 173
GSCH16427 QQAGTFWYHSHLSTQYVDGIRGPIVIYDPHDPNKSPLYDVVDNEQTIITLSDWYHQALIST 159
GARG15471 EQSGTFWYHSHLSTQYTDGIRGPLVIYDKNDPNKLLYDVVDNEQTIITLSDWYHTPALVAT 159
GSCH12280 GQSGTFWYHSHLSTQYVDGLRGALVVYDDEDPNIGLYDVDDASTVITLADWYHGMAPALQ 157
GSCH04810 GQSGTFWYHSHLSTQYTDGLRGPLVVYDDEDPNISLYDVDDASTIIMLADWYHTAAPTLO 160
GSCH17721 DQTFGSFWYHSHLSTQYCDGLRGGLVIYDPDDPLKDMYDVDDDESTVIVSLADWYHTLAPNAT 159
GARG2726 EQTGTFWYHSHLSTQYCDGLRGALVIYDPKDPKHLHYDVVDNEDTVIRLADYHNPAPALQ 159
\*:\*:\*\*\*\*\* \*\*:\* ::\* .\* :\*:\* :\*:\* \* \*

GSCH17722 AEFQA---GSSLEPFADGHLINSKGRFGTTPNGLPAVERTRINVAKGRYRLRVISMMAE 220
GSCH19125 AQWLA---GTAPEFVPSGLINGAGRFKN----GPAVPRSIINVEPGKRYRFRLLVAASAT 233
GSCH16427 NSFLA---G-AEEFPDSGLINSAGRFSG----GPAVTRTRITVSKGYRYRFRLLVSVSAG 231
GARG15471 NGFLA---G-GPEPCPDSGLINSAGRFSG----GPAVTRTRIVVVSQGYRYRFRLLSLSAQ 231
GSCH12280 AEYFSKDNGGGHEPVPDGTGLINGLGRFKH----GPTSPLAVNVVQGRYRLRVINISGF 233
GSCH04810 AEYFSKDNGGGLEPVPDSGLINGKGRYNG----GPQIAWAVNVVEHGKRYRLRVINISGF 236
GSCH17721 AQFLET----LSVPIPDTGLINGKGRFIG----GPEVPYAVNVVEPGKRYRLRVNMGCR 231
GARG2726 AVFFND----AVVPIPDAGLVNGKGRFVG----GPAAPFHVINVEHGKRYRLRFINTACR 231
: \* \* \*:\* \*\* : \* \* \*:\* \* : \*

GSCH17722 SYFEFRIQNHPLTVIELDGVNHKPYNVDAIALLPGQRASVVINANQAVGNYWITGNANII 297
GSCH19125 GSFNFFIANHQLTVIEVDGISHQPYTVDTLQMLPGQRYSIIVNANQTVGNYWISAIQTVR 292
GSCH16427 GFFDFAIDKHRMAVIEADGISTKPYTVDSIVIIFPGQRYSVVVKADQPIGNYWIRATQTFR 291
GARG15471 GAFDFAIDQHRMTVIEADGIATQPYTVDSIAMLAGQRYSVVVKANQPVGNYWIRATQTI 291
GSCH12280 AQYRFSIDGHRLTIIEADGIPHEPLTVDSFNIYVAQRYSVVLTASQPIGNYWIHAPMTVS 290
GSCH04810 AQFRFSIEGHPLTIIEADGIPHEPLTVDMFNIYVAQRYSVILNANQPVANYWIHGPMTVN 293
GSCH17721 PFHTFSVDTHKLVIIIEADGIEHEPLEVDQFDIYAAQRISAVLTANQPVGNYWIRAPLNGG 291
GARG2726 PFFTFSVDKHNLTIIIEADGIESEPHTVGSFEIFVAQRYSAILNANQPVANYWLRAPPTGG 290
. . : \* ::\* \*\* :\* \* . : : .\*\* \* ::\* \* :\*:\* . .

GSCH17722 GNTTTPFNPNFNGSDMLAVLHYNGASNSEPNVPAPLIHDPNAKQFTEFEAQPLEPRVPG 332
GSCH19125 GSTAS-GSTDFDGTMSAVLHYVGAPDGEPTATRPPTPPSGAVAFQEFKLLKPLVPVTAEL 334
GSCH16427 GATTSPTGPTFNGTDTYAVLRYVGANSAEPTTPQPTLPPGGVAFKEFNKPLINPGAPG 314
GARG15471 GSTTSATNPNFNGTDVYAVLRYVGASSAEPTTPQPTALPPGGVAFKEFNKPLVINPGAPG 324
GSCH12280 G---ASQNKLDTANIKAVLRYSGAPVVEPASS-----SPTDGVPLKEQNLHAIGLPVPV 319
GSCH04810 G---AGSNKLNLDPNVYAVLRYAGAPNADPTTSNA---HPASGILLREQNLAAGLPLVPV 325
GSCH17721 KTAAGGPNPLDPLIRAVLRYAGAPDQEPITEKQ---ANPVMNEADLHPLINPGAPG 314
GARG2726 APG-PAGNPNFDPTLSLAIVRYGGAPDAEPDGSTN---DTATNLLLEQDLHTLIDPGSPG 314
. : : \* ::\* \*\* :\* . .

GSCH17722 GCGNAAQHFNFTFGPVD--DLGKAWAVNGQSFKPPTLPVLLQILSQGFTTNSQFNVSENA 392
GSCH19125 G--TPDKVFNF--FAP--ARGGSWTINGSKYIPPTIPTLLNILANGASMSDAFGPSENT 394
GSCH16427 GSAPPDKLLNFNVTVGS--PNGAIWLINGVQFKPPSVPTLLQILSGASTDSDFAQ--SDGT 374
GARG15471 GSAPPDKSFNFVTSIGS--ANGDVWLINGVSFKPPKVPTLLQILSGATNDSDFTPPGDNT 384
GSCH12280 GSDRPNRTIDLDFTKTTI-NKAVAWTINGIQYLPDPLTLLKIMSSNVSTDSDFAKSEHT 379
GSCH04810 GDREADRTIDLDFTKTSNNGSVAVTINGIQYIPDPLTLLNIIAHNFTTESDFAKSEHT 385
GSCH17721 GDGPPDMHIDLNITQP---NPPFFAVNGQSFQSPMPALLQILSG-ASQPTDFLPSENV 374
GARG2726 GDVAPDVHFDMIIISQP---NPPFFEINGISFEPPALPALLQILSG-ATNPNDFLPHENM 374
\* : : : :\* \* : \* :\*:\* \* : : \*

L3 HPxHLHGXF

GSCH17722 FVVQPNNSLEVQITGDPF-GHPHHLHGHA SSISSF--SGGGRNCQNPV 443
GSCH19125 FVLPPNATIEVNFIGGA---GHFHLHGHA FSVVRSASQTDGSHNLIDPPR 445
GSCH16427 FVLPPNATVEVWVISTP---GHFHLHGHA FVDVIQSA--DGGPPNYIDPPR 425
GARG15471 FVLPPNATVEVVFISTP---GHFHLHGHA FVDVIQSA--DGGPPNYIDPPR 435
GSCH12280 FILERDQIIELVIHGSLNGITHPFHLHGHA FHVIESS--DGGDANYVNPV 430
GSCH04810 FVLERNQVIDVVIHGSLNGITHPFHLHGHA FHVIESS--DGGANFVNPV 436
GSCH17721 FVLPPNKTIEVSIPIG---GGAHPHLHGHA FVDVIRVA--NSTVTNFVNPV 425
GARG2726 ELLPQNAIEVSIPIG---TGAHPHLHGHA FVDVIRSS--NSNTNFVNPVIR 425
: : : : \* \* \* \* : : \* \* \* \* :



	L4	GPWXLHCHIDXHXHGLXXXF	
GSCH17722	DNP	<b>GPWFLHCHIDWH</b> LEVGLAVI <b>GR</b> ARDVVASGGTATDPVKIRFRT	488
GSCH19125	DNP	<b>GPWFVHCHLDFH</b> LEGGLAAV <b>F</b> ARDVVVSGGTPDAPLRIRFRT	479
GSCH16427	DNP	<b>GPWFIHCHLEFH</b> LEGGLAAV <b>F</b> ARDVVVSGGTPTNPLRIRFRT	470
GARG15471	DNP	<b>GPWFIHCHLEFH</b> LEGGLAAV <b>F</b> ARDVIGVGGGG---VRIRFKT	480
GSCH12280	DNP	<b>GPWFLHCHIDWH</b> LEAGLAV <b>F</b> ARDVIGVGGGG---VRIRFLT	475
GSCH17721	DNP	<b>GPWFLHCHIDWH</b> LEAGLAV <b>F</b> ARDVIAINGGN---TTFRFRT	481
GSCH04810	DNP	<b>GPWFLHCHIDWH</b> LEAGLAV <b>F</b> ARDVIAINGGN---TTFRFRT	470
GARG2726	DNP	<b>GPWFLHCHIDWH</b> LEVGLAVI <b>GR</b> DVVAVNGGN---TTFRFFT	470
		*****:***:..:*** **..:.. :** *	
GSCH17722	EAPAQNVKGPDSQII	SPAWRELCPYNDLPQELQ	522
GSCH19125	EDPNGILSGPQSVQ	PDDQWNQLCDIYNNLDPEDK	513
GSCH16427	EDPAGIRSGPQSVN	PSKAWKDLCNLYKDLPEFQ	513
GARG15471	EDPAGIRSGPQSVQ	PDQAWKDLCDIYNNLDPQFQ	514
GSCH12280	EAPADQRSGPASQ	IMKPSWVDLCTTYKSLPAELQ	509
GSCH04810	EAPSDAREGPDAQ	IIKPTWVDLCSYKALPNQLQ	515
GSCH17721	EAPAQNVKGPDSQII	SPAWRELCPYNDLPQELQ	504
GARG2726	EAAAAQRVGNQSQ	IVSQQWQQLCPYNNLDPQLQ	504
	*	* : . * : ** * : * . :	

**Figura 2.3.10:** Regiones correspondientes a las signature L1-L4 de los alineamientos de las secuencias traducidas de los transcritos clasificados como lacasas de *G. argentinum* y *G. schweinitzii*. Las secuencias consenso se marcaron en negrita, sus modificaciones particulares en color verde, la C altamente conservada de la región L4 en color amarillo, el residuo axial en rosa y el tripéptido ubicado en las posiciones 12, 13 y 14 respecto al inicio de la región L4 en color gris. Los resultados del alineamiento se indicaron como “\*” perfecto, “.” sitio donde se exhibe una similitud fuerte), “.” sitio donde se exhibe una similitud débil. El criterio para distinguir una similitud fuerte corresponde a un Score entre aa correspondiente a la una matriz PAM250 mayor a 0,5 y débil, para un score menor o igual a 0,5.

### 2.3.4.2. Peroxidasas

En los transcriptomas de *Geastrum* se identificaron 4 y 3 transcritos para *G. argentinum* y *G. schweinitzii* que codifican potenciales peroxidasas tipo II (GARG6102, GARG5524, GARG245, GARG9788, GSCH11425, GSCH02196 y GSCH12559). Las búsquedas de los transcritos realizadas con Blastp en la sección Protein de la base de datos non-redundant obtuvieron como mejor hit peroxidasas tipo II de *S. stellatus* con un porcentaje relativamente alto de similitud (67-87%) (Tabla 2.3.17 y Tabla 2.3.18). Dado el alto grado de homología que poseen las peroxidasas es difícil clasificarlas por sus tipos, para esto se reprodujo el análisis filogenético realizado por Lundell et al. (2010) pero agregando las secuencias de las peroxidasas tipo II de *Geastrum*. Los árboles obtenidos muestran la misma distribución obtenida por Lundell et al. (2010) con el agrupamiento de las secuencias de *Geastrum* en los cluster A.2 y B compuestos únicamente por MnPs (Figura 2.3.11).





En todas las secuencias se encontraron los dos residuos conservados E (correspondientes a las posiciones 35 y 39 de la MnP de *P. chrysosporium*) involucrados en la oxidación de Mn y sólo en las proteínas predichas de los transcritos GSCH11425 y GARG245 el N (correspondiente a la posición 179 de la MnP de *P. chrysosporium*), aunque no descartamos que en el resto de las proteínas se encuentre este residuo en otra posición. En cambio, en ningún caso se identificó el residuo W (posición 171 de la MnP de *P. chrysosporium*) relacionado con las MnPs y LiPs de alto potencial (Figura 2.3.12).

```

GSCH02196  ----AVLDKRVNCPDGN-TASNAACCKFFALRDDLQANLFDGGECGEEVHESLRLTFHDA  55
GARG9788  -----DGN-IASDAACCKFFALRDDLQENLFDGGECGEEVHESLRLTFHDA  45
GSCH12559  ---ATAGQKGVKCPDGN-TVSNAACCKYFSLRDDLQKQHFE-GFCGEEVHEVLRLAFHDA  55
GARG6102  ATTTANHNKGVKCPDGN-VTSNAACCKFFPLKADLQ-QHFG-GFCDEEVHEVVRLSFHDA  57
GARG5524  -----APSALVTCPDGN-KATNAACCPFFALRDDLQANLFE-NQCSEDAHEVLRLSFHDA  53
GSCH11425  -----LPKRAVTCPDGN-TASNEACCPFFALRDDLQTNAFH-NECNE DAHEVLRLSFHDA  53
GARG245    -----LPKRAVTCPDGKNTASNEACCPFFALRDDLQNNAFH-NECNE DAHEVLRLSFHDA  54
                **:  .:  **  :*  *  **  :  *  .  *  .:  **  :**  :***

GSCH02196  IGFSPALTKQGKFGGGGADGSI IAFGETEFNFHANNGIDDIANAQSPFATAHN-VSFGDI  114
GARG9788  IGFSPALNKQGQFPGGGADGSI IAFGATEFAFHANNGIDDIANTQAPFAAAHN-VSFGDL  104
GSCH12559  IAI STLKKGKPGAGGGADGSM LIFPNVEPNFNSANLGIADSVDGLLPFLAAHPDVSAGDL  115
GARG6102  IAFSTSLKKGKPGAGGGADGSM LIFPNVEPNFHANLGISDSVDALLPFLAAHPDVTAGDL  117
GARG5524  IAFSSSLNLKGQNGGGGADGSM LIFPDVEPNFNSANNGISDSVDALLPFLAQHP-VTAGDL  112
GSCH11425  IVFSKALQQQGQFPGGGADGSM LIFPNDEPNFTANAGISDSVGLLLPFLAGHPNITAGDL  113
GARG245    IVFSSALQQQGQFPGGGADGSM LIFPDVEPNFNSANAGISDSVDLLLPFLANHPNITAGDL  114
*  :*  :*  :*:  *****:  *  *  *  **  **  *  ..  **  :  *  :*:  **

GSCH02196  IQFAGAI AVSN CAGAPRLEFLAGRPPTAASPDLLVPEPFDTVPKILSRFAD-AGFSPA E  173
GARG9788  IQFAGAVGVSNC PGAPRLEFLAGRPPIAASPDLLVPEPFDTIPKILARFAD-AGFSPA E  163
GSCH12559  IQFAAAVGITNCPGAPKLQFLS GRPNATAPADGLIPEPQDSVSKILKRFDDAAGFTPAE  175
GARG6102  IQFAAAVGIANC PGAPMLQFLS GRPNATAPADGLIPEPQDSVTKILKRFDDAAGFTPAE  177
GARG5524  IQFGAAVAITNCPGAPRLQFLS GRPNATRAAPDGLIPEPQDPVEKIFERFADGGGFTPNE  172
GSCH11425  IQYAATVAVGNCPGGPKLEFFAGRP NATQAGPDGLIPEPQDSVDKILARFDDAAGFTPDE  173
GARG245    IQYAATVAVGNCPGAPKLEFFAGRP NATQAGPNGLIPEPQDSVDKILARFDDAAGFTPDE  174
**  :  .  .  .  .  .  :  *  *  .  *  *  :  :  **  .  *  :  *  *  *  .  *  *  :  *  *

GSCH02196  VVALLASHSIAADHVDATI PGTPFDSTPSTFDSQFFVEVQLRGTAFPGTG-----GN  226
GARG9788  VVALLASHTVAAAADHVDTSI PGSPFDSTPSTFDTQLFVEVQLRGTAFPGTG-----GN  216
GSCH12559  VVALLASHTIARADHVDPNKTAVPF DSTPF EFDSQIYLEVLLKGTGFPGSA-----NN  228
GARG6102  VVALLASHSIARADHVDPNIQAVPF DSTPF EFDSQIFLDVLLKGTGFPGKSDNGTRKSNN  237
GARG5524  IIALASHTVARADHVDSTLDAAPFDSTPFDFDTQVFLEVLLEGTGFPGT-----NN  225
GSCH11425  VVALLSSHSIARADNVDKTVPGAPFDSTPFYTDYDQFFLETLLKGTGFPGT-----NN  226
GARG245    VVALLSSHSIARADNVDKTVPAAPFDSTPFYTDYDQFFLETLLKGTGFPGTA-----NN  227
:  :  **  :  **  :  *  *  :  *  *  .  .  *****  :  *  *  :  .  .  *  *  .  *  *  .  *  *

GSCH02196  QGEVTSPL-----GGEMRIQSDHELARN DATSCEWQSFVNNQQK LQTA FRAAMSKLAT  279
GARG9788  QGEVESPL-----AGEIRLQSDHLLARDPATNCEWQSFVNNQNKLQTA FRAAMSKLAT  269
GSCH12559  TGEVASPLPESDGNV GEMRLQSDFALAHDPRTSCTWQGFVDQQT KMNAFAKAMAKLAV  288
GARG6102  TGEVASPLPESDGNV GEMRLQSDFALAHDPRTSCTWQGFVDQQT KMNAFAKAMAKLAV  297
GARG5524  TGEVPSPLPLGQKSVGELRLQSDFALARHPV TACTWQSFINQQE LMSHAFKAMAKLAL  285
GSCH11425  TGEVESPLPLTVPPNSGEIRLQSDFALARDPRTACTWQGFINQQQ QMADAFKAMAKLAV  286
GARG245    TGEVESPLPLTVAPDSGELRLQSDFALARDPRTACTWQGFINQQQ QMADAFKAMAKLAV  287
***  ***  **  :  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

```

```

GSCH02196    LGQDRSKLVDCSEVIPVPKPLT-KAATLPAGKTMSDIEQACATAPFFTLKTDPGPPTAVP 338
GARG9788     LGQDRSKLVDCSDVIPVPKPFT-GTVHLPAGKTMNDIEQACATAPFFSLKADPGPATAVP 328
GSCH12559    VGQNTHKLVDCSELIPDPVPAQKKHITFPATKTAKDLQLSCP-APFPKLATDPGNTFPII 347
GARG6102     VGQNTREFIDCSDLIPNPVPAARKHIAFPATKSAKDLQLSCP-APFPKLATDPGNTFPII 356
GARG5524     VGQDSRRLVDCSEVI PAALPAR-RTASFPATKSRADVQQACKALPFFHLPTDSGSQQAI 344
GSCH11425    VGVDKSTLVDCSEVVVNPVSTQPGPATLPATKTVDIEQACD-QPLPSLASDPGASETPI 345
GARG245      VGVDKSTLIDCSDVVDPVSTQPGPATFPATKTINDVEQACD-SFFPSLATDPGASETPI 346
:* :      ::*:*:*:*      :** * : * : : * * : * *

GSCH02196    PVPHS*----- 343
GARG9788     PVPPS*----- 333
GSCH12559    PHCPPGDDGCEADS*-- 361
GARG6102     PHCPEGDDECEADSDS* 372
GARG5524     PHCPDGGDDCVS*---- 356
GSCH11425    PHCPPNSTDCEDES*- 360
GARG245      PHCPPNSTDCDDDS*-- 360
*
```

**Figura 2.3.12:** Alineamientos de las secuencias traducidas de los transcritos clasificados como MnPs de *G. argentinum* y *G. schweinitzii*. Los residuos correspondientes a los sitios de unión a marcaron en celeste. Los resultados del alineamiento se indicaron como “\*” perfecto, “.” sitio donde se exhibe una similitud fuerte), “.” sitio donde se exhibe una similitud débil. El criterio para distinguir una similitud fuerte corresponde a un Score entre aa correspondiente a la una matriz PAM250 mayor a 0,5 y débil, para un score menor o igual a 0,5.

### 2.3.4.3. Peroxidasas decolorantes de tintes

Los resultados de la anotación muestran que los transcriptomas de *G. argentinum* y *G. schweinitzii* contienen 4 y 3 transcritos que codifican para potenciales de peroxidasas decolorantes de tintes (DyPs) (Tabla 2.3.16 y 2.3.17). En todos los casos, los mejores hits de Blastp contra la sección Protein de la base de datos non-redundant (NCBI) son proteínas hipotéticas de *S. stellatus*. Todos los transcritos muestran los residuos relacionados con los grupos hemo, entre los que encontramos la histidina H341 que actúa de ligando, los cuatro residuos que conforman el bolsillo de unión a peróxido de hidrógeno en lado distal del grupo funcional Hemo (H341, R362, G386, F389) (Figura 2.3.13, marcado en celeste), y el motivo GXXDG (Figura 2.3.13, marcado en gris) que contiene el residuo catalítico ácido aspártico (teniendo como referencia a la DyP de *Auricularia auricula-judae*, 4AU9)(Yoshida & Sugano, 2015).

```

GARG13703 HHGRSALSRRSFDHGFFGPGNIFGGMFTPPNRPPVKKPPPKPEP----- 46
GSCH13572 YHGRRALSRRDWPFG---SGGFF-DHMFPHPSRPPKKGSPPTSTPTTKTASTTASTPAST 56
GARG5048 -----AGLLKP----RRT----SSILINPDAQ 19
GSCH19461 -----AGVLKP----RRA-----SILIDPAAQ 18
GSCH19884 -----LVRP----RRT----TSILIDPGEQ 17
GARG19660 -----TPGTDSILIP----RRT----SSILNSPAAQ 23
GSCH14372 -----SPGTPNILIP----RRT----SSILNSPAAQ 23

:

GARG13703 -----PSNSFDLSNIQGDIIFPIDSAKKTFLFFKIDNPGTFKGLSSSIHDR 93
GSCH13572 P-----TSAPSQAPNPFNMNTNIQADAVFPMNTVAKSFSFFNINSVQTFKQALGTTIHAR 110
GARG5048 PDLPSASSAKAAAAAASLNLNDNIQGDILIGMKNQELFFFFFFAINDAATFKAKLKQDIHDL 79
GSCH19461 PDLPSLASAKAAAAAADVNLDNIQGDILIGMKNKELFFFFFFAINDAATFKAKLKSDIHGL 78
GSCH19884 PELPPPSEAESEEAAGALNLSDIQGDILIGMKNKEKFFFFFFHIEDPPTFKQKLRANV-DL 76
GARG19660 PQLPSPAVT----STSSLNLKDIQGDVLIGMKKKQEKFFFFFFKITNPKVFKAILRTGA-GL 78
GSCH14372 PKLPSPAAA----ASGGLNLKDIQGDVLVGMKKKKEKFFFFFFKITNPKVFKITLRVGA-DL 78

::: **.* :. :.. : * ** * : .** *

GARG13703 ITTAAQVSPGSQ-PPSAAINIGFTIDGLNALGVTDNLDGDRSFSARQTNDVNAMGDPGTTN 152
GSCH13572 ITTAAQSLPGTT-LPSTVVNIQFTIDGLNALGITDNLGDSFSGRQINDIDAIGDPGTTN 169
GARG5048 ITTTTQLLSVST-QPTTAVNLAFSQQVGLTALNVSDSLGDTLFTSGQELDASALGDPGTTN 138
GSCH19461 ITTTTQLLPNSTQSPTTAVNIAFSQVGLNTLGVTDNLGDALFFAGQAVDATAALGDPGTVN 138
GSCH19884 ITSTIQLLDVSM-QPNAMINVAFSHTGLLALNMTESTGDDFFFEAGMFSAAFDLGDPGTD 135
GARG19660 ITTTDQLLDVNK-QPNAMVNVAFSQSGLKALNVTDDLGDVPVFSKQGFADANLGDPTNN 137
GSCH14372 ITTDELDDVNK-QPNAMVNLAFSQTGLKALNVTDDLGDVPVFSAGQFADATNLGDPGTDN 137

**.: : . *. : **:*. : ** :*. : :. : ** * : ***** :

GARG13703 WVQAFTGQNVHGFIMVGASSKSIDAAISDLLSTNGSISEVYRLEGSQRPKDQAGHEHF 212
GSCH13572 WVEAFTGQDIQGIFIVGAGSKNDVDTAISELVSTSNG-ISEVYRLEGLQRPNDQAGHEYF 228
GARG5048 WVPQFVGKQVHGLFLLASDVTVDNINSELDNIKTILGNSISEVYSLQGAARPGSEAGHEHF 198
GSCH19461 WVPQFANKSIHGVFLLASNTVDNVNSQLANIQTILGASISEVYSEGAARPNQDQAGHEHF 198
GSCH19884 WAPAFKGTNIHGLFLLASDSTTTIEQEQQVVKDYFNSTITEIYITISGQARPGDQAGHEHF 195
GARG19660 WVDAFKGTDIHGVFLLASDSTLIIDAQWLAVKLVLFAGSLTESYTLGAARPGDQAGHEHF 197
GSCH14372 WVDAFKGQNVHGVFLLASDSTLIIDAQWLSVKLLFASSLQELYTLGQSRPGDQAGHEHF 197

* . * . : **:*. : : : : : * * :.* ** :. : *****

GARG13703 GFKDGLSQPCLDGMTDCSQPGIIVPMPGVILIGANGDI--TPRP--SWASGGSMMAFRQL 268
GSCH13572 GFKDGLGQPCLDGMDCSQPGVSVVPPQGVIIVGAQGDS--TPRP--GWAAGGSMMAFRQL 284
GARG5048 GFMDGVSQPAVDGFSTP-LPGQAVVPAGVILLGETSDPALSSRP--SWATDGSFLAFRQL 255
GSCH19461 GFMDGISQPAVTGFNAPGNPGQAVVPAGIILVGGANDPGLNSRPASGWATDGSFLAFRQL 258
GSCH19884 GFMDGISQPAVRGFNKTPPLPGQMLIDVGRVLVGEPEGDE-LEIRP--VWAKDGTFLAFRQL 252
GARG19660 GFMDGISQPGITGFTTNPVPGQTVIDPGHLLLNETGDT-I-TRP--AWAKDGTFLAFRQL 253
GSCH14372 GYMDGISQPGITGFTTNPAPGQTVIDPGHLLLNGETGDT-I-TRP--AWAKDGTFLAFRQL 253

* : ** :.* * : * : : * : :. : . * ** ** .*: :*****

GARG13703 KQLVPEFQKFARDNAIKMPGMTQDQGAELLQARMFGRWKDGTPLDLSPLKPDPTLAADSS 328
GSCH13572 QELAPEFDKFAQDNAILQPGFTQDGAALLKARMFGRWQDGTPLELSPLKPDPTLAADRL 344
GARG5048 EQKVPEFNKFLTDNPIPIPGFTPEQGSSELLGARMVGRWKSGAPIDLTPADDPVLAAADPQ 315
GSCH19461 EQKVPEFNKFLTDNPIPLPGLTPEQSELGMARMVGRWKSGAPIDLAPFADDPALAADPN 318
GSCH19884 EQLVPEFNKFLADNALPVPGLTAEGAELLGARMVGRWRS GAPVFLSPVRDDPTLAKDSM 312
GARG19660 KQLVPEFNKFLTDNPIKLPGLTPKEGSDLGMARMIGRWKSGAPVDLAPLRDDPVLAKDPT 313
GSCH14372 KQLVPEFNKFLTDNPLTVPGLTPKEGSDLRGARMIGRWKSGAPVDLSPLRDDPILAKDPL 313

: . ***** ** : : **:*. :. : * ** .*****: **:*. : ** * *

GARG13703 RNNDFTYSHPNSDLSSDQSRCPFSAHTRKTNPRDDLPN-----NSNHIMRSSIAYGSEV 382
GSCH13572 RNNDFTYSQP---LASNQSNCPSFAHIRKTNPRNDLPG-----NLNHIMRSSIVYGGEV 395
GARG5048 RNNNFNFSHPGEDLSSNQTRCPFSAHIRKTAPRADFN-----VNIANHIIRAGIPYGPEV 371
GSCH19461 RNNNFDFSHPGEDLTSNQTRCPFSAHIRKTAPRADFIALAGGLNVNHIIRAGIPYGPEV 378
GSCH19884 RNNDFNYTWPGEDA-SNQTRCPFSAHIRKTAPRGDFVH----LEIDHHIFRAGIPYGPEV 367
GARG19660 RNNNFDFTHPGANITTNQTNCPFSAHVRKTAPRADLTP----VDVNHHIMRAGIPYGPEV 369
GSCH14372 RNNNFDFSHPGDVLVTNQTRCPFSAHIRKTAPRADLSP----VDVNHHIMRAGIPYGPEV 369

***.* :. : * : : :. : ***** ** * * * : : **:*. : * * **

GARG13703 TQREAKAQTQQRGLAFVAYQSSIANGLFQQQSWADATGFPLQK-NQTIGFDAVIGS- 440
GSCH13572 TPREEQAQTQQRGLAFVAYQSSIANGLFQQQSWADATGFPLQK-NQTIGFDPVIGA- 453
GARG5048 TDAAEASNTSSVERGLAFVSYQSAIGNGFHFQQQVWANNPGFIFNKVDPTPGFDPIIGA- 431
GSCH19461 TPDEAASNTSSIGRGLAFVSYQSVINNGHFHFIQQSWANNKNFVLLKSDSTPGFDPIIGA- 438
GSCH19884 TGDEAASNTTQVERGLAFVSYQSDLAEGFVTLQKRWASDPAFVHNKSDSTPGYDPIIGA- 426
GARG19660 STSEANSNTSKTERGLAFVAYQSNLAQQGFQFLQHSWANNPKFVFGK-DVLPGFDPPIIGA- 427
GSCH14372 SSSEASSTTKTERGLAFVAYQSALNQGQFQFMQKRWANNPGFVFGK-NVSPGFDPPIIGA- 427

```

```

: * :.*:. *****:*** : :** * : **. * * : **: ** :.*
GARG13703 NHGQPRVTFGLDPTDASKSLTL-PDFIVSEGGAYFFYPPLSALATGGKLAQ*- 490
GSCH13572 NHGQARNTSGLDPTNVSKMSL-PEFVRSRGGAYFFSPPLSACAVGGKLTQ*- 503
GARG5048 TNGQTRFASGLDTPDNHDYTL-PDFIVSHGGGEYFFSPSLSAIAG--TLSD*- 479
GSCH19461 PSGQARFASGLDTPDNHDYTI-PDFIVSRGGGEYFFSPSLSAIAG--ILSD*- 486
GSCH19884 NHGEPFRFVSGLDPTDPNRDFTLMIDFVRSRGGGEYFFAPAISSVRD--YITAP* 476
GARG19660 NAGQPRNVTGLDPTKPTGQTLLIDFVQSRGGGEYFFVPSISAIKN--VITKP* 477
GSCH14372 NAGQPRNVTGTDPSNPTGQTLLIDFVQSRGGGEYFFVPSLSAIKN--VIAKP* 477
*: * . * * :. . . :. :*: *.** *** * :*: :.

```

**Figura 2.3.13:** Alineamientos de las secuencias traducidas de los transcritos clasificados como peroxidasa decolorantes de tintes (DyP) de *G. argentinum* y *G. schweinitzii*. Los residuos involucrados en los sitios de unión a hemo se marcaron en color celeste y el motivo que contienen el residuo catalítico en gris. Los resultados del alineamiento se indicaron como “\*” perfecto, “.” sitio donde se exhibe una similitud fuerte), “.”sitio donde se muestra una similitud débil. El criterio para distinguir una similitud fuerte corresponde a un Score entre aa correspondiente a la una matriz PAM250 mayor a 0,5 y débil, para un score menor o igual a 0,5.

Transcripto	Función putativa	Blast	%ID
<b>GARG6102</b>	Mn-Peroxidasa (MnP)	class II peroxidase ( <i>S. stellatus</i> SS14) (KIJ56820.1)	69
<b>GARG5524</b>	Mn-Peroxidasa (MnP)	class II peroxidase ( <i>S. stellatus</i> SS14) (KIJ54990.1)	79
<b>GARG245</b>	Mn-Peroxidasa (MnP)	class II peroxidase ( <i>S. stellatus</i> SS14) (KIJ56377.1)	65
<b>GARG9788</b>	Mn-Peroxidasa (MnP)	class II peroxidase ( <i>S. stellatus</i> SS14) (KIJ56380.1)	86
<b>GARG14226</b>	Hemotiolato peroxidasa (HTP)	hypothetical protein ( <i>S. stellatus</i> SS14) (KIJ38036.1)	73
<b>GARG14227</b>	Hemotiolato peroxidasa (HTP)	hypothetical protein ( <i>S. stellatus</i> SS14) (KIJ38036.1)	74
<b>GARG14229</b>	Hemotiolato peroxidasa (HTP)	hypothetical protein ( <i>S. stellatus</i> SS14) (KIJ38036.1)	73
<b>GSCH14274</b>	Cloroperoxidasa (CIP)	hypothetical protein ( <i>S. stellatus</i> SS14) (KIJ49267.1)	70
<b>GARG13192</b>	Cloroperoxidasa (CIP)	hypothetical protein ( <i>S. stellatus</i> SS14) (KIJ56587.1)	60
<b>GARG5048</b>	Peroxidasa decolorante de tintes (DyP)	hypothetical protein ( <i>S. stellatus</i> SS14) (KIJ37003.1)	70
<b>GARG13703</b>	Peroxidasa decolorante de tintes (DyP)	hypothetical protein ( <i>S. stellatus</i> SS14) (KIJ33197.1)	60
<b>GARG19660</b>	Peroxidasa decolorante de tintes (DyP)	hypothetical protein ( <i>S. stellatus</i> SS14) (KIJ38709.1)	78

**Tabla 2.3.17:** Peroxidasas de *G. argentinum*. ID: Identidad asignada a los transcritos. Actividad: función putativa asignada a la secuencia proteica codificada por cada transcripto, Blast: mejor resultado de la búsqueda contra la sección Protein de la base de datos non-redundant (NCBI) con su porcentaje de identidad.

Transcripto	Función Putativa	Blast	%ID
GSCH11426	Mn-Peroxidasa (MnP)	class II peroxidase ( <i>S. stellatus</i> SS14) (KIJ56377.1)	67
GSCH02196	Mn-Peroxidasa (MnP)	class II peroxidase ( <i>S. stellatus</i> SS14) (KIJ56820.1)	78
GSCH12559	Mn-Peroxidasa (MnP)	class II peroxidase ( <i>S. stellatus</i> SS14) (KIJ54990.1)	72
GSCH20121	Hemotiolato peroxidasa (HTP)	hypothetical protein ( <i>S. stellatus</i> SS14) (KIJ38036.1)	72
GSCH17853	Hemotiolato peroxidasa (HTP)	hypothetical protein ( <i>S. stellatus</i> SS14) (KIJ38036.1)	74
GSCH14274	Cloroperoxidasa (CIP)	hypothetical protein ( <i>S. stellatus</i> SS14) (KIJ49267.1)	70
GARG13192	Cloroperoxidasa (CIP)	hypothetical protein ( <i>S. stellatus</i> SS14) (KIJ56587.1)	60
GSCH13572	Peroxidasa decolorante de tintes (DyP)	hypothetical protein ( <i>S. stellatus</i> SS14) (KIJ33197.1)	57
GSCH14372	Peroxidasa decolorante de tintes (DyP)	hypothetical protein ( <i>S. stellatus</i> SS14) (KIJ38709.1)	65
GSCH19461	Peroxidasa decolorante de tintes (DyP)	hypothetical protein ( <i>S. stellatus</i> SS14) (KIJ46058.1)	67
GSCH19884	Peroxidasa decolorante de tintes (DyP)	hypothetical protein ( <i>S. stellatus</i> SS14) (KIJ38709.1)	65

**Tabla 2.3.18:** Peroxidasas de *G. schweinitzii*. ID: Identidad asignada a los transcritos. Actividad: función putativa asignada a la secuencia proteica codificada por cada transcritos, Blast: mejor resultado de la búsqueda contra la sección Protein de la base de datos non-redundant (NCBI) con su porcentaje de identidad.

#### 2.3.4.4. Superfamilia enzimática Peroxidasa-Peroxigenasa

La superfamilia Peroxidasa-Peroxigenasa es un grupo de enzimas filogenéticamente relacionadas con actividad peroxidasa y que además pueden transferir un átomo de oxígeno desde el peróxido de hidrógeno (Zámocký et al., 2015). Las enzimas más estudiadas de este grupo son la cloroperoxidasa (CfuCPO, EC 1.11.1.10) de *Caldariomyces fumago* y la peroxigenasa inespecífica (anteriormente conocida como peroxigenasa aromática, APO) de *Agrocybe aegerita* (Aa UPO, EC 1.11.2.1). Estas enzimas son de interés industrial debido a su versátil capacidad para catalizar reacciones de halogenación inespecífica, epoxilaciones e hidroxilaciones de compuestos orgánicos en condiciones ambientales (Hofrichter, 2006). En los transcriptomas de *G. argentinum* y *G. schweinitzii* se identificaron 1 y 2 transcritos de miembros candidatos de la superfamilia Peroxidasa-Peroxigenasa. Los transcritos GARG14226, GSCH20121 y GSCH17853 obtuvieron como mejor hit de Blast contra la sección protein de la base de datos non-redundant (NCBI) proteínas hipotéticas de *S.*



*stellatus* (Tabla 2.3.17 y 2.3.18). A su vez, en las búsquedas complementarias con la base de datos Uniprot se obtuvo como mejor hit a la peroxigenasa aromática (Aa UPO1) de *A. aegerita* con una identidad de entre 59-62%, por lo que fueron anotadas como tales. También se encontraron 2 transcritos, GSCH14274 y GARG13192 que codifican potencialmente para cloroperoxidasas siendo el mejor hit de Blast contra la base de datos Uniprot la cloroperoxidasa de *Caldaromyces fumago* (CfuCPO), pero con un porcentaje de identidad relativamente bajo con un 35 y 27% respectivamente. El análisis de los alineamientos confirma la identidad obtenida por las búsquedas en las bases de datos y muestra la presencia de los motivos conservados PCP (P28-C29-P30) y EGB (E123-G123-B124) involucrados en la unión al cofactor hemo, entre el que se encuentra el característico residuo cisteína (C29) que actúa como ligando distal (Figura 2.3.14, marcados en celeste). Por otro lado, también se encontraron los residuos R189 y E196 que interactúan con el cofactor hemo y forman el par ácido-base catalítico (Figura 2.3.14, marcados en gris) (Faiza et al., 2019).

```

GSCH17853      -----MAKFIAFLLLCTASCIAAFPQYQSLAGLSQRNVEDFISSVKYKTPPPPPGPKDTS  55
GSCH20121     MWNVRLPSISL LLLALSCTVQGLAPYHSLAGLSEREVDEFVNSVQYKRPPPPPGPLNDTS  60
GARG14229     MWNVKLVGL-FCCLGVASTVVAVAPYQSLAGLSQREIDEFVSSHNYKKPPPPPGPKDTS  59
GARG14226     -MGCTKFAA-LCLLTVVNTVIAISPYQSLAGLSQREVDEFKSFYTKPPPPPGPLNDTS  58
GARG14227     -MGCTKFAA-LCLLTVVNTVIAISPYQSLAGLSQREVDEFKSFYTKPPPPPGPLNDTS  58
                *      : .. * :***** :*:::* .* :* . ***** :***

GSCH17853     AKLVNDPHHPWKPLRKGDQRGPCPGLNTLASHGWLPRGTIATPAQIVDAVQEGFNMGNL  115
GSCH20121     AKNVNDHKHPWKPLRKNDMRGPCPGLNTLASHAWLPRNGIATPGEIVEAVQEGFNMGNL  120
GARG14229     AKLVNDPKHPWKPLKKGDIRGPCPGLNTLASHGWLARNGISTPGEIVEMVQEGFNMGNL  119
GARG14226     AKLVNDPKHPWKPLRHGDIRGPCPGLNTLASHGWLPRNGISTPGEIVEMVQEGFNMGNL  118
GARG14227     AKLVNDPKHPWKPLRHGDIRGPCPGLNTLASHGWLPRNGISTPGEIVEMVQEGFNMGNL  118
                ** *** :***** :.* ***** .** *.**:* .** : *****

GSCH17853     AVFVTYAAMLVDGNPITNLLSIGGKSKLTGPNPPKPAIVGGLDTHAVFEGDASMTRGDAF  175
GSCH20121     AVFVTYAAFLVDGNPITNLLSIGGKSKSTGPDPEPAIVGGLDTHAVFEGDASMTRADAF  180
GARG14229     AVFVTYAAFLVDGNPVTNLMSIGGKSKLTGPDPPKPAIVGGLNTHAVFEGDSSMTRADFF  179
GARG14226     AVFVTYAAFLVDGNPITNLMSIGEKSCLTGPDPKPAIVGGLNTHAVFEGDASMTRGDFF  178
GARG14227     AVFVTYAAFLVDGNPITNLMSIGEKSCLTGPDPKPAIVGGLNTHAVFEGDASMTRGDFF  178
                *****:*****:***:*** *** **:*:*****:*****:****.*

GSCH17853     FGDNHSFNETQFDEFVFSNRFGAGNYNLTVATEFRWQRIQESIATNPNFSFVSPRYFTA  235
GSCH20121     FGDNHSFNETQFDEFVAFSNQFGGGNYNLTVATEFRWQRIQEA IATNPNFSFISPRYFTA  240
GARG14229     FGDNHSFNETQFDEFMDFSNRFGGGNYNLTVATEFRWQRIQESIATNPNFSFISPRYFTA  239
GARG14226     FGDNHSFNETQFDEFVFSNRLGGGNYNLTVAAEFRWQRLQESIATNPNFSFISPRYFTA  238
GARG14227     FGDNHSFNETQFDEFVFSNRLGGGNYNLTVAAEFRWQRLQESIATNPNFSFISPRYFTA  238
                *****:*****:***:.* *****:*****:***:*****:****.*

GSCH17853     YAESTFPLFFFFVDGRNSDFELPMDVARSFFQKSLMPPNFHRANQSIGIDLVGEVMNFVFT  295
GSCH20121     YAESSFPLFFFFVDGRKADGQLPMDVARGFFQESKMPNFHRPNVSIGINLVGEAIGAIFA  300
GARG14229     YAESSFPLFFFFVDGRNFNGELSMDVARGFFQNSEMPAGFHRANQSIGIDLVGEAIGLIFA  299
GARG14226     YAESSFPLFFFFVDGRKADGQLPMDVARGFFQNSQMPPDFHRANQSIGSELLGGAIGAIFA  298
GARG14227     YAESSFPLFFFFVDGRNFNGELSMDVARGFFQNSEMPAGFHRANQSIGIDLVGEAIGLIFA  298
                ***:***:*****: : :* *****.***:* ** .*** * *** :** :. :*:

```

GSCH17853	PHPIEPGGNQGNVNTYTVDPSTADFTDFCKLYTNFVNVTVKGLYPNPTGTLRDALNANLD	355
GSCH20121	PHPIEPGGNQGVNNTYTLNPDSADFSDFCCKLYTDFVNIITVKGLYPNPTGVLKKNALNANLD	360
GARG14229	PHPIEPGGNQGKVNSTLDPNSADFNDFCCKLYTDFVNNTVKGLYPNPTGVLKKNALNANLD	359
GARG14226	AHP IQPGGNQGKINSYTPDPNSANFNSTCKLYSDFVNVTIKGLYPNPTGVLKDALNVNLD	358
GARG14227	PHPIEPGGNQGKVNSTLDPNSADFNDFCCKLYTDFVNNTVKGLYPNPTGVLKKNALNANLD	358
	***:*****:*.** :* **:*. ****:*** *:*****. *:***.***	
GSCH17853	YFYQPINASGCEQIFPYGKPM*	377
GSCH20121	YFYGPLNGSQCPQVFPYGKS*--	380
GARG14229	YFYGPISGPDPCPQVFPYGKS*--	379
GARG14226	YFYSPMNGSDCPQVFPYGKP*--	378
GARG14227	YFYGPISGPDPCPQVFPYGKS*--	378
	*** *:.. * *:*****	

**Figura 2.3.14:** Alineamientos de las secuencias traducidas de los transcritos pertenecientes a la superfamilia Peroxidasa-Peroxigenasa de *G. argentinum* y *G. schweinitzii*. Los residuos conservados involucrados en los sitios de unión a hemo se marcaron en color celeste y los correspondientes al par catalítico en gris. Los resultados del alineamiento se indicaron como “\*” perfecto, “:” sitio donde se exhibe una similitud fuerte), “.”sitio donde se muestra una similitud débil. El criterio para distinguir una similitud fuerte corresponde a un Score entre Aa correspondiente a la una matriz PAM250 mayor a 0,5 y débil, para un score menor o igual a 0,5.

### 2.3.5. Enzimas productoras de peróxido de hidrógeno

La degradación de los polímeros de la pared celular involucra una gran cantidad de reacciones de óxido-reducción que requieren de la presencia de compuestos dadores de electrones. Una de las reacciones más estudiadas es la oxidación de lignina por peroxidasas como la MnP, LiP y VP, las cuales usan como compuesto dador de electrones peróxido de hidrógeno. Este proceso no es el único que involucra reacciones oxidativas, un ejemplo es la reacción catalizada por las Monoxigenasas Líticas de Polisacáricos (LPMOs), las cuales pueden clivar las regiones cristalinas de los polisacáridos complejos mediante reacciones oxidativas dependientes de peróxido de hidrógeno y otros dadores de electrones (Bissaro et al., 2018). De esta manera, para la degradación de lignocelulosa deben expresarse enzimas productoras de peróxido de hidrógeno. Estas enzimas son clasificadas por CAZY como Actividades Auxiliares 3 (AA3) y pertenecen a la familia Glucosa-Metanol-Colina (GMC) oxidorreductasa. A su vez, las actividades enzimáticas representadas en esta familia se encuentran divididas en cinco subfamilias: celobiosa deshidrogenasa (AA3\_1; EC 1.1.99.18); glucosa-oxidasa (AA3\_2; EC 1.1.3.4); aril alcohol oxidasa (AA3\_2; EC 1.1.3.7); alcohol oxidasa (AA3\_3; EC 1.1.3.13); piranosa oxidasa (AA3\_4; EC 1.1.3.10) (Sützl et al., 2018). Debido a su rol en la degradación de lignina, las enzimas de la



familia AA3 se estudiaron principalmente en HCPBs y en menor profundidad en hongos descomponedores de hojarasca.

Las GMC oxidoreductasas de Basidiomycetes degradadores de hojarasca están poco caracterizadas y muy representadas en la base de datos non redundant (NCBI). Debido a esto y para tener una mejor aproximación a la identidad de los transcritos se utilizaron los resultados de las búsquedas en Swissprot. En los transcriptomas de *G. argentinum* y *G. schweinitzii* se encontraron 30 y 39 transcritos que codifican potenciales GCM-oxidoreductasas (Tabla 2.3.19 y 2.3.20) en todos los casos pertenecientes a la subfamilia AA3\_2, salvo por el transcripto GSCH11421 el cual codifica para una potencial Alcohol oxidasa de la subfamilia AA3\_3. Debido a los bajos niveles de similitud encontrados al comparar con las bases de datos, no fue posible asignarles una actividad putativa. La proteína codificada por GSCH11421 dio un 50% de similitud con la ya caracterizada alcohol oxidasa de *Komagataella phaffii* (*P. pastoris*) (AAB57850.1) y 80% de similitud con la enzima alcohol oxidasa de *Fomitiporia mediterranea* MF3/22. Para comprobar la identidad de la secuencia se realizaron alineamientos con secuencias de enzimas ya caracterizadas de hongos Ascomycetes: *K. phaffii* (AAB57850.1), *Passalora fulva* (AAF82788.1), *Ogataea methanolica* (AAF02494.1) y Basidiomycetes: *Gloeophyllum trabeum* (ABI14440.1), *Coprinopsis cinerea* (XP\_001838223.2) y *Moniliophthora perniciososa* (AFO55203.1) (Figura 2.3.15). El transcripto comparte con las secuencias de Basidiomycetes la ausencia de la secuencia de señalización para expresión en peroxisoma en su extremo C-terminal (peroxisomal targeting signal, PTS1) característica de Ascomycetes y en su lugar una secuencia de secreción particular de AOX de Basidiomycetes (de Oliveira et al., 2012).



**Figura 2.3.15:** Alineamiento de las regiones C terminal de las secuencias GSCH11421, MOX de *Coprinopsis cinerea* (XP\_001838223.2), *Gloeophyllum trabeum* (ABI14440.1), *Moniliophthora perniciososa* (AF055203.1), en donde se puede observar la región correspondiente a la secuencia de secreción característica de este tipo de enzimas y su ausencia en las secuencias de las enzimas pertenecientes a Ascomycetes *Komagataella phaffii* (AAB57850.1), *Passalora fulva* (AAF82788.1) y *Ogataea methanolica* (AAF02494.1).

El resto de los transcritos identificados como GMC oxidoreductasas pertenecientes a la familia AA3 fueron identificadas como de la subfamilia 2 aunque muestran un grado de identidad bajo respecto a los mejores hits de blast contra la base de datos Non-Redundant. A su vez, los resultados del Blast contra la base de datos Swissprot obtienen en todos los casos mejores hits con un porcentaje de identidad menor al 45%, salvo por el transcritor GARG10186, cuyo mejor resultado en la búsqueda fue la piranosa deshidrogenasa 1 (PHD1) de *Leucoagaricus melaegris* (AAW82996.1) con un 57% de similitud. La secuencia proteica predicha del transcritor GARG10186 se alineó con PDH1 y se verificó la presencia de residuos del sitio activo involucrados en la oxidación de monosacáridos como el par catalítico H512 e H556, el residuo Y510 y Q392 (Tan et al., 2013) por lo que se anotó como piranosa deshidrogenasa. Por otro lado, los transcritos GARG13603, GARG13601, GARG10186, GARG4990, GARG12489, GSCH19956, GSCH19957, GSCH07251 y GSCH03472, tienen un nivel de homología de entre 36-40% a PDHs pero no muestran gran parte de los residuos potencialmente involucrados en el sitio activo, por lo que no se pudo asegurar la identidad de los transcritos y se los anotó como GMC-oxidoreductasas.

Los transcritos GSCH18565, GARG12516 y GARG5071 son los que muestran mayor % de similitud a las enzimas glucosa oxidasa (GOX) ( $\approx 32\%$ ) de *Penicillium amagasakiense*, pero ninguna de las secuencias tiene todos los aminoácidos del sitio activo que interaccionan con los sustratos, siendo la más aproximada GSCH18565 que comparte los residuos Y73 (Y66), F418 (F413), W430 (W429), H520 (H516) e H563 (H565). Es de notar que no encontramos los residuos R516 y D518, siendo este último clave en la actividad enzimática (Susanne et al., 2000).

ID	Función Putativa	Blast	%ID	S.Secretión	T. Completo
GARG12489	GMC o.	Pyranose dehydrogenase 3 ( <i>Leucoagaricus meleagris</i> ) (Q0R4L2.1)	36,23	Si	Si
GARG11139	GMC o.	Pyranose dehydrogenase 1 ( <i>L. meleagris</i> ) (Q3L245.1)	45,858	No	Si
GARG16394	GMC o.	Pyranose dehydrogenase ( <i>Agaricus campestris</i> ) (V5NDL4.1)	37,134	No	No
GARG4990	GMC o.	Pyranose dehydrogenase 1 ( <i>L. meleagris</i> ) (Q3L245.1)	38,907	Si	Si
GARG10186	Piranosas dehidrogenasa	Pyranose dehydrogenase 1 ( <i>L. meleagris</i> ) (Q3L245.1)	57,956	No	Si
GARG13597	GMC o.	Pyranose dehydrogenase ( <i>Agaricus xanthodermus</i> ) (V5NC32.1)	38,852	No	Si
GARG13601	GMC o.	Pyranose dehydrogenase ( <i>A. bisporus</i> ) (Q3L1D1.1)	40,684	No	Si
GARG13603	GMC o.	Pyranose dehydrogenase ( <i>A. bisporus</i> ) (Q3L1D1.1)	40,488	Si	Si
GARG13604	GMC o.	Pyranose dehydrogenase 3 ( <i>L. meleagris</i> ) (Q0R4L2.1)	43,82	No	No
GARG15447	GMC o.	Alcohol dehydrogenase ( <i>Monascus purpureus</i> ) (A0A142PTM2.1)	34,711	No	Si
GARG17644	GMC o.	Pyranose dehydrogenase ( <i>A. xanthodermus</i> ) (V5NC32.1)	38,438	No	No
GARG3405	GMC o.	Alcohol dehydrogenase ( <i>Aspergillus parasiticus</i> ) (Q12062.1)	30,899	No	Si
GARG11592	GMC o.	Pyranose dehydrogenase ( <i>A. xanthodermus</i> ) (V5NC32.1)	38,372	No	No
GARG10337	GMC o.	L-sorbose 1-dehydrogenase ( <i>L. meleagris</i> ) (Q0R4L2.1)	33,533	No	No
GARG14168	GMC o.	Versicolorin B synthase ( <i>M. purpureus</i> ) (A0A142PTM2.1)	33,445	No	Si
GARG9757	GMC o.	Pyranose dehydrogenase 2 ( <i>M. purpureus</i> ) (A0A142PTM2.1)	31,018	Si	Si
GARG9758	GMC o.	Pyranose dehydrogenase 2 ( <i>M. purpureus</i> ) (A0A142PTM2.1)	31,018	Si	Si
GARG9689	GMC o.	Pyranose dehydrogenase 1 ( <i>L. meleagris</i> ) (Q3L245.1)	45,96	No	No
GARG9690	GMC o.	Pyranose dehydrogenase 1 ( <i>L. meleagris</i> ) (Q3L245.1)	38,328	No	No
GARG20419	GMC o.	Pyranose dehydrogenase ( <i>A. xanthodermus</i> ) (V5NC32.1)	37,069	No	No
GARG12888	GMC o.	L-sorbose 1-dehydrogenase ( <i>A. parasiticus</i> ) (Q12062.1)	29,542	No	Si
GARG12889	GMC o.	L-sorbose 1-dehydrogenase ( <i>A. parasiticus</i> ) (Q12062.1)	30,169	No	Si
GARG19679	GMC o.	Alcohol dehydrogenase ( <i>Aspergillus clavatus</i> ) (A1CFL2.1)	29,01	No	No
GARG10088	GMC o.	Versicolorin B synthase ( <i>M. purpureus</i> ) (A0A142PTM2.1)	23,121	No	No
GARG12516	GMC o.	Glucose oxidase ( <i>Penicillium amagasakiense</i> ) (P81156.1)	32,893	Si	Si
GARG5071	GMC o.	Glucose oxidase ( <i>A. nidulans</i> ) (Q5AUN2.1)	30,87	No	Si
GARG2616	GMC o.	Glucose oxidase ( <i>Talaromyces flavus</i> ) (Q92452.1)	34,595	No	Si

**Tabla 2.3.19:** Glucosa-Metanol-Colina oxidorreductasas de *G. argentinum*. ID: Identidad asignada a los transcritos. Actividad: función putativa asignada a la secuencia proteica codificada por cada transcritos, Blast: mejor resultado de la búsqueda contra la sección Protein de la base de datos non-redundant (NCBI) con su porcentaje de identidad.

ID	Función Putativa	Blast	%ID	S. DE secreción	T. Completo
GSCH02232	GMC o.	Dehydrogenase xptC ( <i>A. nidulans</i> ) (Q5AUN2.1)	30,915	Si	Si
GSCH18565	GMC o.	Glucose oxidase ( <i>P. amagasakiense</i> ) (P81156.1)	32,66	Si	Si
GSCH24423	GMC o.	Dehydrogenase patE ( <i>A. clavatus</i> ) (A1CFL2.1)	29,64	Si	Si
GSCH21134	GMC o.	Pyranose dehydrogenase 1 ( <i>L. meleagris</i> ) (Q3L245.1)	32,554	Si	Si
GSCH19956	GMC o.	Pyranose dehydrogenase 1 ( <i>L. meleagris</i> ) (Q3L245.1)	39,165	Si	Si
GSCH03472	GMC o.	Pyranose dehydrogenase 1 ( <i>L. meleagris</i> ) (Q3L245.1)	38,068	Si	Si
GSCH12579	GMC o.	Pyranose dehydrogenase 1 ( <i>L. meleagris</i> ) (Q3L245.1)	41,047	Si	Si
GSCH07251	GMC o.	Pyranose dehydrogenase 3 ( <i>L. meleagris</i> ) (Q0R4L2.1)	42,691	Si	Si
GSCH16337	GMC o.	Dehydrogenase mpl7 ( <i>M. purpureus</i> ) (A0A142PTM2.1)	32,138	Si	Si
GSCH11421	Alcohol oxidasa	Alcohol oxidase 1 ( <i>Komagataella phaffii</i> ) (F2QY27.1)	50,779	Si	Si
GSCH12971	GMC o.	Alcohol oxidase ( <i>Candida boidinii</i> ) (Q00922.1)	37,91	Si	Si
GSCH07251	GMC o.	Pyranose dehydrogenase 3 ( <i>L. meleagris</i> ) (Q0R4L2.1)	42,691	Si	Si
GSCH23829	GMC o.	Pyranose dehydrogenase 3 ( <i>L. meleagris</i> ) (Q0R4L2.1)	37,374	Si	Si
GSCH02711	GMC o.	Dehydrogenase xptC ( <i>A. nidulans</i> ) (Q5AUN2.1)	35,192	Si	Si
GSCH24493	GMC o.	Pyranose dehydrogenase ( <i>A. campestris</i> ) (V5NDL4.1)	33,439	No	Si
GSCH05922	GMC o.	Cellobiose dehydrogenase ( <i>P. chrysosporium</i> ) (Q01738.1)	68,421	No	No
GSCH16609	GMC o.	Dehydrogenase mpl7 ( <i>M. purpureus</i> ) (A0A142PTM2.1)	37,5	No	Si
GSCH08280	GMC o.	Dehydrogenase mpl7 ( <i>M. purpureus</i> ) (A0A142PTM2.1)	34,722	Si	Si
GSCH02468	GMC o.	Dehydrogenase mpl7 ( <i>M. purpureus</i> ) (A0A142PTM2.1)	33,516	No	No
GSCH01532	GMC o.	Pyranose dehydrogenase 3 ( <i>L. meleagris</i> ) (Q0R4L2.1)	32,258	No	Si
GSCH01997	GMC o.	Dehydrogenase mpl7 ( <i>M. purpureus</i> ) (A0A142PTM2.1)	31,672	No	No
GSCH23549	GMC o.	Pyranose dehydrogenase ( <i>A. campestris</i> ) (Q3L1D1.1)	43,678	No	No
GSCH03884	GMC o.	Glucose oxidase ( <i>P. amagasakiense</i> ) (P81156.1)	36,07	No	No
GSCH13373	GMC o.	Glucose oxidase ( <i>P. amagasakiense</i> ) (P81156.1)	37,619	No	No
GSCH12659	GMC o.	Pyranose dehydrogenase 1 ( <i>L. meleagris</i> ) (Q3L245.1)	50	No	No
GSCH21135	GMC o.	Dehydrogenase mpl7 ( <i>M. purpureus</i> ) (A0A142PTM2.1)	31,338	No	Si
GSCH24308	GMC o.	Pyranose dehydrogenase 1 ( <i>L. meleagris</i> ) (Q3L245.1)	38,528	No	No
GSCH19957	GMC o.	Pyranose dehydrogenase 1 ( <i>L. meleagris</i> ) (Q3L245.1)	39,165	Si	Si

<b>GSCH23593</b>	GMC o.	Pyranose dehydrogenase 3 ( <i>L. meleagris</i> ) (Q0R4L2.1)	47,059	No	No
<b>GSCH07560</b>	GMC o.	Pyranose dehydrogenase ( <i>A. campestris</i> ) (V5NDL4.1)	41,727	No	No
<b>GSCH03848</b>	GMC o.	Pyranose dehydrogenase ( <i>A. campestris</i> ) (V5NDL4.1)	41,346	No	No
<b>GSCH02232</b>	GMC o.	Pyranose dehydrogenase ( <i>A. campestris</i> ) (Q3L1D1.1)	32,45	No	No
<b>GSCH10786</b>	GMC o.	Pyranose dehydrogenase 3 ( <i>L. meleagris</i> ) (Q0R4L2.1)	36,694	No	No
<b>GSCH16338</b>	GMC o.	Dehydrogenase mpl7 ( <i>M. purpureus</i> ) (A0A142PTM2.1)	34,45	No	Si
<b>GSCH01708</b>	GMC o.	Dehydrogenase mpl7 ( <i>M. purpureus</i> ) (A0A142PTM2.1)	46,386	No	No
<b>GSCH21362</b>	GMC o.	Pyranose dehydrogenase ( <i>A. campestris</i> ) (Q3L1D1.1)	40,678	No	Si
<b>GSCH23880</b>	GMC o.	Pyranose dehydrogenase 1 ( <i>L. meleagris</i> ) (Q3L245.1)	56,225	No	No
<b>GSCH03868</b>	GMC o.	Pyranose dehydrogenase 1 ( <i>L. meleagris</i> ) (Q3L245.1)	50,376	Si	No
<b>GSCH14942</b>	GMC o.	Pyranose dehydrogenase 1 ( <i>L. meleagris</i> ) (Q3L245.1)	47,321	No	No

**Tabla 2.3.20:** Glucosa-Metanol-Colina oxidorreductasas de *G. schweinitzii*. Id: identidad asignada a los transcritos. Actividad: función putativa asignada a la secuencia proteica codificada por cada transcritos, blast: mejor resultado de la búsqueda contra la sección protein de la base de datos non-redundant (NCBI) con su porcentaje de identidad.

## 2.4. Discusión

Las especies del género *Geastrum* son ampliamente conocidas por crecer y formar basidiomas en suelos de pH neutro/alcalino (Sunhede, 1989), siendo esta característica restrictiva para el crecimiento de algunas especies (Olsson et al., 2010). Debido a esto, se postuló como hipótesis que las actividades enzimáticas relacionadas con la degradación de sustratos lignocelulósicos y en particular las enzimas modificadoras de lignina, podrían expresarse a pHs cercanos al neutro. Las tres especies evaluadas en esta tesis mostraron capacidad de crecer a pH ligeramente ácido o neutro (con excepción de *G. argentinum* que sólo creció a pH 6), mientras que *G. schweinitzii*, también fue capaz de crecer a pH 8. A su vez, los organismos no modificaron el pH del medio durante la incubación, lo que podría indicar algún tipo de adaptación fisiológica. Esto es contrario a lo reportado por Sunhede (1989) quien observó que en suelos calcáreos colonizados por especies de *Geastrum*, en zonas cercanas al micelio el pH disminuyó aproximadamente 2 unidades. Por otro lado, las cepas de *Geastrum* utilizadas en esta tesis produjeron actividad ligninolítica en los medios a pH cercano a neutro. Aun así, no fue detectable la actividad lacasa o peroxidasa al realizar las determinaciones a pHs neutro/alcalino. Esta observación podría indicar que la regulación del pH del ambiente podría permitir la actividad de las enzimas en entornos con pHs cercanos al neutro. Aún así, no es posible asegurar que las cepas no produzcan ligninasas activas a pHs mayores en la naturaleza.

Una de las mayores dificultades para el estudio del género *Geastrum*, es su baja velocidad de crecimiento *in vitro*. En este trabajo se analizaron diferentes condiciones con el fin de generar biomasa para poder realizar estudios de expresión enzimática y de análisis transcriptómico. El ensayo de crecimiento de tres especies distintas de *Geastrum*, mostró diferentes comportamientos para cada una. En particular, *G. argentinum*, una cepa nativa de nuestro país colectada creciendo en un tocón de *Ligustrum lucidum* en la zona sur del Gran Buenos Aires

(Lavallo, Partido Lomas de Zamora), mostró tasas de crecimiento superiores a las de las otras dos especies estudiadas: *G. schweinitzii* y *G. triplex*.

Debido a que no existen registros previos a los generados en esta tesis respecto al cultivo en SSF de especies de *Geastrum*, se utilizaron sustratos que previamente demostraron ser adecuados para el cultivo y producción de enzimas ligninolíticas por otros HCPBs. La SSF de semillas de avena indujo la producción de actividad lacasa y peroxidasa en 16 cepas de hongos ligninolíticos (Rodríguez et al., 1999). A su vez, este tipo de sustrato es frecuentemente utilizado como fuente de inóculo para la producción de hongos comestibles, siendo una fuente rica en nutrientes (Zied et al., 2017). Tanto la cascarilla de soja como la paja de trigo se utilizaron como sustrato para el crecimiento de hongos degradadores de madera e indujeron la producción de enzimas celulolíticas (Brijwani et al., 2010) y ligninolíticas (D'Agostini et al., 2011; Salvachúa et al., 2013). A pesar de esto, no se detectó crecimiento de *G. argentinum* y *G. triplex* en paja de trigo, como tampoco de *G. schweinitzii* en avena, lo que indica diferencias en el metabolismo de las tres especies. El crecimiento de las tres especies fue muy lento respecto a otros Basidiomycetes lignocelulolíticos que a escala de laboratorio colonizan en aprox. 10-15 días estos sustratos (D'Agostini et al., 2011; Moreaux, 2017). En cambio, los cultivos de *Geastrum* no llegaron a colonizar completamente el sustrato luego de 45 días de incubación. A pesar de esto se obtuvo biomasa suficiente para realizar extracciones de ARN para su secuenciación y en los extractos acuosos se pudieron valorar diferentes actividades enzimáticas. Se determinaron las actividades: lacasa, peroxidasa, endoglucanasa, exoglucanasa,  $\beta$ -glucosidasa y amilasa. En los tres hongos se detectó producción de endo y exoglucanasas, aunque con diferencias significativas entre cepas. Por otro lado, *G. argentinum* se destacó por su producción de  $\beta$ -glucosidasa en todos los sustratos. Esta diferencia metabólica, que le facilitaría el acceso a azúcares libres, justificaría su mayor velocidad de crecimiento en medios agarizados. La batería enzimática ligninolítica parece diferir entre las tres especies: *G. triplex* produjo los mayores títulos de lacasa en todos los medios pero no reveló actividad peroxidasa. Por el contrario, se detectó actividad peroxidasa total en los cultivos

de *G. argentinum* y *G. schweinitzii*. Dado que se encontró un perfil de actividades similar en los sustratos evaluados y que en la SSF utilizando cascarilla de soja se detectó mayor crecimiento de las 3 especies, se seleccionaron estos cultivos para la secuenciación de los transcriptomas.

La secuenciación y anotación de los transcriptomas de *G. argentinum* y *G. schweinitzii* crecidos en cascarilla de soja, permitió obtener información sobre el perfil de transcriptos expresados por estas especies, para las cuales no había información previa en ninguna base de datos. Para ambos transcriptomas se obtuvo una buena cobertura de las secuencias, las cuales luego de la anotación dieron 14.412 y 12.144 transcriptos únicos en *G. argentinum* y *G. schweinitzii*, respectivamente. La comparación de estas secuencias con las reportadas en genbank (NCBI), mostró una alta similitud con *S. stellatus* seguido de *Leucoagaricus* sp. SymC.cos y *P. croceum* F 1598. Este resultado es coherente con la proximidad de las especies, siendo *S. stellatus* la única especie del orden Geastrales (Hosaka et al., 2006) representada en GenBank y el resto especies asociadas a la degradación de lignocelulosa.

Los transcriptomas de *G. argentinum* y *G. schweinitzii* se encuentran altamente representados en secuencias codificantes de enzimas celulolíticas. Entre los transcriptos se encontraron los codificantes de celobiohidrolasas (exoglucanasas) de las familias GH6 y GH7 representadas con 3 transcriptos en *G. argentinum* y *G. schweinitzii*. La cantidad de isoenzimas reportadas de GH6 y GH7 es comparable con la reportada en los genomas de *Agaricus bisporus* (Morin et al., 2012) y *Galerina marginata* (Nagendran et al., 2009), ambos hongos degradadores de hojarasca, indicando que el crecimiento en cascarilla de soja podría estar induciendo la expresión de todas las isoenzimas codificadas por *G. schweinitzii* y *G. argentinum*. En el caso de *Gymnopus androseaceus* su genoma contiene un único gen de GH6, el cual se expresa durante los primeros estadios de la degradación de hojarasca (Barbi et al., 2019). En ambos transcriptomas se expresaron transcriptos codificantes de enzimas pertenecientes a familias que degradan la celulosa por mecanismos oxidativos como las monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMO) de la familia AA9 y celobiosa dehidrogenasa (CDH) de la



familia AA3\_1. La presencia de estas familias podría estar relacionada con estadios tempranos de degradación de celulosa (Barbi et al., 2019), siendo congruente con la velocidad de crecimiento de las cepas.

Respecto de la degradación de la hemicelulosa, ésta depende principalmente de la composición de la cadena central, siendo las actividades enzimáticas involucradas específicas de los diferentes tipos de hemicelulosa (Rytioja et al., 2014). La hemicelulosa de la cascarilla de soja está formada por una cadena principal compuesta mayoritariamente por xilano y pequeñas cantidades de galactonanos. Por otro lado, sus ramificaciones están compuestas por ácido urónico, arabinosa y galactosa (Gaillard, 1965; Aspinall et al., 1966). Sin embargo, en los transcriptomas de ambas especies de *Geastrum* estuvieron representadas todas las actividades enzimáticas que pueden actuar en la degradación de hemicelulosa, incluyendo varias enzimas accesorias como esterasas de ácido ferúlico,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa y acetilxilano esterasa. Otras enzimas relacionadas con la degradación de hemicelulosa son las  $\alpha$ -glucuronidasas (EC 3.2.1.139). Estas actúan cortando las uniones  $\alpha$ -1,2-glicosídicas entre las unidades de ácido 4-O-metil-D-glucurónico y la xilosa en  $\beta$ -1,4-xilooligómeros cortos, como parte de la batería de enzimas que actúan en la hemicelulosa (Shallom et al., 2004) y se encuentran representadas por CAZY en las familias enzimáticas GH67 y GH115. La familia de  $\alpha$ -glucuronidasas GH67 es considerada como un posible marcador phylum-específico de Ascomycetes (Zhao et al., 2014). En esta tesis se confirmó por primera vez la presencia de estas enzimas en Basidiomycetes mediante la búsqueda por homología en bases de datos de proteínas caracterizadas obteniendo *matches* con alto porcentaje de similitud; el alineamiento con las mismas e identificación de potenciales aminoácidos claves de sitios activos; y el agrupamiento de las secuencias proteicas predichas mediante análisis filogenéticos con GH67 de Ascomycetes. Estos resultados conducirían a replantear el uso de esta familia enzimática como marcador de Ascomycetes.

La representación de genes de enzimas pectinolíticas en Basidiomycetes es relativamente variable. Sólo unas pocas han sido estudiadas y caracterizadas

bioquímicamente, mayoritariamente en especies de *Aspergillus* (Rytioja et al., 2014). Una de las familias consideradas relevantes en la degradación de pectina son las Endo- y Exo- ramnogalacturonasas (GH28), de las cuales en los transcriptomas de ambas especies sólo encontramos 4 y 7 isoenzimas para *G. argentinum* y *G. schweinitzii*, respectivamente. Estas enzimas actúan en la cadena principal de la pectina y están altamente representadas en los genomas de hongos fitopatógenos como *Chondrostereum purpureum* (Williams et al., 2002; Reina, et al., 2019). Por otra parte no se identificaron transcritos que codifiquen ramnogalacturonano liasas (PL4 and PL11), a pesar de que el componente mayoritario de la pectina de la soja es el ramnogalacturonano I. Tampoco se registró un aumento en las actividades degradadoras de ramnogalacturano cuando se cultivó a *Aspergillus nidulans*, *Giberella zeae* y *Podospora anserina* en medio con pectina de soja como única fuente de carbono, a pesar de que estas enzimas estaban codificadas en su genoma (Benoit et al., 2012), por lo que no puede descartarse la presencia de genes codificantes de estas enzimas en *Geastrum*.

### **3.4.1. Enzimas modificadoras de la lignina**

#### **3.4.1.1. Oxidasas multicobre**

La presencia de fenoloxidasas en *Geastrum* fue documentada varias veces sobre basidiomas, siendo éste un caracter utilizado para su identificación (Sunhede, 1989; Zamora et al., 2013), como también así en ensayos semicuantitativos en medios agarizados (Kuhar et al., 2016). En los transcriptomas de *G. argentinum* y *G. schweinitzii* se encontraron respectivamente 15 y 17 transcritos correspondientes a oxidasas multicobre aunque sólo en 2 de los transcritos de *G. argentinum* y 6 de los de *G. schweinitzii* se identificaron las secuencias “signature” de lacasas (Kumar et al., 2003). Los genes de este grupo de enzimas se presentan en los genomas de Basidiomycetes en múltiples copias. En particular, en los genomas de hongos degradadores de hojarasca como *C.*

*cinerea* o *A. bisporus*, se detectaron 17 y 11 genes codificantes de lacasas, respectivamente (Stajich et al., 2010; Morin et al., 2012). Las lacasas fúngicas contienen regiones regulatorias que pueden modificar su expresión y el perfil isoenzimático según las condiciones de crecimiento (Piscitelli et al., 2011). Es posible que los transcriptos detectados en las condiciones ensayadas en este trabajo correspondan sólo a una parte de los genes codificantes de lacasa presentes en su genoma. Las predicciones *in silico* de las propiedades de las enzimas coincidieron con las reportadas previamente para las lacasas fúngicas, cuyo punto isoeléctrico se encuentra entre 4.0-6.0 y peso molecular entre 60-70 kDa (Baldrian, 2006; Senthivelan et al., 2016). El análisis de las secuencias primarias indica que las lacasas expresadas en *G. argentinum* y *G. schweinitzii*, muestran la presencia de un residuo leucina en sitio catalítico axial el cual es importante ya se piensa que podría inferir en el potencial de óxido-reducción del centro T1. La presencia de este aminoácido se asociaría con un potencial de oxidación intermedio de entre +500 mV y +700 mV vs SHE, como se reportó en otras enzimas con residuos catalíticos axiales L (Hall et al., 1999; Xu et al., 1999; Garavaglia et al., 2004), a diferencia de las enzimas con alto potencial (+700mV a +800 mV vs SHE) que muestran F como residuo axial. En los transcriptos también se observó variabilidad dentro de la región L2, pero en los residuos C y L del consenso QYCDGL. En esta, al igual que en otras lacasas de Ascomycetes, los residuos se vieron reemplazados con I y V en ambos casos (Cázares-García et al., 2013), aunque se desconoce si estos cambios podrían ejercer modificaciones en la actividad de las enzimas.

### **3.4.1.2. Peroxidasas**

Las peroxidasas (EC 1.11.x) cumplen un rol central en la degradación enzimática de la lignina. Estas enzimas catalizan la oxidación de la lignina utilizando como compuestos dadores de electrones peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) o hidroperóxidos orgánicos (ROOH). Las peroxidasas fúngicas más estudiadas involucradas con la degradación de lignocelulosa pertenecen a la familia de

peroxidasas tipo II: Lignin Peroxidasa (LiP, EC 1.11.1.14), Mn-Peroxidasa (MnP, EC 1.11.1.13) y Versátil Peroxidasa (VP, EC 1.11.1.16). En los transcriptomas de *G. argentinum* y *G. schweinitzii* se encontraron 4 y 3 transcriptos respectivamente, correspondientes a peroxidasas tipo II, los cuales fueron anotados como codificantes de MnP. La ausencia de LiP y VP es coincidente con las actividades encontradas en microcosmos en otros hongos de hojarasca (Steffen et al., 2002; Valášková et al., 2017), como también en transcriptomas de muestras ambientales de hojarasca (Kellner et al., 2014). La ausencia de estas enzimas también se refleja en genomas de Basidiomycetes degradadores de hojarasca como *G. androsaceus* (Barbi et al., 2019), *A. bisporus* (Morin et al., 2012), *C. cinerea* (Stajich et al., 2010) y *Volvariella volvacea* (Bao et al., 2013).

La identidad de las secuencias se confirmó reproduciendo la filogenia de peroxidasas tipo II realizada por Lundell et al. (2010) con el agregado de las secuencias encontradas en ambos transcriptomas. El resultado de este análisis nos muestra que parte de las secuencias forman un grupo cercano al grupo B y otras dentro del grupo A.2. El grupo B se compone por las MnPs clásicas (también llamadas “largas”) las cuales requieren de la oxidación de  $Mn^{2+}$  para alcanzar otros sustratos. Estas son características de hongos con gran capacidad de degradación de lignocelulosa como *P. chrysosporium*. Es probable que las peroxidasas encontradas en los transcriptomas estén relacionadas con este grupo, pero no tengan la misma capacidad catalítica. De forma análoga, Kellner et al. (2014) reprodujeron los análisis filogenéticos realizados por Lundell et al. (2010) para evaluar la identidad de secuencias peroxidasas tipo II obtenidas durante la degradación de diferentes hojarascas en el ambiente. En este trabajo detectaron un grupo de secuencias cercanas a LiP (A1), que denominaron “untypical LiP” debido a que no contienen como residuo catalítico el característico W171. Por otro lado, el grupo A.2 agrupa a un subgrupo de las MnPs determinadas como “MnPs cortas” o “shMnPs”. Este subgrupo se caracteriza no sólo por tener un extremo C terminal más corto, sino también por ser capaz de oxidar en ausencia de  $Mn^{2+}$ , sustratos como fenoles, colorantes y lignina (Hilden et al., 2005).

En los transcriptomas de *Geastrum* se encontraron además 4 y 3 transcriptos en *G. argentinum* y *G. schweinitzii*, respectivamente, correspondientes a Peroxidasas Decolorantes de Tintes (DyP). Estas enzimas se estudiaron en menor medida que las peroxidasas tipo II, pero se considera que pueden tener un rol importante en la degradación de lignina en Basidiomycetes debido a que son capaces de oxidar compuestos aromáticos y colorantes antraquinónicos. En las secuencias de los transcriptos se encontraron todos los aminoácidos conservados en estas enzimas. Por otro lado, considerando que el nivel de homología de la estructura primaria de las subclasificaciones de DyPs es baja (hasta 7% de ID) y que, las secuencias de las proteínas de DyPs comparten un % ID > 40% con DyP clase "V", se las consideró potencialmente pertenecientes a este grupo (Yoshida & Sugano, 2015). La presencia de DyPs fue confirmada en muestras de suelo, pero debido a que no se obtuvieron secuencias completas de las mismas no fue posible su clasificación (Kellner et al., 2014). Esto se evidencia en los genomas disponibles de otros hongos degradadores de hojarasca como *C. cinerea*, *Amanita thiersii* (De Mares et al., 2015) y *V. volvacea* (Bao et al., 2013) los cuales contienen entre 1-3 genes de estas enzimas. No existen reportes de DyPs pertenecientes a otra clase en Basidiomycetes (revisado en Redoxibase 02/2020).

Se detectó actividad DyP en *Agrocybe* y *Auricularia auricula-judae* (Liers et al., 2010) y en los hongos degradadores de hojarasca *Mycena haematopus* y *Stropharia rugosoannulata* (Liers et al., 2011). Su función es aún desconocida, pero dado el amplio rango de sustratos sobre los que actúa, podría intervenir no sólo en la conversión de lignocelulosa, sino también en la degradación de compuestos tóxicos. Por otro lado, estas enzimas se encuentran en organismos que no poseen LiP o VP, por lo que se considera que podrían reemplazarlas y actuar de forma sinérgica con las MnPs, siendo parte de un sistema alternativo de oxidación de sustratos de alto potencial redox (Liers et al., 2013). Este sistema podría estar presente en hongos degradadores de hojarasca como los estudiados en esta tesis, debido a la evidencia de su expresión conjunta en los transcriptomas.

Por último, se encontraron transcriptos de enzimas pertenecientes a la superfamilia Peroxidasa-Peroxigenasa. Estos transcriptos se encuentran clasificados como Hemotiolato Peroxidasas (HTPs), siendo 3 y 2 peroxigenasas inespecíficas (UPOs) y 1 cloroperoxidasa para *G. argentinum* y *G. schweinitzii*. Aún se desconoce la función de estas enzimas, pero podría estar relacionada con la degradación de residuos de lignina debido a que se las detectó en hojarasca en proceso de degradación en una gran variedad de suelos (Kellner et al., 2014). Por otro lado, en el genoma de *A. bisporus* se descubrió una expansión en el número de genes de HTP, alcanzando el máximo encontrado en genomas fúngicos (24 genes) (Morin et al., 2012). Esta expansión podría indicar una adaptación de nicho para la especie, que dado el gran número de sustratos determinados para esta familia de enzimas (cerca de 300) (Molina-Espeja et al., 2017), podría estar fisiológicamente relacionada con la degradación de compuestos húmicos (Morin et al., 2012).

### **3.4.1.3. Enzimas productoras de peróxido de hidrógeno**

Las enzimas productoras de peróxido de hidrógeno fueron ampliamente estudiadas en el metabolismo de los HCPBs. Estas enzimas se expresan durante el proceso de degradación de lignina y proveen a las peroxidasas de su compuesto dador de electrones, el peróxido de hidrógeno (Sültz et al., 2018). En los hongos degradadores de hojarasca, este grupo de enzimas se encuentran menos estudiadas. Los transcriptomas analizados en esta tesis revelaron la presencia de una amplia batería de enzimas pertenecientes a la superfamilia GCM-oxidoreductasas, de las cuales sólo un pequeño porcentaje pudo ser anotado en sus familias. La mayor parte de estos transcriptos obtuvieron como mejor resultado de búsqueda en Non Redundant a enzimas de Piranosa-Dehidrogenasa (PDH) pero con un bajo %ID (< 45%). Sólo fue posible anotar como tal al transcripto GARG10186 ya que en alineamientos con PDH1 de *Lycoperdon melaegris* se encontraron aminoácidos claves correspondientes al

sitio activo de la enzima (Graf et al., 2017). Se cree que la distribución de PDH se encuentra restringida a hongos degradadores de hojarasca de *Agaricaceae* y *Lycoperdaceae*, siendo posible que su función principal esté asociada a la reducción de quinonas y radicales formados durante la degradación de lignina o el ataque por otros microorganismos (Volc et al., 2001; Sultz et al., 2018).

Entre los transcriptos identificados se encontró uno correspondiente a una potencial Alcohol Oxidasa (AOx) en el transcriptoma de *G. schweinitzii* (GSCH11421). Este transcripto mostró 50% ID con la AOx de *K. phaffii* (*P. pastoris*) (Valli et al., 2016) y 80% con la AOx de *F. mediterranea*, como también la secuencia señal de exportación característica del tipo enzimático. A estas proteínas se le asignan distintas funciones. En el hongo patógeno del cacao *M. pernicioso*, se asocia la acción de la enzima a la capacidad del fitopatógeno para invadir las células vegetales degradando la laminilla media. Durante el proceso de degradación se expresan enzimas con actividad pectin metil esterasa que actúan en la pectina de la laminilla media liberando metanol que luego queda disponible para ser utilizado por las AOx obteniendo como producto de oxidación formaldehído y peróxido de hidrógeno (de Oliveira et al., 2012). Por otro lado, la AOx del hongo de pudrición castaña *G. trabeum*, se detectó en medio extracelular y caracterizó durante el proceso de degradación de lignina y se la postula como productora de peróxido de hidrógeno para la oxidación de lignina mediante una reacción de tipo Fenton (Daniel et al., 2007).

Los transcriptomas de ambas especies de *Geastrum* revelaron un bajo número de isoenzimas por familia de enzimas activas sobre carbohidratos. A pesar de esto y considerando que los transcriptomas revelan únicamente los genes expresados en la situación evaluada, podríamos considerar que ambas especies tienen el potencial de degradar todos los componentes de la pared celular vegetal. Por otro lado, al ser los transcriptomas únicamente cualitativos, se desconocen los niveles de expresión génica. A pesar de detectarse una baja cantidad de isoenzimas la expresión de alguna de las isoformas podría ser suficiente para garantizar el proceso de degradación. Los genomas fúngicos muestran un alto número de isoenzimas para la mayoría de las familias

enzimáticas, siendo probable que la regulación de su expresión determine su capacidad metabólica y función ecológica, independientemente del número de isoenzimas (Baldrian & López-Mondéjar, 2014; Barbi et al., 2019). A pesar de esto, estudios ecológicos indican que la abundancia de genes es un buen predictor de los roles ecológicos de las especies (Talbot et al., 2015), aunque se desconoce aún cuáles de ellos y en qué cantidad, se asociarían con hongos degradadores de hojarasca.



## 2.5. Conclusiones

1. Se logró cultivar tres especies del género *Geastrum*, cuyo cultivo *in vitro* es dificultoso.
2. Los resultados de esta tesis constituyen el primer reporte de secuenciación masiva en especies del género *Geastrum*, aportando información que puede facilitar futuros estudios de genómica, transcriptómica, proteómica y genética.
3. La secuenciación de los transcriptomas de *G. argentinum* y *G. schweinitzii* crecidos en SSF en un sustrato lignocelulósico permitió la anotación de más de 450 enzimas activas sobre carbohidratos y enzimas auxiliares de la degradación de lignocelulosa con potencial biotecnológico.
4. Entre las familias de enzimas con actividad hemicelulasa se encontraron por primera vez en Basidiomycetes, transcriptos de GH67, por lo cual no podría utilizarse esta enzima como indicadora de Ascomycetes en suelo. Dado su origen el estudio de esta enzima podría establecer nuevas particularidades para esta familia enzimática.
5. El análisis de los transcriptomas obtenidos permitió identificar múltiples transcriptos codificantes de ligninasas, incluyendo lacasas, MnPs y DyPs con potencial para la degradación de colorantes y otros compuestos xenobióticos.

## 4. Conclusiones y perspectivas generales

Los HCPBs y sus enzimas ligninolíticas han demostrado su capacidad para degradar distintos contaminantes ambientales. Sin embargo, la mayoría de los trabajos realizados abarcan un número reducido de especies ampliamente estudiadas (por ej.: *Trametes*, *Pleurotus*, *Pycnoporus*, etc.) (Wesenberg et al., 2003; Couto, 2009). La prospección de cepas con capacidad degradativa de xenobióticos constituye una poderosa herramienta en la búsqueda de nuevos tratamientos biológicos. Las especies utilizadas en esta tesis se encuentran poco estudiadas, principalmente las correspondientes al género *Geastrum*, pero también los hongos de hábito de crecimiento corticioide. En ambos casos resulta dificultoso su aislamiento, principalmente debido a la escasa cantidad de pseudo tejidos disponibles en sus basidiomas y en particular en *Geastrum* por su lenta velocidad de crecimiento. A pesar de esto, fue posible aislar y realizar estudios fisiológicos con 13 especies de hongos corticioides y 3 de *Geastrum*.

El objetivo de la presente tesis fue estudiar distintos enfoques que contribuyan al desarrollo de sistemas eficientes para la remoción de colorantes sintéticos en efluentes industriales. Las estrategias utilizadas en cada capítulo respondieron a las características de las especies y permitieron generar propuestas para su uso potencial en el tratamiento de colorantes, o con otros fines biotecnológicos.

En el capítulo 1 se trabajó en el diseño de sistemas basados en el uso de hongos lignocelulolíticos de hábito de crecimiento corticioide inmovilizados sobre soportes inertes y mixtos y en la optimización de la producción de enzimas ligninolíticas. Para ello, se aislaron e identificaron mediante estudios morfológicos y moleculares, 13 cepas de hongos corticioides, en los cuales se analizó su capacidad de producir enzimas ligninolíticas en distintos medios y condiciones de cultivo. Se seleccionó a *Ph. uda* BAFC 4689 y *P. laxitexta* BAFC 4687 debido a su capacidad para producir altos títulos de actividad lacasa en fermentación

sumergida. Estos organismos se inmovilizaron en soportes mixtos constituidos por discos de esponja de poliuretano y residuos lignocelulósicos de bajo costo. En este sistema *P. laxitexta* fue capaz de remover eficientemente hasta el 90% de los colorantes xilidina y RBBR en al menos tres ciclos de incubación consecutivos y el colorante verde de malaquita en al menos 10 ciclos sucesivos, demostrando su potencial para el tratamiento de efluentes industriales coloreados.

En el segundo capítulo de esta tesis se trabajó en la búsqueda de nuevas enzimas ligninolíticas, con potencial para la degradación de colorantes sintéticos. Para ello se evaluó la producción de enzimas ligninolíticas por distintas especies de *Geastrum*: *G. argentinum* BAFC 3282, *G. triplex* BAFC 3013 y *G. schweinitzii* BAFC 3002. En este trabajo se optimizaron las condiciones de cultivo de estas cepas en SSF en sustratos lignocelulósicos, evaluándose la expresión de enzimas lignocelulolíticas mediante la cuantificación de las actividades en extractos de los cultivos y por secuenciación masiva de los transcriptomas de *G. argentinum* y *G. schweinitzii* crecidos en cascarilla de soja. El ensamblado y anotación *in silico* de los transcriptos secuenciados permitió la identificación de más de 450 secuencias codificantes de enzimas activas sobre carbohidratos (CAZymes), incluyendo lacasas y peroxidasas con potencial aplicación en el tratamiento enzimático de efluentes.

Entre las perspectivas para la continuidad del trabajo desarrollado en esta tesis, se encuentra la optimización de los soportes diseñados, por ejemplo variando la cantidad de material lignocelulósico utilizado y su relación con la concentración de nutrientes en el medio de cultivo, para incrementar la producción de ligninasas, no sólo de las enzimas extracelulares sino también de las asociadas al micelio, como la lacasa detectada en *P. laxitexta*. Asimismo, resta estudiar las condiciones de cultivo que permitan inducir la producción de las peroxidasas detectadas en los relevamientos en placa.

Como resultado de la secuenciación de *G. argentinum* y *G. schweinitzii* se obtuvieron múltiples transcriptos correspondientes a oxidadas y peroxidasas como, lacasas, MnPs, DyPs y HTPs. La obtención de estas secuencias posibilitará

la expresión heteróloga de estas enzimas para su caracterización funcional y bioquímica y potencial aplicación en procesos biotecnológicos.

Adicionalmente, los transcritos identificados y curados en esta tesis correspondientes a la batería de enzimas modificadoras de pared celular revelaron actividades interesantes para analizar en Basidiomycetes degradadores de hojarasca. Entre estos fue notable la baja ID de secuencia de los transcritos de la superfamilia Glucosa-Metanol-Colina (GMC) involucradas en la producción de peróxido de hidrógeno. Estos resultados podrían indicar la presencia de tipos enzimáticos con mecanismos aun desconocidos o de al menos potencial familias génicas no descritas. El estudio de estas familias podría incrementar el conocimiento sobre los mecanismos enzimáticos generados por los hongos degradadores de hojarasca. Otro tipo enzimático interesante encontrado fue la  $\alpha$ -glucuronidasa de la familia GH67, enzimas que se habían reportado hasta el presente sólo en Ascomycetes.

## Referencias

- Agrawal, K., Verma, P. (2019). Column bioreactor of immobilized *Stropharia* sp. ITCC 8422 on natural biomass support of *L. cylindrica* for biodegradation of anthraquinone violet R. *Bioresource Technology Reports* 8:100345.
- Anastasi, A., Varese, G.C., Casieri, L., Marchisio, V.F. (2006). Basidiomycetes from compost and their dye degradation and enzyme activities. *Compost Science & Utilization* 14(4): 284-289.
- Anastasi, A., Tigini, V., Varese, G.C. (2013). The bioremediation potential of different ecophysiological groups of fungi. In: *Fungi as Bioremediators* (pp. 29-49). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Ancona-Escalante, W., Tapia-Tussell, R., Pool-Yam, L., Can-Cauich, A., Lizama-Uc, G., Solís-Pereira, S. (2018). Laccase-mediator system produced by *Trametes hirsuta* Bm-2 on lignocellulosic substrate improves dye decolorization. *3 Biotechnology* 8(7): 298.
- Andrews, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data.
- Arantes, V., Milagres, A.M.F. (2007). The synergistic action of ligninolytic enzymes (MnP and Laccase) and Fe<sup>3+</sup>-reducing activity from white-rot fungi for degradation of Azure B. *Enzyme and Microbial Technology* 42(1): 17-22.
- Archibald, F.S. (1992). A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye azure B. *Applied and Environmental Microbiology* 58(9): 3110-3116.
- Arregui, L., Ayala, M., Gómez-Gil, X., Gutiérrez-Soto, G., Hernández-Luna, C.E., Herrera de los Santos, M., Levin, L., Rojo-Domínguez, A., Romero-Martínez, D., Saparrat, M.C.N., Trujillo-Roldán, M.A., Valdez-Cruz, N.A. (2019). Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation. *Microbial Cell Factories* 18 (1): 200.
- Aspinall, G.O., Hunt, K., Morrison, I.M. (1966). Polysaccharides of soy-beans. Part II. Fractionation of hull cell-wall polysaccharides and the structure of a xylan. *Journal of the Chemical Society C: Organic*, 1945-1949.
- Augustine, A.J., Kragh, M.E., Sarangi, R., Fujii, S., Liboiron, B.D., Stoj, C.S., Kosman D.J., Hodgson, K.O., Hedman B., Solomon, E.I. (2008). Spectroscopic studies of perturbed T1 Cu sites in the multicopper oxidases *Saccharomyces cerevisiae* Fet3p and *Rhus vernicifera* laccase: allosteric coupling between the T1 and trinuclear Cu sites. *Biochemistry* 47(7): 2036-2045.
- Baban, A., Yediler, A., Avaz, G., Hostede, S.S. (2010). Biological and oxidative treatment of cotton textile dye-bath effluents by fixed and fluidized bed reactors. *Bioresource Technology* 101: 1147-1152.
- Bhatia, S.C. (2017). *Pollution Control in Textile Industry*. CRC Press.
- Baldrian, P. (2003). Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology* 32(1): 78-91.
- Baldrian, P. (2006). Fungal laccases—occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews* 30(2): 215-242.

- Baldrian, P., López-Mondéjar, R. (2014). Microbial genomics, transcriptomics and proteomics: new discoveries in decomposition research using complementary methods. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98(4): 1531-1537.
- Bao, D., Gong, M., Zheng, H., Chen, M., Zhang, L., Wang, H., Jiang, J., Wu, L., Zhu, Y., Zhu, G., Zhou, Y., Li, C., Wang, S., Zhao, Y., Zhao, G., Tan, Q. (2013). Sequencing and comparative analysis of the straw mushroom (*Volvariella volvacea*) genome. *PLoS One* 8(3).
- Barbi, F., Kohler, A., Barry, K., Baskaran, P., Daum, C., Fauchery, L., Ihrmark, K., Kuo, A., LaButti, K., Lipzen, A., Morin, E., Grigoriev, I.V., Henrissat, B., Lindah B.D., Martin, F. (2019). Fungal ecological strategies reflected in gene transcription—a case study of two litter decomposers. *Environmental Microbiology* 22(3):1089-1103.
- Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., Kauserud, H. (2010). ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an *in silico* approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology* 10(1): 189.
- Bernicchia, A., Gorjón, S.P. (2010). Corticiaceae sl Fungi Europaei, vol. 12. *Edizioni Candusso, Alassio*, 638-639.
- Benoit, I., Coutinho, P.M., Schols, H.A., Gerlach, J.P., Henrissat, B., de Vries, R.P. (2012). Degradation of different pectins by fungi: correlations and contrasts between the pectinolytic enzyme sets identified in genomes and the growth on pectins of different origin. *BMC Genomics* 13(1).
- Bettin, F., Cousseau, F., Martins, K., Zaccaria, S., Girardi, V., Silveira, M.M.D., Dillon, A.J.P. (2019). Effects of pH, temperature and agitation on the decolourisation of dyes by laccase-containing enzyme preparation from *Pleurotus sajor-caju*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 62.
- Berthet, S., Thevenin, J., Baratiny, D., Demont-Caulet, N., Debeaujon, I., Bidzinski, P., Lepl, J.C., Huis R., Hawkins S., Gomez, L.D., Lapierre C., Jouanin, L., Lapierre, C. (2012). Role of plant laccases in lignin polymerization. In: *Advances in Botanical Research* (Vol. 61, pp. 145-172). Academic Press.
- Bonugli-Santos, R.C., Vieira, G.A.L., Collins, C., Fernandes, T.C.C., Marin-Morales, M.A., Murray, P., Sette, L.D. (2016). Enhanced textile dye decolorization by marine-derived basidiomycete *Peniophora* sp. CBMAI 1063 using integrated statistical design. *Environmental Science and Pollution Research* 23: 8659-8668.
- Bissaro, B., Várnai, A., Røhr, Å.K., Eijsink, V.G.H. (2018). Oxidoreductases and reactive oxygen species in conversion of lignocellulosic biomass. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 82(4):1-51.
- Böhmer, U., Kirsten, C., Bley, T., Noack, M. (2010). White-rot fungi combined with lignite granules and lignitic xylite to decolorize textile industry wastewater. *Engineering in Life Sciences* 10(1):26-34.
- Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30(15): 2114-2120.
- Bouras, H.D., Yeddou, A.R., Bouras, N., Hellel, D., Holtz, M.D., Sabaou, N., Chergui, A., Nadjemi, B. (2017). Biosorption of Congo red dye by *Aspergillus carbonarius* M333 and *Penicillium glabrum* Pg1: Kinetics, equilibrium and thermodynamic studies. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 80: 915-923.

- Brijwani, K., Oberoi, H.S., Vadlani, P.V. (2010). Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. *Process Biochemistry* 45(1):120-128.
- Bryant, D.M., Johnson, K., Di Tommaso, T., Tickle, T., Couger, M.B., Payzin-Dogru, D., Lee, T.J., Leigh, N.D., Kuo, T., Davis, F.G., Bateman, J., Bryant, S., Guzikowski, A.R., Tsai, S.L., Coyne, S., Ye, W.W., Freeman, R.M., Peshkin, J.L., Tabin, C.J., Regev, A., Haas, B.J., Whited, J.L. (2017). A tissue-mapped axolotl de novo transcriptome enables identification of limb regeneration factors. *Cell Reports* 18(3): 762-776.
- Buswell, J.A., Cai, Y., Chang, S.T. (1995). Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. *FEMS Microbiology Letters* 128(1): 81-87.
- Camarero, S., Ibarra, D., Martinez, M.J., Martinez, A. (2005). Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Applied Environmental Microbiology* 71: 1775-1784.
- Campos, P.A., Levin, L.N., Wirth, S.A. (2016). Heterologous production, characterization and dye decolorization ability of a novel thermostable laccase isoenzyme from *Trametes trogii* BAFC 463. *Process Biochemistry* 51(7): 895-903.
- Cannon, P.F., Sutton, B.C. (2004). Microfungi on wood and plant debris. In: *Biodiversity of Fungi* (pp. 217-239).
- Casieri, L., Varese, G.C., Anastasi, A., Prigione, V., Svobodova, K., Marchisio, V.F., Novotný, Č. (2008). Decolorization and detoxication of reactive industrial dyes by immobilized fungi *Trametes pubescens* and *Pleurotus ostreatus*. *Folia Microbiologica* 53(1): 44.
- Cavallazzi, J.R.P., Kasuya, C.M., Soares, M.A. (2005). Screening of inducers for laccase production by *Lentinula edodes* in liquid medium. *Brazilian Journal of Microbiology* 36: 383-387.
- Cázares-García, S.V., Vázquez-Garcidueñas, M.S., Vázquez-Marrufo, G. (2013). Structural and phylogenetic analysis of laccases from *Trichoderma*: a bioinformatic approach. *PloS One* 8(1).
- Cerrón, L.M., Romero-Suárez, D., Vera, N., Ludeña, Y., Villena, G.K., Gutiérrez-Correa, M. (2015). Decolorization of textile reactive dyes and effluents by biofilms of *Trametes polyzona* LMB-TM5 and *Ceriporia* sp. LMB-TM1 isolated from the Peruvian Rainforest. *Water, Air, & Soil Pollution* 226: 235-247.
- 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.
- Cheng, W.N., Sim, H.K., Ahmad, S.A., Syed, M.A., Shukor, M.Y., Yusof, M.T. (2016). Characterization of an azo-dye-degrading white rot fungus isolated from Malaysia. *Mycosphere* 7(5):560-569.
- Chowdhary, P., Shukla, G., Raj, G., Ferreira, L.F.R., Bharagava, R.N. (2019). Microbial manganese peroxidase: A ligninolytic enzyme and its ample opportunities in research. *SN Applied Sciences* 1(1): 45.
- Choinowski, T., Blodig, W., Winterhalter, K.H., Piontek, K. (1999). The crystal structure of lignin peroxidase at 1.70 Å resolution reveals a hydroxy group on

- the C $\beta$  of tryptophan 171: a novel radical site formed during the redox cycle. *Journal of Molecular Biology* 286(3): 809-827.
- Christie, R.M. (2007). *Environmental Aspects of Textile Dyeing*. Elsevier.
- Clark, W.M., Lubs, H.A. (1916). Hydrogen electrode potentials of phthalate, phosphate, and borate buffer mixtures. *Journal of Biological Chemistry* 25(3): 479-510.
- Collins, P.J., Dobson, A.D.W. (1997). Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3444-3450.
- Cooke, R.C., Rayner, A.D. (1984). *Ecology of Saprotrophic Fungi*. Longman.
- Copete, L.S., Chanagá, X., Barriuso, J., López-Lucendo, M.F., Martínez, M.J., Camarero, S. (2015). Identification and characterization of laccase-type multicopper oxidases involved in dye-decolorization by the fungus *Leptosphaerulina* sp. *BMC Biotechnology* 15(1): 1-13.
- Cortazar-Martínez, A., González-Ramírez, C., Coronel-Olivares, C., Escalante-Lozada, J., Castro-Rosas, J., Villagómez-Ibarra, J. (2012). Biotecnología aplicada a la degradación de colorantes de la industria textil. *Universidad y Ciencia* 28: 187-199.
- Couto, S.R., Sanromán, M.A., Hofer, D., Gübitz, G.M. (2004). Stainless steel sponge: a novel carrier for the immobilisation of the white-rot fungus *Trametes hirsuta* for decolourization of textile dyes. *Bioresource Technology* 95(1): 67-72.
- Couto, S.R. (2009). Dye removal by immobilized fungi. *Biotechnology Advances* 27(3): 227-235.
- Cullen, D., Kersten, P.J. (2004). Enzymology and molecular biology of lignin degradation. In: *Biochemistry and Molecular Biology* (pp. 249-273). Springer, Berlin, Heidelberg.
- D'Agostini, É.C., Mantovani, T.R.D.A., Valle, J.S.D., Paccola-Meirelles, L.D., Colauto, N.B., Linde, G.A. (2011). Low carbon/nitrogen ratio increases laccase production from basidiomycetes in solid substrate cultivation. *Scientia Agricola* 68(3): 295-300.
- D'Souza, T.M., Merritt, C.S., Reddy, C.A. (1999). Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 5307-5313.
- Da Cheng, H.A.O., Song, S.M., Cheng, Y., Qin, Z.Q., Ge, G.B., An, B.L., Xiao, P.G. (2018). Functional and transcriptomic characterization of a dye-decolorizing fungus from *Taxus* rhizosphere. *Polish Journal of Microbiology* 67(4): 417.
- Daniel, G., Volc, J., Filonova, L., Plíhal, O., Kubátová, E., Halada, P. (2007). Characteristics of *Gloeophyllum trabeum* alcohol oxidase, an extracellular source of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in brown rot decay of wood. *Applied and Environmental Microbiology* 73(19): 6241-6253
- Daniel, G. (2016). Fungal degradation of wood cell walls. In: *Secondary Xylem Biology* (pp. 131-167). Academic Press.
- de Mares, M.C., Hess, J., Floudas, D., Lipzen, A., Choi, C., Kennedy, M., Grigoriev I.D., Pringle, A. (2015). Horizontal transfer of carbohydrate metabolism genes into ectomycorrhizal *Amanita*. *New Phytologist* 205(4): 1552-1564.



- de La Rubia, T., Linares, A., Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., Romera, J., Martínez, J. (2002). Characterization of manganese-dependent peroxidase isoenzymes from the ligninolytic fungus *Phanerochaete flavido-alba*. *Research in Microbiology* 153(8): 547-554.
- de Oliveira, B.V., Teixeira, G.S., Reis, O., Barau, J.G., Teixeira, P.J.P.L., do Rio, M.C.S., Domingues, R.R., Meinhardt, L.W, PaesLeme, A.F., Rincones, J., Pereira, G.A. (2012). A potential role for an extracellular methanol oxidase secreted by *Moniliophthora perniciosa* in Witches' broom disease in cacao. *Fungal Genetics and Biology* 49(11): 922-932.
- de Souza, C.G.M., Tychanowicz, G.K., De Souza, D.F., Peralta, R.M. (2004). Production of laccase isoforms by *Pleurotus pulmonarius* in response to presence of phenolic and aromatic compounds. *Journal of Basic Microbiology* 44(2): 129-136.
- de Vries, R., van de Vondervoort, P., Hendriks, L., Van de Belt, M., Visser, J. (2002). Regulation of the  $\alpha$ -glucuronidase-encoding gene (*aguA*) from *Aspergillus niger*. *Molecular Genetics and Genomics* 268(1): 96-102.
- Deshmukh, R., Khardenavis, A.A., Purohit, H.J. (2016). Diverse metabolic capacities of fungi for bioremediation. *Indian Journal of Microbiology* 56(3): 247-264.
- Diorio, L.A., Salvatierra Fréchou, D.M., Levin, L.N. (2020). Removal of dyes by immobilization of *Trametes versicolor* in a solid-state micro-fermentation system. *Revista Argentina de Microbiología*. DOI: 10.1016/j.ram.2020.04.007
- Dittmer, N.T., Kanost, M.R. (2010). Insect multicopper oxidases: diversity, properties, and physiological roles. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40(3): 179-188.
- Dwivedi, U.N., Singh, P., Pandey, V.P., Kumar, A. (2011). Structure–function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 68(2): 117-128.
- Donk, M.A. (1964). A conspectus of the families of Aphyllophorales. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 3(2): 199-324a.
- Doyle, W.A., Blodig, W., Veitch, N.C., Piontek, K., Smith, A.T. (1998). Two substrate interaction sites in lignin peroxidase revealed by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 37(43): 15097-15105.
- Dunford, H.B. (1991). Horseradish peroxidase: structure and kinetic properties. *Peroxidases in Chemistry and Biology*, 1-23.
- Edwards, S.L., Raag, R., Wariishi, H., Gold, M.H., Poulos, T.L. (1993). Crystal structure of lignin peroxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90(2): 750-754.
- Eggert, C., Temp, U., Dean, J.F.D., Eriksson, K.E.L. (1996). A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Letters* 391(1-2): 144-148.
- Eggert, C., Temp, U., Eriksson, K.E. (1996). The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Applied & Environmental Microbiology* 62(4):1151-1158.
- Elisashvili, V., Kachlishvili, E. (2009). Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot Basidiomycetes. *Journal of Biotechnology* 144(1): 37-42.

- Eriksson, J., Ryvarden, L. (1976). The Corticiaceae of North Europe Volume 4, *Hyphodermella-Mycoacia*, 549-886.
- Esqueda, M., Gutiérrez, A., Coronado, M.L., Lizárraga, M., Raymundo, T., Valenzuela, R. (2012). Distribución de algunos hongos gasteroides (Agaricomycetes) en la planicie central del Desierto Sonorense. *Revista Mexicana de Micología*36: 1-8.
- Faiza, M., Huang, S., Lan, D., Wang, Y. (2019). New insights on unspecific peroxygenases: superfamily reclassification and evolution. *BMC Evolutionary Biology* 19(1): 76.
- Falade, A.O., Nwodo, U.U., Iweriebor, B.C., Green, E., Mabinya, L.V., Okoh, A.I. (2017). Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. *Microbiology Open* 6(1): e00394.
- Fernandes, C.D., Nascimento, V.R.S., Meneses, D.B., Vilar, D.S., Torres, N.H., Leite, M.S., Vega Baudrit, J.R., Bilal, M., Iqbal, H., Bharagava, R.N., Egues, S.M., Ferreira, R.F.R. (2020). Fungal biosynthesis of lignin-modifying enzymes from pulp wash and *Luffa cylindrica* for azo dye RB5 biodecolorization using modeling by response surface methodology and artificial neural network. *Journal of Hazardous Materials* 123094.
- Fernández-Fueyo, E., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., Romero, A., Hammel, K.E., Medrano, F.J., Martínez, A.T. (2014). Ligninolytic peroxidase genes in the oyster mushroom genome: heterologous expression, molecular structure, catalytic and stability properties, and lignin-degrading ability. *Biotechnology for Biofuels* 7(1): 2.
- Ferreira, P., Carro, J., Serrano, A., Martínez, A.T. (2015). A survey of genes encoding H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing GMC oxidoreductases in 10 Polyporales genomes. *Mycologia* 107(6): 1105-1119.
- Finn, R.D., Bateman, A., Clements, J., Coggill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Heger, A., Hetherington, K., Holm, L., Mistry, J., Sonnhammer, E.L.L., Tate, J., Punta, M. (2014). Pfam: The protein families database. *Nucleic Acids Research* 42(D1): 222-230.
- Finn, R.D., Clements, J., Eddy, S.R. (2011). HMMER web server: Interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Research* 39(S2): 29-37.
- Floudas, D., Binder, M., Riley, R., Barry, K., Blanchette, R.A., Henrissat, B., Martínez, A.T., Ollilar, R., Spatafora, J.W., Yadav, J.S. Aerts, A., Benoit, I., Boyd, A., Carlson, A., Copeland, A., Coutinho, P.M., de Vries, R.P., Ferreira, P., Findley, K., Foster, B., Gaskell, J., Glotzer, D., Górecki, P., Heitman, J., Hesse, C., Hori, C., Igarashi, K., Jurgens, J.A., Kallen, N., Kersten, P., Kohler, A., Kües, U., Kumar, T.K.A., Kuo, A., LaButti, K., Larrondo, L.F., Lindquist, E., Ling, A., Lombard, V., Lucas, S., Lundell, T., Martin, R., McLaughlin, D.J., Morgenstern, I., Morin, E., Murat, C., Nagy, L.G., Nolan, M., Ohm, R.A. Patyshakuliyeva, A., Rokas, A., Ruiz-Dueñas, F.J., Sabat, G., Salamov, A., Samejima, M., Schmutz, J., Slot, J.C., St. John, F., Stenlid, J., Sun, H., Sun, S., Syed, K., Tsang, A., Wiebenga, A., Young, D., Pisabarro, A., Eastwood, D.C., Martin, F., Cullen, D., Grigoriev, I.V., Hibbett, D.S. (2012). The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science* 336(6089): 1715-1719.

- Floudas, D., Held, B.W., Riley, R., Nagy, L.G., Koehler, G., Ransdell, A.S., Younus, H., Chow, J., Chiniquy, J., Lipzen, A., Tritt, A., Sun, H., Haridas, S., LaButti, K., Ohm, R.A., Küese, U., Blanchette, R.A. Grigoriev, I.V., Minto, R.E., Hibbet, D.S. (2015). Evolution of novel wood decay mechanisms in Agaricales revealed by the genome sequences of *Fistulina hepatica* and *Cylindrobasidium torrendii*. *Fungal Genetics and Biology* 76: 78-92.
- Freitag, M., Morrell, J.J. (1992). Decolorization of the polymeric dye Poly R-478 by wood inhabiting fungi. *Canadian Journal of Microbiology* 38(8): 811-822.
- Gaillard, B.D.E. (1965). Comparison of the hemicelluloses from plants belonging to two different plant families. *Phytochemistry* 4(4): 631-634.
- Garavaglia, S., Cambria, M.T., Miglio, M., Ragusa, S., Iacobazzi, V., Palmieri, F., D'Ambrosio, C., Scaloni, A., Rizzi, M. (2004). The structure of *Rigidoporus lignosus* laccase containing a full complement of copper ions, reveals an asymmetrical arrangement for the T3 copper pair. *Journal of Molecular Biology* 342(5): 1519-1531.
- Gao, D., Wen, X., Zeng, Y., Qian, Y. (2006). Decolourization of a textile-reactive dye with *Phanerochaete chrysosporium* incubated in different ways under non-sterile conditions. *Water Practice and Technology* 10.2166/wpt.2006.065.
- Gardes, M., Bruns, T.D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2(2): 113-118.
- Gazzano, S. (1992). Notas sobre Basidiomycetes xilófilos del Uruguay. V. Nuevos registros de *Corticaceae* s. l. (Aphyllophorales) de la región litoral platense. *Comunicaciones Botánicas del Museo de Historia Natural de Montevideo* 99: 1-7.
- Graf, M.M., Weber, S., Kracher, D., Kittl, R., Sygmund, C., Ludwig, R., Peterbauer, C., Haltrich, D. (2017). Characterization of three pyranose dehydrogenase isoforms from the litter-decomposing basidiomycete *Leucoagaricus meleagris* (syn. *Agaricus meleagris*). *Applied Microbiology and Biotechnology* 101(7): 2879-2891.
- Grassi, E., Scodeller, P., Filiel, N., Carballo, R., Levin, L. (2011). Potential of *Trametes trogii* culture fluids and its purified laccase for the decolorization of different types of recalcitrant dyes without the addition of redox mediators. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65: 635-643.
- Gerlach, A. da C.L., Campos-Santana, M. de, Gutjahr, M., Loguercio-Leite, C. (2013). Wood decaying Agaricomycetes (Basidiomycota, Fungi): new records for the state of Santa Catarina, Brazil. *Acta Botanica Brasílica* 27(2): 460-463.
- Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S., Sannia, G. (2010). Laccases: a never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67(3): 369-385.
- Glenn, J.K., Akileswaran, L., Gold, M.H. (1986). Mn (II) oxidation is the principal function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 251(2): 688-696.
- Glenn, J.K., Gold, M.H. (1983). Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 45: 1741-1747.

- Gnanamani, A., Bhaskar, M., Ganeshjeevan, R., Chandrasekar, R., Sekaran, G., Sadulla, S., Radhakrishnan, G. (2005). Enzymatic and chemical catalysis of xylydine ponceau 2R and evaluation of products released. *Process Biochemistry* 40(11): 3497-3504
- Goblirsch, B., Kurker, R.C., Streit, B.R., Wilmot, C.M., DuBois, J.L. (2011). Chlorite dismutases, DyPs, and EfeB: 3 microbial heme enzyme families comprise the CDE structural superfamily. *Journal of Molecular Biology* 408(3): 379-398.
- Gómez, C.E., Loewenbaum, M. (1976). El género *Peniophora* (Cooke) Donk (Basidiomycetes, Aphyllophorales) de los alrededores de Buenos Aires. *Darwiniana* 20 (1/2):189-209.
- Gómez, N., Sierra, M.V., Cortelezzi, A., Capítulo, A.R. (2008). Effects of discharges from the textile industry on the biotic integrity of benthic assemblages. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 69(3): 472-479.
- Gomes, J.I.N.R., Baptista, A.L.F. (2001). Microencapsulation of acid dyes in mixed lecithin/surfactant liposomic structures. *Textile Research Journal* 71(2): 153-156.
- Gonzalez-Perez, D., Alcalde, M. (2018). The making of versatile peroxidase by directed evolution. *Biocatalysis and Biotransformation* 36(1): 1-11.
- Gordon, P.F., Gregory, P. (2012). *Organic Chemistry in Colour*. Springer Science & Business Media.
- Hammel, K.E., Cullen, D. (2008). Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. *Current Opinion in Plant Biology* 11(3): 349-355.
- Haapala, R., Linko, S. (1993). Production of *Phanerochaete chrysosporium* lignin peroxidase under various culture conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 40(4): 494-498.
- Harms, H., Schlosser, D., Wick, L.Y. (2011). Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nature Reviews Microbiology*9(3): 177-192.
- Haas, B.J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P.D., Bowden, J., Couger, M.B., Eccles, D., Li, B., Lieber, M., MacManes, M.D., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi, F., Weeks, N., Westerman, R., William, T., Dewey, C.N., Henschel, R., LeDuc, R.D., Regev, A. (2013). De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols* 8(8): 1494-1512.
- Hall, J.F., Kanbi, L.D., Strange, R.W., Hasnain, S.S. (1999). Role of the axial ligand in type 1 Cu centers studied by point mutations of Met148 in rusticyanin. *Biochemistry* 38(39): 12675-12680.
- Hawksworth, D.L. (1991). The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research* 95(6): 641-655.
- Hildén, L., Johansson, G., Pettersson, G., Li, J., Ljungquist, P., Henriksson, G. (2000). Do the extracellular enzymes cellobiose dehydrogenase and manganese peroxidase form a pathway in lignin biodegradation? *FEBS Letters* 477(1-2): 79-83.
- Hildén, K., Martinez, A.T., Hatakka, A., Lundell, T. (2005). The two manganese peroxidases Pr-MnP2 and Pr-MnP3 of *Phlebia radiata*, a lignin-degrading basidiomycete, are phylogenetically and structurally divergent. *Fungal Genetics and Biology* 42(5): 403-419.

- Hoegger, P.J., Kilaru, S., James, T.Y., Thacker, J.R., Kües, U. (2006). Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *The FEBS Journal* 273(10): 2308-2326.
- Hofrichter, M., Ziegenhagen, D., Vares, T., Friedrich, M., Jager, M.G., Fritsche, W., Hatakka, A. (1998). Oxidative decomposition of malonic acid as basis for the action of manganese peroxidase in the absence of hydrogen peroxide. *FEBS Letters* 434:362-366.
- Hofrichter, M. (2002). Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology* 30(4): 454-466.
- Hofrichter, M., Ullrich, R., Pecyna, M.J., Liers, C., Lundell, T. (2010). New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87(3): 871-897.
- Hofrichter, M., Kellner, H., Pecyna, M.J., Ullrich, R. (2015). Fungal unspecific peroxygenases: heme-thiolate proteins that combine peroxidase and cytochrome P450 properties. In: *Monoxygenase, Peroxidase and Peroxygenase Properties and Mechanisms of Cytochrome P450* (pp. 341-368). Springer, Cham.
- Hosaka, K., Bates, S.T., Beever, R.E., Castellano, M.A., Colgan III, W., Dominguez, L.S., Nouhra, E.R., Geml, J., Giachini, A.J., Kenney, S.R., Simpson, N.S., Spatafora, J.W., Trappe, J.M. (2006). Molecular phylogenetics of the gomphoid-phalloid fungi with an establishment of the new subclass Phallomycetidae and two new orders. *Mycologia* 98(6): 949-959.
- Hubert, E.E. (1931). *An Outline of Forest Pathology*. John Wiley & Sons.
- Hunger, K. (2007). *Industrial Dyes: Chemistry, Properties, Applications*. John Wiley & Sons.
- Iqbal, M., Saeed, A. (2007). Biosorption of reactive dye by loofa sponge-immobilized fungal biomass of *Phanerochaete chrysosporium*. *Process Biochemistry* 42(7):1160-1164.
- Jebapriya, G.R., Gnanadoss, J.J. (2013). Bioremediation of textile dye using white rot fungi: A review. *International Journal of Current Research and Review* 5(3): 1.
- Kamei, I., Suhara, H., Kondo, R. (2005). Phylogenetical approach to isolation of white-rot fungi capable of degrading polychlorinated dibenzo-p-dioxin. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69(3): 358-366.
- Kandelbauer, A., Guebitz, G.M. (2005). Bioremediation for the decolorization of textile dyes: a review. In: *Environmental Chemistry*(pp. 269-288). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Kant, R. (2012). Textile dyeing industry an environmental hazard. *Natural Science* 4: 22-26.
- Kapich, A.N., Steffen, K.T., Hofrichter, M., Hatakka, A. (2005). Involvement of lipid peroxidation in the degradation of a non-phenolic lignin model compound by manganese peroxidase of the litter-decomposing fungus *Stropharia coronilla*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 330 (2):371-377.
- Kasinath, A., Novotný, Č., Svobodová, K., Patel, K.C., Šašek, V. (2003). Decolorization of synthetic dyes by *Irpex lacteus* in liquid cultures and packed-bed bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology* 32(1): 167-173.

- Katheresan, V., Kansedo, J., Lau, S.Y. (2018). Efficiency of various recent wastewater dye removal methods: a review. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 6: 4676-4697.
- Kaushik, P., Malik, A. (2015). Mycoremediation of synthetic dyes: an insight into the mechanism, process optimization and reactor design. In: *Microbial Degradation of Synthetic Dyes in Wastewaters* (pp. 1-25). Springer, Cham.
- Kellner, H., Luis, P., Pecyna, M.J., Barbi, F., Kapturska, D., Krüger, D., Zak, D.R., Marmeisse, R., Vandenbol, M., Hofrichter, M. (2014). Widespread occurrence of expressed fungal secretory peroxidases in forest soils. *PLoS One* 9(4).
- Kezerle, A., Velic, N., Hasenay, D., Kovacevic, D. (2018). Lignocellulosic materials as dye adsorbents: adsorption of Methylene Blue and Congo Red on brewers' spent grain. *Croatica Chemica Acta* 91: 53-65.
- Kinne, M., Poraj-Kobielska, M., Ullrich, R., Nousiainen, P., Sipilä, J., Scheibner, K., Hofrichter, M. (2011). Oxidative cleavage of non-phenolic  $\beta$ -O-4 lignin model dimers by an extracellular aromatic peroxygenase. *Holzforschung* 65(5): 673-679.
- Kjaergaard, C.H., Durand, F., Tasca, F., Qayyum, M.F., Kauffmann, B., Gounel, S., Suraniti, E., Hodgson, K.O., Hedman, B., Mano, N. (2012). Spectroscopic and crystallographic characterization of "alternative resting" and "resting oxidized" enzyme forms of bilirubin oxidase: implications for activity and electrochemical behavior of multicopper oxidases. *Journal of the American Chemical Society* 134: 5548-5551.
- Knop, D., Yarden, O., Hadar, Y. (2015). The ligninolytic peroxidases in the genus *Pleurotus*: divergence in activities, expression, and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99(3): 1025-1038.
- Krogh, A., Larsson, B., Von Heijne, G., Sonnhammer, E.L.L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology* 305(3): 567-580.
- Kuan, I. C., Tien, M. (1993). Stimulation of Mn peroxidase activity: a possible role for oxalate in lignin biodegradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90(4): 1242-1246.
- Kubicek, C.P. (2013). *Fungi and Lignocellulosic Biomass*. John Wiley & Sons.
- Kuhar, F., Papinutti, L. (2014). Optimización de la producción de lacasa por dos cepas de *Ganoderma lucidum* utilizando inductores fenólicos y metálicos. *Revista Argentina de Microbiología* 46: 144-149.
- Kuhar, F., Castiglia, V.C., Zamora, J.C. (2016). Detección de manganeso peroxidasa y otras exoenzimas en 4 aislamientos de *Geastrum* (Geastrales) en cultivo puro. *Revista Argentina de Microbiología* 48(4): 274-278.
- Kumar, S.S., Phale, P.S., Durani, S., Wangikar, P.P. (2003). Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biotechnology and Bioengineering* 83(4): 386-394.
- Larsson, K.H. (2007). Re-thinking the classification of corticioid fungi. *Mycological Research* 111(9): 1040-1063.
- Lee, K.E. (2017). Environmental sustainability in the textile industry. In: *Sustainability in the Textile Industry* (pp. 17-55). Springer.

- Lellis, B., Fávaro-Polonio, C.Z., Pamphile, J.A., Polonio, J.C. (2019). Effects of textile dyes on health and the environment and bioremediation potential of living organisms. *Biotechnology Research and Innovation* 3: 275-290.
- Leonowicz, A., Trojanowski, J., Orlicz, B. (1978). Induction of laccase in Basidiomycetes: apparent activity of the inducible and constitutive forms of the enzyme with phenolic substrates. *Acta Biochimica Polonica* 25(4): 369-378.
- 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.
- Levin, L., Malignani, E., Ramos, A. M. (2010). Effect of nitrogen sources and vitamins on ligninolytic enzyme production by some white-rot fungi. Dye decolorization by selected culture filtrates. *Bioresource Technology* 101(12): 4554-4563.
- Li, P.J., Xia, J.L., Shan, Y., Nie, Z.Y. (2015). Comparative study of multi-enzyme production from typical agro-industrial residues and ultrasound-assisted extraction of crude enzyme in fermentation with *Aspergillus japonicus* PJ01. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 38: 2013-2022.
- Li, S., Huang, J., Mao, J., Zhang, L., He, C., Chen, G., Parkin, I.P., Lai, Y. (2019). In vivo and in vitro efficient textile wastewater remediation by *Aspergillus niger* biosorbent. *Nanoscale Advances* 1(1): 168-176.
- Li, W., Mu, B., Yang, Y. (2019). Feasibility of industrial-scale treatment of dye wastewater via bio-adsorption technology. *Bioresource Technology* 277: 157-170.
- Li, W., Godzik, A. (2006). Cd-hit: A fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* 22(13): 1658-1659.
- Liers, C., Bobeth, C., Pecyna, M., Ullrich, R., Hofrichter, M. (2010). DyP-like peroxidases of the jelly fungus *Auricularia auricula-judae* oxidize nonphenolic lignin model compounds and high-redox potential dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85(6): 1869-1879.
- Liers, C., Arnstadt, T., Ullrich, R., Hofrichter, M. (2011). Patterns of lignin degradation and oxidative enzyme secretion by different wood-and litter-colonizing basidiomycetes and ascomycetes grown on beech-wood. *FEMS Microbiology Ecology* 78(1): 91-102.
- Liers, C., Pecyna, M.J., Kellner, H., Worrlich, A., Zorn, H., Steffen, K.T., Hofrichter, M., Ullrich, R. (2013). Substrate oxidation by dye-decolorizing peroxidases (DyPs) from wood-and litter-degrading agaricomycetes compared to other fungal and plant heme-peroxidases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97(13): 5839-5849.
- Litvintseva, A.P., Henson, J.M. (2002). Cloning, characterization, and transcription of three laccase genes from *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, the take-all fungus. *Applied Environmental Microbiology* 68(3): 1305-1311.
- Lu, R., Ma, L., He, F., Yu, D., Fan, R., Zhang, Y., Long, Z., Zhang, X., Yang, Y. (2016). White-rot fungus *Ganoderma* sp. En3 had a strong ability to decolorize and tolerate the anthraquinone, indigo and triphenylmethane dye with high concentrations. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 39(3): 381-390.

- Lundell, T.K., Mäkelä, M.R., Hildén, K. (2010). Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycetes—ecological, functional and phylogenetic review. *Journal of Basic Microbiology* 50(1): 5-20.
- MacManes, M.D. (2014). On the optimal trimming of high-throughput mRNA sequence data. *Frontiers in Genetics* 5: 1-7.
- Mainardi, P.H., Feitosa, V.A., de Paiva, L.B.B., Bonugli-Santos, R.C., Squina, F.M., Pessoa Jr, A., Sette, L.D. (2018). Laccase production in bioreactor scale under saline condition by the marine-derived basidiomycete *Peniophora* sp. CBMAI 1063. *Fungal Biology* 122: 302-309.
- Martínez, A.T. (2002). Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme and Microbial Technology* 30(4): 425-444.
- Martinez, D., Larrondo, L.F., Putnam, N., Gelpke, M.D.S., Huang, K., Chapman, J. Coutinho, P.M. (2004). Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nature Biotechnology* 22(6): 695-700.
- Martínez, Á.T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F.J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, M.J., Gutiérrez, A., Río Andrade, J.C.D. (2005). Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology* 8: 195-204.
- Martínez, A.T., Camarero, S., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J. (2018). Biological lignin degradation. In: *Lignin valorization: emerging approaches*. Ed. Gregg Beckham. RSC: 199-225.
- Martínez-Morales, F., Bertrand, B., Nava, A.A.P., Tinoco, R., Acosta-Urdapilleta, L., Trejo-Hernández, M.R. (2015). Production, purification and biochemical characterization of two laccase isoforms produced by *Trametes versicolor* grown on oak sawdust. *Biotechnology Letters* 37(2): 391-396.
- Marzall-Pereira, M., Savi, D.C., Bruscatto, E.C., Niebisch, C.H., Paba, J., Aluizio, R., Ferreira-Maba, L.S., Galli-Terasawa, V.L., Glienke, C., Kava, V. (2019). *Neopestalotiopsis* species presenting wide dye destaining activity: Report of a mycelium-associated laccase. *Microbiological Research* 228: 126299.
- Máximo, C., Amorim, M.T.P., Costa-Ferreira, M. (2003). Biotransformation of industrial reactive azo dyes by *Geotrichum* sp. CCMI 1019. *Enzyme and Microbial Technology* 32(1): 145-151.
- Michniewicz, A., Ledakowicz, S., Ullrich, R., Hofrichter, M. (2008). Kinetics of the enzymatic decolorization of textile dyes by laccase from *Cerrena unicolor*. *Dyes and Pigments* 77(2): 295-302.
- Miller, G.L. (1959). Use of DNS reagent for the measurement of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31(1): 426-428.
- Min, C.H.E.N., Shanjing, Y.A.O., Zhang, H., Liang, X. (2010). Purification and characterization of a versatile peroxidase from edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *Chinese Journal of Chemical Engineering* 18(5): 824-829.
- Mir-Tutusaus, J.A., Baccar, R., Caminal, G., Sarrà, M. (2018). Can white-rot fungi be a real wastewater treatment alternative for organic micropollutants removal? A review. *Water Research* 138: 137-151.
- Misra, M., Akansha, K., Sachan, A., Sachan, S.G. (2020). Removal of dyes from industrial effluents by application of combined biological and physicochemical treatment approaches. In: *Combined Application of Physico-Chemical &*



- Microbiological Processes for Industrial Effluent Treatment Plant*. Springer, pp. 365-407.
- Molina-Espeja, P., Garcia-Ruiz, E., Gonzalez-Perez, D., Ullrich, R., Hofrichter, M., Alcalde, M. (2014). Directed evolution of unspecific peroxygenase from *Agrocybe aegerita*. *Applied and Environmental Microbiology* 80(11):3496-3507.
- Morales, M., Mate, M.J., Romero, A., Martínez, M.J., Martínez, Á.T., Ruiz-Dueñas, F.J. (2012). Two oxidation sites for low redox potential substrates a directed mutagenesis, kinetic, and crystallographic study on *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase. *Journal of Biological Chemistry* 287(49): 41053-41067.
- Moreira Neto, S.L., Mussatto, S.I., Machado, K.M.G., Milagres, A.M. (2013). Decolorization of salt-alkaline effluent with industrial reactive dyes by laccase-producing basidiomycetes strains. *Letters in Applied Microbiology* 56: 283-290.
- Moreira, S.L., Milagres, A.M.F., Mussatto, S.I. (2014). Reactive dyes and textile effluent decolorization by a mediator system of salt-tolerant laccase from *Peniophora cinerea*. *Separation and Purification Technology* 135: 183-189.
- Morozova, O.V., Shumakovich, G.P., Shleev, S.V., Yaropolov, Y.I. (2007). Laccase mediator systems and their applications: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 43:523-535.
- Moreaux, K. (2017). Spawn Production. In: *Edible and Medicinal Mushrooms: Technology and Applications*, 89-128.
- Morin, E., Kohler, A., Baker, A.R., Foulongne-Oriol, M., Lombard, V., Nagye, L.G., Ohm, R.A., Patyshakuliyeva, A., Brun, A., Aerts, A.L., Bailey, A.M., Billette, C., Coutinho, P.M., Deakin, G., Doddapaneni, H., Floudas, D., Grimwood, J., Hildén, K., Kües, U., LaButti, K.M., Lapidus, A., Lindquist, E.A., Lucas, S.M., Murat, C., Riley, R.W., Salamov, A.A., Schmutz, J., Subramanian, V., Wösten, H.A.B., Xu, J., Eastwood, D.C., Foster, G.D., Sonnenberg, A.S.M., Cullen, D., de Vries R.P., Lundell, T., Hibbett, D.S., Henrissat, B., Burton, K.S., Kerrigan, E.W., Challen, M.P., Grigoriev, I.V., Martin, F. (2012). Genome sequence of the button mushroom *Agaricus bisporus* reveals mechanisms governing adaptation to a humic-rich ecological niche. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(43): 17501-17506.
- Motato-Vásquez, V., Pires, R.M., Gugliotta, A. de M. (2015). Polypores from an Atlantic rainforest area in southeast Brazil: pileate species. *Revista Brasileira de Botanica* 38(1): 149-164.
- Myasoedova, N.M.; Chernykh, A.M.; Psurtseva, N.V.; Belova, N.V., Golovleva, L.A. (2008). New efficient producers of fungal laccases. *Applied Biochemistry and Microbiology* 44: 73-77.
- Nagendran, S., Hallen-Adams, H.E., Paper, J.M., Aslam, N., Walton, J.D. (2009). Reduced genomic potential for secreted plant cell-wall-degrading enzymes in the ectomycorrhizal fungus *Amanita bisporigera*, based on the secretome of *Trichoderma reesei*. *Fungal Genetics and Biology* 46: 427-435.
- Nagy, T., Nurizzo, D., Davies, G.J., Biely, P., Lakey, J.H., Bolam, D.N., Gilbert, H.J. (2003). The  $\alpha$ -glucuronidase, GlcA67A, of *Cellvibrio japonicus* utilizes the carboxylate and methyl groups of aldobiouronic acid as important substrate recognition determinants. *Journal of Biological Chemistry* 278(22): 20286-

20292.

- Nagy, L.G., Riley, R., Tritt, A., Adam, C., Daum, C., Floudas, D., Sun, H., Yadav, J.S., Pangilinan, J., Larsson, K.H., Matsuura, K., Barry, K., Labutti, K., Kuo, R., Ohm, R.A., Bhattacharya, S.S., Shirouzu, T., Yoshinaga, Y., Martin, F.M., Grigoriev, I.V., Hibbett, D.S. (2016). Comparative genomics of early-diverging mushroom-forming fungi provides insights into the origins of lignocellulose decay capabilities. *Molecular Biology and Evolution* 33: 959-970.
- Nakamura, Y., Sawada, T., Sungusia, M.G., Kobayashi, F., Kuwahara, M., Ito, H. (1997). Lignin peroxidase production by *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on polyurethane foam. *Journal of Chemical Engineering of Japan* 30(1): 1-6.
- Nakasone, K.K. (1997). Studies in *Phlebia*. Six species with teeth. *Sydowia* 49(1): 49-79.
- Naskar, A., Majumder, R. (2017). Understanding the adsorption behaviour of acid yellow 99 on *Aspergillus niger* biomass. *Journal of Molecular Liquids* 242: 892-899.
- Namoodri, C.G., Perkins, W.S., Walsh, W.K. (1994). Decolorizing dyes with chlorine and ozone: Part II. *American Dyestuff Reporter* 83(4): 17-27.
- Nidheesh, P. V., Gandhimathi, R., Ramesh, S. T. (2013). Degradation of dyes from aqueous solution by Fenton processes: a review. *Environmental Science and Pollution Research* 20(4): 2099-2132.
- Nousiainen, P. (1997) Modern textile dyeing takes note of the environment. *Kem-Kem* 24(5): 376-380.
- Novotný, Č., Cajthaml, T., Svobodová, K., Šušla, M., Šašek, V. (2009). *Irpex lacteus*, a white-rot fungus with biotechnological potential - Review. *Folia Microbiologica* 54(5): 375-390.
- Nurizzo, D., Nagy, T., Gilbert, H.J., Davies, G.J. (2002). The structural basis for catalysis and specificity of the *Pseudomonas cellulose*  $\alpha$ -glucuronidase, GlcA67A. *Structure* 10(4): 547-556.
- Ohm, R.A., Riley, R., Salamov, A., Min, B., Choi, I.G., Grigoriev, I.V. (2014). Genomics of wood-degrading fungi. *Fungal Genetics and Biology* 72: 82-90.
- Olsson, P.A., Schnoor, T.K., Hanson, S.Å. (2010). pH preferences of red-listed gasteromycetes in calcareous sandy grasslands: Implications for conservation and restoration. *Fungal Ecology* 3(4): 357-365.
- Park, B.H., Karpinets, T.V., Syed, M.H., Leuze, M.R., Uberbacher, E.C. (2010). CAZymes Analysis Toolkit (CAT): web service for searching and analyzing carbohydrate-active enzymes in a newly sequenced organism using CAZY database. *Glycobiology* 20(12): 1574-1584.
- Pakshirajan, K., Kheria, S. (2012). Continuous treatment of coloured industry wastewater using immobilized *Phanerochaete chrysosporium* in a rotating biological contactor reactor. *Journal of Environmental Management* 101: 118-123.
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol, V.T., Singh, D., Mohan, R. (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 31(2): 135-152.

- Papinutti, V.L., Forchiassin, F. (2004). Modification of malachite green by *Fomes sclerodermeus* and reduction of oxicity to *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiology Letters* 231(2): 205-209.
- Papinutti, V.L., Forchiassin, F. (2010). Adsorption and decolorization of dyes using solid residues from *Pleurotus ostreatus* mushroom production. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 15(6): 1102-1109.
- Papinutti, V.L., Martínez, M.J. (2006). Production and characterization of laccase and manganese peroxidase from the ligninolytic fungus *Fomes sclerodermeus*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 81(6): 1064-1070.
- Pardo, I., Camarero, S. (2015). Laccase engineering by rational and evolutionary design. *Cellular and Molecular Life Sciences* 72(5): 897-910.
- Paszczynski, A., Pasti-Grigsby, M.B., Goszczynski, S., Crawford, R.L., Crawford, D.L. (1992). Mineralization of sulfonated azo dyes and sulfanilic acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. *Applied and Environmental Microbiology* 58(11): 3598-3604.
- Patel, A., Patel, V., Patel, H., Trivedi, U., Patel, K. (2020). White rot fungi: nature's scavenger. In: *Microbial Bioremediation & Biodegradation*, Springer, pp. 267-307.
- Pazarlioglu, N.K., Urek, R.O., Ergun, F. (2005). Biodecolourization of Direct Blue 15 by immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. *Process Biochemistry* 40(5): 1923-1929.
- Perez-Boada, M., Ruiz-Duenas, F.J., Pogni, R., Basosi, R., Choinowski, T., Martínez, M.J., Martínez, A.T. (2005). 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(2): 385-402.
- Parshetti, G., Kalme, S., Saratale, G., Govindwar, S. (2006). Biodegradation of Malachite Green by *Kocuria rosea* MTCC 1532. *Acta Chimica Slovenica* 53(4).
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* 8(10): 785-786.
- Piscitelli, A., Giardina, P., Lettera, V., Pezzella, C., Sannia, G., Faraco, V. (2011). Induction and transcriptional regulation of laccases in fungi. *Current Genomics* 12(2): 104-112.
- Pollegioni, L., Tonin, F., Rosini, E. (2015). Lignin-degrading enzymes. *The FEBS Journal* 282(7): 1190-1213.
- Ponce de León, P. (1968). A revision of the family Geastraceae. *Fieldiana Botany* 31: 301-349.
- Pozdnyakova, N., Dubrovskaya, E., Chernyshova, M., Makarov, O., Golubev, S., Balandina, S., Turkovskaya, O. (2018). The degradation of three-ringed polycyclic aromatic hydrocarbons by wood-inhabiting fungus *Pleurotus ostreatus* and soil-inhabiting fungus *Agaricus bisporus*. *Fungal Biology* 122(5): 363-372.
- Rayner, A.D., Boddy, L. (1988). *Fungal Decomposition of Wood. Its Biology and Ecology*. John Wiley & Sons Ltd.

- Reina, R., Kellner, H., Jehmlich, N., Ullrich, R., García-Romera, I., Aranda, E., Liers, C. (2014). Differences in the secretion pattern of oxidoreductases from *Bjerkandera adusta* induced by a phenolic olive mill extract. *Fungal Genetics and Biology* 72: 99-105.
- Riley, R., Salamov, A.A., Brown, D.W., Nagy, L.G., Floudas, D., Held, B.W., Levasseur, A., Lombard, V., Morin, E., Otilara, R., Lindquist, E.A., Sun, H., LaButti, K.M., Schmutz, J., Jabbour, D., Luo, H., Baker, S., Pisabarro, A.S., Walton, J.D., Blanchette, R.A., Henrissat, B., Martin, F., Cullen, I.D., Hibbett, D.S., Grigoriev, I.V. (2014). Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(27): 9923-9928.
- Roberts, G.A. (2016). A review of the physical chemistry of dyeing chitin and chitosan. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives* 21: 5-17.
- Robles, C.A., Carmarán, C.C., Lopez, S.E. (2011). Screening of xylophagous fungi associated with *Platanus acerifolia* in urban landscapes: Biodiversity and potential biodeterioration. *Landscape and Urban Planning* 100(1-2): 129-135.
- Rodríguez-Couto, S. (2017). Industrial and environmental applications of white-rot fungi. *Mycosphere* 8: 456-466.
- Rodríguez, A.M.P., Cárdenas, I.J.P. (2018). U.S. Patent No. 10,087,094. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Rodríguez, M.D., Barchuk, M.L., Fonseca, M.I., Zapata, P.D., Villalba, L.L. (2015). Effect of wood flour as carbon source on cellulases and xylanases production by white-rot-fungi native from Misiones. *Journal of Advances in Biotechnology* 5(1): 526-533.
- Rodríguez, E., Pickard, M.A., Vazquez-Duhalt, R. (1999). Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. *Current Microbiology* 38(1): 27-32.
- Rodríguez-Rincón, F., Suarez, A., Lucas, M., Larrondo, L. F., De La Rubia, T., Polaina, J., Martínez, J. (2010). Molecular and structural modeling of the *Phanerochaete flavid-alba* extracellular laccase reveals its ferroxidase structure. *Archives of Microbiology* 192(11): 883-892.
- Ruiz, A., Varela, A. (2006). Nuevos registros de Aphyllophorales (Basidiomycota) en bosque montano húmedo y de niebla de Colombia. *Caldasia* 28(2): 259-266.
- Ruiz-Dueñas, F. J., Morales, M., García, E., Miki, Y., Martínez, M. J., & Martínez, A. T. (2009). Substrate oxidation sites in versatile peroxidase and other basidiomycete peroxidases. *Journal of Experimental Botany*, 60(2), 441-452.
- Ruiz-Dueñas, F.J., Fernández, E., Martínez, M.J., Martínez, A.T. (2011). *Pleurotus ostreatus* heme peroxidases: an *in silico* analysis from the genome sequence to the enzyme molecular structure. *Comptes Rendus Biologies* 334(11) :795-805.
- Rytioja, J., Hildén, K., Hatakka, A., Mäkelä, M.R. (2014). Transcriptional analysis of selected cellulose-acting enzymes encoding genes of the white-rot fungus *Dichomitus squalens* on spruce wood and microcrystalline cellulose. *Fungal Genetics and Biology* 72: 91-98.

- Rytioja, J., Hildén, K., Yuzon, J., Hatakka, A., de Vries, R.P., Mäkelä, M.R. (2014). Plant-polysaccharide-degrading enzymes from basidiomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 78(4): 614-649.
- Ryvarden, L. (1982). *Fuscocerrena*, a new genus in the Polyporaceae. *Transactions of the British Mycological Society* 79(2): 279-281
- Saarinen, T., Orelma, H., Grönqvist, S., Andberg, M., Holappa, S., Laine, J. (2009). Adsorption of different laccases on cellulose and lignin surfaces. *BioResources* 4: 94-110.
- Salame, T.M., Yarden, O., Hadar, Y. (2010). *Pleurotus ostreatus* manganese-dependent peroxidase silencing impairs decolourization of Orange II. *Microbial Biotechnology* 3(1): 93-106.
- Salvachúa, D., Martínez, A.T., Tien, M., López-Lucendo, M.F., García, F., De Los Ríos, V., Martínez, J.M., Prieto, A. (2013). Differential proteomic analysis of the secretome of *Irpex lacteus* and other white-rot fungi during wheat straw pretreatment. *Biotechnology for Biofuels* 6(1): 115.
- Santana, T.T., Linde, G.A., Colauto, N.B., do Valle, J.S. (2018). Metallic-aromatic compounds synergistically induce *Lentinus crinitus* laccase production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 16: 625-630.
- Sen, S.K., Raut, S., Bandyopadhyay, P., Raut, S. (2016). Fungal decolouration and degradation of azo dyes: A review. *Fungal Biology Reviews* 30: 112-133.
- Senthivelan, T., Kanagaraj, J., Panda, R.C. (2016). Recent trends in fungal laccase for various industrial applications: an eco-friendly approach-a review. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 21(1): 19-38.
- Shah, M.P. (2015). Microbe-mediated degradation of synthetic dyes in wastewater. In: *Microbial Degradation of Synthetic Dyes in Wastewaters* (pp. 205-241). Springer, Cham.
- Shahadat, M., Isamil, S. (2018). Regeneration performance of clay-based adsorbents for the removal of industrial dyes: a review. *RSC Advances* 8: 24571-24587.
- Shallom, D., Golan, G., Shoham, G., Shoham, Y. (2004). Effect of dimer dissociation on activity and thermostability of the  $\alpha$ -glucuronidase from *Geobacillus stearothermophilus*: Dissecting the different oligomeric forms of family 67 glycoside hydrolases. *Journal of Bacteriology* 186(20): 6928-6937.
- Sharma, D., Garlapat, V.K., Goel, G. (2016). Bioprocessing of wheat bran for the production of lignocellulolytic enzyme cocktail by *Cotylidia pannosa* under submerged conditions. *Bioengineered* 7: 88-97.
- Sharma, A., Jain, K.K., Srivastava, A., Shrivastava, B., Thakur, V.V., Jain, R.K., Kuhad, R.C. (2019). Potential of in situ SSF laccase produced from *Ganoderma lucidum* RCK 2011 in biobleaching of paper pulp. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 42: 367-377.
- Singh, R.L., Singh, P.K., Singh, R.P. (2015). Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation* 104: 21-31.
- Silvério, S.C., Moreira, S., Milagres, A.M.F., Macedo, E.A., Teixeira, J.A., Mussatto, S.I. (2013). Laccase production by free and immobilized mycelia of *Peniophora cinerea* and *Trametes versicolor*. A comparative study. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 36: 365-373.

- Simão, F.A., Waterhouse, R.M., Ioannidis, P., Kriventseva, E.V., Zdobnov, E.M. (2015). BUSCO: Assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics* 31(19): 3210-3212.
- Singh, A.P., Singh, T. (2014). Biotechnological applications of wood-rotting fungi: A review. *Biomass and Bioenergy* 62: 198-206.
- Singh, L. (2017). Biodegradation of synthetic dyes a mycoremediation approach for degradation decolourization of textile dyes and effluents. *Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering* 3(3).
- Solomon, E.I., Sundaram, U.M., Machonkin, T.E. (1996). Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical Reviews* 96: 2563-2605.
- Sosa-Martínez, J.D., Balagurusamy, N., Montañez, J., Peralta, R.A., de Fátima Peralta-Muniz-Moreira, R., Bracht, A., Peralta, R.M., Morales-Oyervides, L. (2020). Synthetic dyes biodegradation by fungal ligninolytic enzymes: Process optimization, metabolites evaluation and toxicity assessment. *Journal of Hazardous Materials* 123254.
- Spadaro, J.T., Gold, M.H., Renganathan, V. (1992). Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Environmental Microbiology* 58(8): 2397-2401.
- Spina, F., Anastasi, A.E., Prigione, V.P., Tigini, V., Varese, G. (2012). Biological treatment of industrial wastewaters: a fungal approach. *Chemical Engineering Transactions* 27: 175-180.
- Spina, F., Romagnolo, A., Prigione, V., Tigini, V., Varese, G.C. (2014). A scaling-up issue: the optimal bioreactor configuration for effective fungal treatment of textile wastewaters. *Chemical Engineering Transactions* 38: 37-42.
- Sreenath, H.K., Jeffries, T.W. (2011). Interactions of fungi from fermented sausage with regenerated cellulose casings. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 38: 1793-1802.
- Stajich, J.E., Wilke, S.K., Ahrén, D., Au, C.H., Birren, B.W., Borodovsky, M., Canbäck, B., Casselton, L.A., Cheng, C.K.C., Deng, J., Dietrich, F.S., Fargo, D.C., Farman, M.L., Gathman, A.C., Goldberg, J., Guigó, R., Hoegger, P.J., Hooker, J.B., Huggins, A., James, T.Y., Kamada, T., Kilaru, S., Kodira, C., Kües, U., Kupfer, D., Kwan, H.S., Lomsadze, A., Li, W., Lilly, W.W., Ma, L., Mackey, A.J., Manning, G., Martin, F., Muraguchi, H., Natvig, D.O., Palmerini, H., Ramesh, M.A., Rehmeier, C.O., Roe, B.A., Shenoy, N., Stanke, M., Ter-Hovhannisyan, V., Tunlid, A., Velagapudi, R., Vision, T.J., Zeng, Q., Zolan, M.E., Deng, J. (2010). Insights into evolution of multicellular fungi from the assembled chromosomes of the mushroom *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(26): 11889-11894.
- Stalpers, J.A. (1978). Identification of wood-inhabiting fungi in pure culture. *Studies in Mycology* 16: 1-248.
- Steffen, K.T., Hofrichter, M., Hatakka, A. (2000). Mineralisation of <sup>14</sup>C-labelled synthetic lignin and ligninolytic enzyme activities of litter-decomposing basidiomycetous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54(6): 819-825.
- Steffen, K.T., Hofrichter, M., Hatakka, A. (2002). Purification and characterization of manganese peroxidases from the litter-decomposing basidiomycetes

- Agrocybe praecox* and *Stropharia coronilla*. *Enzyme and Microbial Technology* 30(4): 550-555.
- Stoytchev, I., Homolka, L., Nerud, F. (2001). *Geastrum pouzarii* Stank in agar culture. *Antonie van Leeuwenhoek* 79(3-4): 363.
- Strittmatter, E., Liers, C., Ullrich, R., Wachter, S., Hofrichter, M., Plattner, D. A., & Piontek, K. (2013). First crystal structure of a fungal high-redox potential dye-decolorizing peroxidase substrate interaction sites and long-range electron transfer. *Journal of Biological Chemistry*, 288(6), 4095-4102.
- Sugano, Y. (2009). DyP-type peroxidases comprise a novel heme peroxidase family. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66(8): 1387-1403.
- Sun, S., Xie, S., Chen, H., Cheng, Y., Shi, Y., Qin, X., Dai, S.Y., Zhang, X. Yuan, J.S. (2016). Genomic and molecular mechanisms for efficient biodegradation of aromatic dye. *Journal of Hazardous Materials* 302:286-295.
- Sundaramoorthy, M., Kishi, K., Gold, M.H., Poulos, T.L. (1994). The crystal structure of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.06 Å resolution. *Journal of Biological Chemistry* 269(52): 32759-32767.
- Sunhede, S. 1989. Geastraceae (Basidiomycotina) morphology, ecology and systematics with emphasis on the north European species. *Synopsis Fungorum* 1. Oslo: *Fungiflora*. 535 pp.
- Susanne, W.I.T.T., Wohlfahrt, G., Schomburg, D., Hetcht, H.J., Kalisz, H.M. (2000). Conserved arginine-516 of *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase is essential for the efficient binding of  $\beta$ -D-glucose. *Biochemical Journal* 347(2): 553-559.
- Šušla, M., Novotný, Č., Svobodová, K. (2007). The implication of *Dichomitus squalens* laccase isoenzymes in dye decolorization by immobilized fungal cultures. *Bioresource Technology* 98(11): 2109-2115.
- Sützl, L., Laurent, C.V.F.P., Abrera, A.T., Schütz, G., Ludwig, R., Haltrich, D. (2018). Multiplicity of enzymatic functions in the CAZy AA3 family. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102(6): 2477-2492.
- Svobodová, K., Majcherczyk, A., Novotný, Č., Kües, U. (2008). Implication of mycelium-associated laccase from *Irpex lacteus* in the decolorization of synthetic dyes. *Bioresource Technology* 99(3): 463-471.
- Swamy, J., Ramsay, J.A. (1999). Effects of glucose and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> concentrations on sequential dye decoloration by *Trametes versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology* 25(3-5): 278-284.
- Szabo, O.E., Csiszar, E., Toth, K., Szakacs, G., Koczka, B. (2015). Ultrasound-assisted extraction and characterization of hydrolytic and oxidative enzymes produced by solid state fermentation. *Ultrasonics Sonochemistry* 22: 249-256.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2006). *Fisiologia Vegetal* (Vol. 10). Universitat Jaume I.
- Taboada-Puig, R., Lú-Chau, T., Moreira, M.T., Feijoo, G., Martínez, M.J., Lema, J.M. (2011). A new strain of *Bjerkandera* sp. production, purification and characterization of versatile peroxidase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27(1): 115-122.
- Talbot, J.M., Martin, F., Kohler, A., Henrissat, B., Peay, K.G. (2015). Functional guild classification predicts the enzymatic role of fungi in litter and soil biogeochemistry. *Soil Biology and Biochemistry* 88: 441-456.
- Tan, T.C., Spadiut, O., Wongnate, T., Sucharitakul, J., Krondorfer, I., Sygmund, C.,

- Haltrich, D., Chaiyen, P., Peterbauer, C.K., Divne, C. (2013). The 1.6 Å crystal structure of pyranose dehydrogenase from *Agaricus meleagris* rationalizes substrate specificity and reveals a flavin Intermediate. *PLoS ONE* 8(1).
- Tavčar, M., Svobodová, K., Kuplenk, J., Novotný, Č., Pavko, A. (2006). Biodegradation of azo dye RO16 in different reactors by immobilized *Irpex lacteus*. *Acta Chimica Slovenica* 53(3).
- Tavares, A.P., Cristóvão, R.O., Loureiro, J.M., Boaventura, R.A., Macedo, E.A. (2008). Optimisation of reactive textile dyes degradation by laccase–mediator system. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 83(12): 1609-1615.
- Thongchul, N., Yang, S.T. (2003). Controlling filamentous fungal morphology by immobilization on a rotating fibrous matrix to enhance oxygen transfer and L(+)-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. *Fermentation Biotechnology* 3: 36-51.
- Tisserant, E., Kohler, A., Dozolme-Seddas, P., Balestrini, R., Benabdellah, K., Colard, A., Croll, D., Da Silva, C., Gomez, S.K., Koul, R., Ferrol, N., Fiorilli, V., Formey, D., Franken, Ph. Helber, N., Hijri, M., Lanfranco, L., Lindquist, E., Liu, E., Malbreil, M., Morin, E., Poulain, J., Shapiro, H., van Tuinen, D., Waschke, A., Azcón-Aguilar, C., Bécard, G., Bonfante, P., Harrison, M.J., Küster, H., Lammers, P., Paszkowski, U., Requena, N., Rensing, S.A., Roux, C., Sanders, I.R. Shachar-Hill, Y., Tuskan, G., Young, J.P.W., Gianinazzi-Pearson, V.P., Ferrol, N. (2012). The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont. *New Phytologist* 193(3): 755-769.
- Tronnier, H. (2002). Effects of textiles on human skin. *SÖFW-journal* 128(4): 8-14.
- Trupkin, S., Levin, L., Forchiassin, F., Viale, A. (2003). Optimization of a culture medium for ligninolytic enzyme production and synthetic dye decolorization using response surface methodology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30(12): 682-690.
- Valášková, V., Šnajdr, J., Bittner, B., Cajthaml, T., Merhautová, V., Hofrichter, M., Baldrian, P. (2007). Production of lignocellulose-degrading enzymes and degradation of leaf litter by saprotrophic basidiomycetes isolated from a *Quercus petraea* forest. *Soil Biology and Biochemistry* 39(10): 2651-2660.
- Valli, K., Wariishi, H., Gold, M.H. (1990). Oxidation of monomethoxylated aromatic compounds by lignin peroxidase: role of veratryl alcohol in lignin biodegradation. *Biochemistry* 29(37): 8535-8539.
- Valli, M., Tatto, N.E., Peymann, A., Gruber, C., Landes, N., Ekker, H., Thallinger, G. G., Mattanovich, D., Gasser, B., Graf, A.B. (2016). Curation of the genome annotation of *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) CBS7435 from gene level to protein function. *FEMS Yeast Research* 16(6).
- van Bloois, E., Pazmiño, D.E.T., Winter, R.T., Fraaije, M.W. (2010). A robust and extracellular heme-containing peroxidase from *Thermobifida fusca* as prototype of a bacterial peroxidase superfamily. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86(5): 1419-1430.
- Vanhulle, S., Enaud, E., Trovaslet, M., Nouaimeh, N., Bols, C.M., Keshavarz, T., Tron T., Sannia G., Corbisier, A.M. (2007). Overlap of laccases/cellobiose dehydrogenase activities during the decolourisation of anthraquinonic dyes



- with close chemical structures by *Pycnoporus* strains. *Enzyme and Microbial Technology* 40(7): 1723-1731.
- Vasina, D.V., Moiseenko, K.V., Fedorova, T.V., Tyazhelova, T.V. (2017). Lignin-degrading peroxidases in white-rot fungus *Trametes hirsuta* 072. Absolute expression quantification of full multigene family. *PloS one* 12(3).
- Volc, J., Kubátová, E., Daniel, G., Sedmera, P., Haltrich, D. (2001). Screening of basidiomycete fungi for the quinone-dependent sugar C-2/C-3 oxidoreductase, pyranose dehydrogenase, and properties of the enzyme from *Macrolepiota rhacodes*. *Archives of Microbiology* 176(3): 178-186.
- Venkataraman, K. (2012). *The Chemistry of Synthetic Dyes* (Vol. 4). Elsevier.
- Watkinson, S.C., Boddy, L., Money, N. (2015). *The fungi*. Academic Press.
- Wesenberg, D., Kyriakides, I., Agathos, S.N. (2003). White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances* 22(1-2): 161-187.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S.J.W.T., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications* 18(1): 315-322.
- Wielewski, L.P., Zuccolotto, T., Soares, M., Prola, L.D.T., Liz, M.V.D. (2020). Degradation of the textile dye Reactive Black 5 by Basidiomycetes. *Revista Ambiente & Água* 15(1).
- Williams, H.L., Tang, Y., Hintz, W.E. (2002). Endopolygalacturonase is encoded by a multigene family in the basidiomycete *Chondrostereum purpureum*. *Fungal Genetics and Biology* 36(1): 71-83.
- Wong, D.W. (2009). Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 157(2): 174-209.
- Wood, T.M., Bhat, K.M. (1988). Methods for measuring cellulase activities. *Methods in Enzymology* 160: 87-112.
- Wright, J.E., Albertó, E. (2006). *Hongos de la Región Pampeana, II: Hongos sin Laminillas*. LOLA, Buenos Aires.
- Wucherpfennig, T., Kiep, K.A., Driouch, H., Wittmann, C., Krull, R. (2010). Morphology and rheology in filamentous cultivations. *Advances in Applied Microbiology* 72: 89-136.
- Xiao, Y.Z., Hong, Y.Z., Li, J.F., Hang, J., Tong, P.G., Fang, W., Zhou, C.Z. (2006). Cloning of novel laccase isozyme genes from *Trametes* sp. AH28-2 and analyses of their differential expression. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71: 493-501.
- Xiao, P., Mori, T., Kamei, I., Kondo, R. (2011). Metabolism of organochlorine pesticide heptachlor and its metabolite heptachlor epoxide by white rot fungi, belonging to genus *Phlebia*. *FEMS Microbiology Letters* 314(2): 140-146.
- Xu, F., Shin, W., Brown, S.H., Wahleithner, J.A., Sundaram, U.M., Solomon, E.I. (1996). A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1292(2): 303-311.
- Yang, J., Wang, G., Ng, T.B., Lin, J., Ye, X. (2016). Laccase production and differential transcription of laccase genes in *Cerrena* sp. in response to metal ions, aromatic compounds, and nutrients. *Frontiers in Microbiology* 6: 1-11.

- Yaver, D.S., Golightly, E.J. (1996). Cloning and characterization of three laccase genes from the white-rot basidiomycete *Trametes villosa*: genomic organization of the laccase gene family. *Gene* 181(1-2): 95-102.
- Yesilada, O., Cing, S., Asma, D. (2002). Decolourisation of the textile dye Astrazon Red FBL by *Funalia trogii* pellets. *Bioresource Technology* 81(2): 155-157.
- Yesilada, O., Birhanli, E., Geckil, H. (2018). Bioremediation and decolorization of textile dyes by white rot fungi and laccase enzymes. In: *Mycoremediation and Environmental Sustainability* (pp. 121-153). Springer, Cham.
- Yoshida, T., Sugano, Y. (2015). A structural and functional perspective of DyP-type peroxidase family. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 574: 49-55.
- Zámocký, M., Obinger, C. (2010). Molecular phylogeny of heme peroxidases. In: *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases* (pp. 7-35). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Zámocký, M., Hofbauer, S., Schaffner, I., Gasselhuber, B., Nicolussi, A., Soudi, M., Obinger, C. (2015). Independent evolution of four heme peroxidase superfamilies. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 574: 108-119.
- Zamora, J.C., Calonge, F.D.D., Martín, M.P. (2013). New sources of taxonomic information for earthstars (*Geastrum*, Geastraceae, Basidiomycota): phenoloxidases and rhizomorph crystals. *Phytotaxa* 132(1): 1-20.
- Zamora, J.C., Kuhar, F., Castiglia, V., Papinutti, L. (2014). On *Geastrum argentinum*, a forgotten species. *Mycoscience* 55(3): 177-182.
- Zhang, K., Huang, M., Ma, J., Liu, Z., Zeng, J., Liu, X., Zhu, Y. (2018). Identification and characterization of a novel bacterial pyranose 2-oxidase from the lignocellulolytic bacterium *Pantoea ananatis* Sd-1. *Biotechnology Letters* 40(5): 871-880.
- Zhao, J., De Koker, T.H., Janse, B.J.H. (1996). Comparative studies of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidases produced by selected white rot fungi in solid media. *FEMS Microbiology Letters* 145(3): 393-399.
- Zhao, Z., Liu, H., Wang, C., Xu, J.R. (2014). Correction to comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi. *BMC Genomics* 15(1).
- Zhou, L.W., Nakasone, K.K., Burdsall, H.H., Ginns, J., Vlasák, J., Miettinen, O., Spirin, V., Niemelä, T., Yuan, H., He, S., Cui, B., Xing, J., Dai, Y.C. (2016). Polypore diversity in North America with an annotated checklist. *Mycological Progress* 15(7): 771-790.
- Zhuo, R., Yuan, P., Yang, Y., Zhang, S., Ma, F., Zhang, X. (2017). Induction of laccase by metal ions and aromatic compounds in *Pleurotus ostreatus* HAUCC 162 and decolorization of different synthetic dyes by the extracellular laccase. *Biochemical Engineering Journal* 117: 62-72.
- Zied, D.C., González, J.E.P., Dias, E.S., Pardo-Giménez, A. (2017). Characteristics, production, and marketing of the sun mushroom: the new medicinal cultivated mushroom. *Edible and Medicinal Mushrooms: Technology and Applications* 361-384.
- Zuorro A., Fidaleo M., Lavecchia R., 2013. Response surface methodology (RSM) analysis of photodegradation of sulfonated diazo dye Reactive Green 19 by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process. *Journal of Environmental Management* 127: 28-35.

