

Evaluación de la biodegradación de compuestos fenólicos presentes en una matriz acuosa simulada usando extractos enzimáticos ligninolíticos de hongos basidiomicetos autóctonos de Santander.

Jesús David Rueda Villabona

Trabajo de Grado para Optar el título de Magister en Microbiología

Director

Giovanna Rincón Cruz,

Ph.D. Farmacia y Bioquímica

Codirector

Andrés Mauricio Rueda Rueda,

Ph.D. Biotecnología, Ph.D. Biología.

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Salud

Escuela de Microbiología

Maestría en Microbiología

Bucaramanga

2020

Dedicatoria

A mi madre por su incondicional amor, apoyo y entrega a nosotros sus hijos durante estos años.

Gracias a ella he logrado mis metas y me he convertido en la persona que soy.

Agradecimientos

A Andrés Rueda y Giovanna Rincón, mis supervisores de trabajo de grado, les agradezco por su confianza, por su dedicación y por todo el apoyo que me brindaron durante el desarrollo de este proyecto. A Inés, Clara y Andrés, les agradezco por abrirme las puertas del Laboratorio 404, por ser mis guías durante este proceso, por confiar en mí, por su paciencia, por sus consejos y por todo el conocimiento compartido. Se han ganado mi respeto y total admiración.

A mi familia, en especial a Mireya y Camilo, quienes han estado conmigo dándome la fortaleza para seguir adelante, enseñándome a encarar las adversidades y por brindarme su amor incondicional. A mis amigos, que siempre me acompañaron en este camino, en especial a Alexandra, Claudia, Marcela, Angelith, Bryan, Ana y Angie, les agradezco por sus consejos y por alegrarme los días grises. A Roger, le agradezco por estar 24/7 para solucionar cualquier duda estadística que se presentara. Lucía y Yarileny, con quienes sufrí, lloré y reí en este camino. Les agradezco por siempre estar para mí, los tres aprendimos que todo puede ser peor y que todo es muy teórico en esta vida.

Finalmente, debo agradecer a todas las organizaciones financieras a través de las cuales obtuve patrocinio. Sin su apoyo financiero, este proyecto no se hubiese podido desarrollar. COLCIENCIAS convocatoria 771 Convocatoria para la Formación de Capital Humano de Alto Nivel para el Departamento de Santander, Maestría Nacional, Gobernación de Santander, Colfuturo, Universidad Industrial de Santander, Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular, Centro de Estudios e Investigaciones Ambientales.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción.....	18
1. Hipótesis	21
2. Objetivos.....	21
2.1 Objetivo general.....	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
3. Marco teórico y estado del arte.....	22
3.1 Aspectos fisicoquímicos de compuestos fenólicos	22
3.2 Compuestos fenólicos en efluentes	23
3.3 Efectos del fenol y sus derivados	25
3.4 Métodos de transformación de compuestos fenólicos en efluentes	28
3.5 Hongos en la transformación de compuestos fenólicos	30
3.5.1. Enzimas ligninolíticas.....	32
4. Metodología	38
4.1 Aislamientos fúngicos	39
4.2 Selección cualitativa de aislamiento fúngico con capacidad de transformación de compuestos fenólicos.	40
4.3 Obtención extractos enzimáticos ligninolíticos	42
4.3.1. Actividad lacasa	44
4.3.2. Actividad lignina peroxidasa	44

4.3.3. Actividad manganeso peroxidasa.....	45
4.4 Determinación de las variables independientes que favorecen la transformación de compuestos fenólicos	46
4.4.1. Cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu modificado.	46
4.4.2. Efecto del pH en la transformación de compuestos fenólicos	47
4.4.3. Efecto de la temperatura en la transformación de compuestos fenólicos	47
4.4.4. Efecto de la agitación en la transformación de compuestos fenólicos	48
4.4.5. Efecto de las unidades de actividad ligninolítica volumétrica en la transformación de compuestos fenólicos.	48
4.4.6. Efectos combinados de las variables independientes en la transformación de compuestos fenólicos	49
4.5 Transformación de compuestos fenólicos en el tiempo	50
4.6 Transformación de compuestos fenólicos en una matriz acuosa simulada	50
4.6.1. Validación de la transformación de compuestos fenólicos presentes en una matriz acuosa simulada en el tiempo.....	51
4.7 Análisis estadístico	52
5. Resultados y discusión	52
5.1 Aislamientos fúngicos	52
5.2 Selección cualitativa de aislamiento fúngico con capacidad de transformación de compuestos fenólicos.	57
5.3 Obtención extractos enzimáticos ligninolíticos	66
5.4 Determinación de las variables independientes que favorecen la transformación de compuestos fenólicos.	67

5.4.1. Efecto del pH en la transformación de compuestos fenólicos	67
5.4.2. Efecto de la temperatura en la transformación de compuestos fenólicos	69
5.4.3. Efecto de la agitación en la transformación de compuestos fenólicos	71
5.4.4. Efecto de las unidades de actividad ligninolítica volumétrica en la transformación de compuestos fenólicos	72
5.4.5. Efectos combinados de las variables independientes en la transformación de compuestos fenólicos	73
5.5 Transformación de compuestos fenólicos en el tiempo	79
5.6 Transformación de compuestos fenólicos en una matriz acuosa simulada	84
6. Conclusiones	87
7. Recomendaciones.....	88
8. Divulgación.....	89
Referencias bibliográficas	90
Apéndices	105

Lista de Tablas

Tabla 1. <i>Propiedades físicas y químicas del fenol</i>	23
Tabla 2. <i>Compuestos fenólicos generados en efluentes industriales y su concentración</i>	24
Tabla 3. <i>Efectos nocivos generado a los seres vivos por compuestos fenólicos</i>	26
Tabla 4. <i>Compuestos fenólicos degradados por enzimas de hongos basidiomicetos</i>	31
Tabla 5. <i>Composición del medio cultivo agar extracto salvado de trigo</i>	40
Tabla 6. <i>Composición del medio cultivo base</i>	41
Tabla 7. <i>Composición medio de fermentación</i>	43
Tabla 8. <i>Factores y niveles empleados en la realización del diseño de experimentos de cribado</i> <i>2⁴</i>	49
Tabla 9. <i>Factores y variables empleados en la realización del diseño multifactorial 4²</i>	51
Tabla 10. <i>Concentración de compuestos fenólicos empleada para la simulación de tres matrices</i> <i>acuosas con concentración final de 50, 100 y 500 ppm</i>	51
Tabla 11. <i>Especies homologas para los aislamientos fúngicos Byssomerulius LMB1,</i> <i>Dictyopanus LMB4, Hyphodontia LMB5 y Trametes LMB15</i>	55
Tabla 12. <i>Porcentaje de inhibición de crecimiento de Byssomerulius corium LMB1, Dictyopanus</i> <i>pusillus LMB4, Hyphodontia LMB5 y Trametes LMB15, a 30 días en medio de cultivo base</i> <i>suplementado (MCBs) con concentraciones de 50, 100 y 500 ppm de ácido gálico, 4-clorofenol,</i> <i>2,4-dinitrofenol, fenol, β-naftol, 2-nitrofenol, 2-tert-butilfenol y 2,4,6-tribromofenol. Los valores</i> <i>representan la media de los datos $\pm$ DS de tres replicas.</i>	59
Tabla 13. <i>Factores y niveles empleados en la realización del diseño multifactorial 4²</i>	76

Tabla 14. *pH y temperatura teórico donde se produce el mayor porcentaje de transformación de 100 ppm de ácido gálico, fenol, 4-clorofenol, β -naftol y 2-tert-butilfenol a 72 horas de incubación, en condiciones de oscuridad.....79*

Tabla 15. *Crecimiento, área de halo de degradación y relación eficiencia enzimática de *Byssomerulis corium* LMB1 en medio de cultivo base (MCB) y medio de cultivo base suplementado (MCBs) con concentraciones de 50, 100 y 500 ppm de ácido gálico, 4-clorofenol, 2,4-dinitrofenol, fenol, β -naftol, 2-nitrofenol, 2-tert-butilfenol y 2,4,6-tribromofenol.105*

Tabla 16. *Crecimiento, área de halo de degradación y relación eficiencia enzimática de *Dictyopanus pusillus* LMB4 en medio de cultivo base (MCB) y medio de cultivo base suplementado (MCBs) con concentraciones de 50, 100 y 500 ppm de ácido gálico, 4-clorofenol, 2,4-dinitrofenol, fenol, β -naftol, 2-nitrofenol, 2-tert-butilfenol y 2,4,6-tribromofenol.106*

Tabla 17. *Crecimiento, área de halo de degradación y relación eficiencia enzimática de *Hyphodonthia* LMB5 en medio de cultivo base (MCB) y medio de cultivo base suplementado (MCBs) con concentraciones de 50, 100 y 500 ppm de ácido gálico, 4-clorofenol, 2,4-dinitrofenol, fenol, β -naftol, 2-nitrofenol, 2-tert-butilfenol y 2,4,6-tribromofenol.108*

Tabla 18. *Crecimiento, área de halo de degradación y relación eficiencia enzimática de *Trametes* LMB15 en medio de cultivo base (MCB) y medio de cultivo base suplementado (MCBs) con concentraciones de 50, 100 y 500 ppm de ácido gálico, 4-clorofenol, 2,4-dinitrofenol, fenol, β -naftol, 2-nitrofenol, 2-tert-butilfenol y 2,4,6-tribromofenol.....109*

Tabla 19. *ANOVA de pH para el extracto enzimático con actividad lacasa de *Dictyopanus pusillus* LMB4.....112*

Tabla 20. *ANOVA de temperatura para el extracto enzimático con actividad lacasa de *Dictyopanus pusillus* LMB4.....112*

Tabla 21. ANOVA de agitación para el extracto enzimático con actividad lacasa de <i>Dictyopanus pusillus</i> LMB4.....	113
---	-----

Tabla 22. ANOVA de concentración de actividad volumétrica ligninolítica para el extracto enzimático con actividad lacasa de <i>Dictyopanus pusillus</i> LMB4.....	114
--	-----

Lista de Figuras

Figura 1. Estructura química de la molécula de fenol.....	22
Figura 2. Estructura tridimensional de lacasa de <i>Trametes versicolor</i> (PDB #1GYC)	33
Figura 3. Ciclo catalítico de la lacasa	34
Figura 4. Estructura tridimensional de lignina peroxidasa de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> (PDB #1LGA).....	35
Figura 5. Ciclo catalítico de lignina peroxidasa	¡Error! Marcador no definido.
Figura 6. Estructura tridimensional de manganeso peroxidasa de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> (PDB #1YYD)	37
Figura 7. Ciclo catalítico de manganeso peroxidasa	38
Figura 8. Características macroscópicas y microscópicas de a) <i>Byssomerulius corium</i> LMB1, b) <i>Dictyopanus pusillus</i> LMB4, c) <i>Hyphodontia</i> LMB5, y d) <i>Trametes</i> LMB15, en AST a 15 días de crecimiento, 25°C.....	54
Figura 9. Crecimiento de a) <i>Byssomerulius corium</i> LMB1, b) <i>Dictyopanus pusillus</i> LMB4, c) <i>Hyphodontia</i> LMB5 y d) <i>Trametes</i> LMB15 en presencia de 50, 100 y 500 ppm de ácido gálico, 4-clorofenol, 2,4-dinitrofenol, fenol, β -naftol, 2-nitrofenol, 2- <i>tert</i> -butilfenol y 2,4,6-tribromofenol a 30 días, 25 °C, en condiciones de oscuridad. Los valores representan la media de los datos $\pm$ DS de tres replicas.	61
Figura 10. Relación eficiencia enzimática de a) <i>Byssomerulius corium</i> LMB1, b) <i>Dictyopanus pusillus</i> LMB4 y c) <i>Hyphodontia</i> LMB5 en presencia de 50, 100 y 500 ppm de ácido gálico, 4-clorofenol, 2,4-dinitrofenol, fenol, β -naftol, 2-nitrofenol y 2,4,6-tribromofenol a 30 días, 25 °C, en condiciones de oscuridad. Los valores representan la media de los datos $\pm$ DS de tres replicas.	

A la derecha se muestra el crecimiento y halo de degradación y/o oxidación donde se produce la mayor REE para cada aislamiento fúngico.63

Figura 11. Oxidación de ABTS como indicativo de actividad lacasa en el extracto enzimático obtenido por *Dictyopanus pusillus* LMB4 durante 30 días en fermentación en estado sólido (SSF), utilizando subproductos lignocelulósicos del beneficio de la palma aceitera. Los valores representan la media de los datos $\pm$ DS de tres replicas.....66

Figura 12. Efecto del pH sobre el extracto enzimático con actividad lacasa (100 UL^{-1}) de *Dictyopanus pusillus* LMB4, en la transformación de 100 ppm de fenol, a 96 horas de incubación, en condiciones de oscuridad. Los valores representan la media de los datos $\pm$ DS de tres replicas.68

Figura 13. Efecto de la temperatura sobre el extracto enzimático con actividad lacasa (100 UL^{-1}) de *Dictyopanus pusillus* LMB4, en la transformación de 100 ppm de fenol, a 96 horas de incubación, en condiciones de oscuridad. Los valores representan la media de los datos $\pm$ DS de tres replicas.70

Figura 14. Efecto de la agitación sobre el extracto enzimático con actividad lacasa (100 UL^{-1}) de *Dictyopanus pusillus* LMB4, en la transformación de 100 ppm de fenol, a 96 horas de incubación, en condiciones de oscuridad. Los valores representan la media de los datos $\pm$ DS de tres replicas.71

Figura 15. Efecto de la actividad lacasa del extracto enzimático de *Dictyopanus pusillu* LMB4, en la transformación de 100 ppm de fenol, a 96 horas de incubación, en condiciones de oscuridad. Los valores representan la media de los datos $\pm$ DS de tres replicas.73

Figura 16. Diagrama de Pareto del diseño de cribado 2^4 en la transformación de fenol a 72 horas, en condiciones de oscuridad. Parámetros: A, temperatura; B, agitación; C, pH; D,

Cantidad de actividad lacasa. La línea azul representa el umbral estadísticamente significativo con IC 95%, mientras que las barras grises y azules resaltan el efecto positivo y negativo, respectivamente.....74

Figura 17. Diagrama de Pareto del diseño de cribado 2^3 en la transformación de fenol a 72 horas, en condiciones de oscuridad. Parámetros: A, pH; B, temperatura; C, agitación. La línea azul representa el umbral estadísticamente significativo con IC 95%, mientras que las barras grises y azules resaltan el efecto positivo y negativo, respectivamente.....75

Figura 18. Superficie de respuesta estimada para la transformación de a) ácido gálico, b) 4-clorofenol, c) fenol d) β -naftol y e) 2-tert-butilfenol a 72 horas, en condiciones de oscuridad, con un intervalo de confianza del 95%.....78

Figura 19. Porcentaje de transformación de 50 (rosado), 100 (morado) y 500 (azul) ppm de a) ácido gálico, b) 4-clorofenol, c) fenol, d) β -naftol y e) 2-tert-butilfenol por 300 U/L de actividad lacasa del extracto enzimático de *Dictyopanus pusillus* LMB4 (cuadrados) y la lacasa comercial de *Trametes versicolor* (círculos), a 96 horas, en condiciones de oscuridad. Los valores representan la media de los datos $\pm$ DS de tres replicas.....82

Figura 20. Transformación de ácido gálico, 4-clorofenol, fenol, β -naftol y 2-tert-butilfenol por a) extracto enzimático con actividad lacasa de *Dictyopanus pusillus* LMB4 y b) lacasa comercial de *Trametes versicolor*. De izquierda a derecha se muestra blanco, 0,12,24,36,48,60,72,84 y 96 horas de reacción.....83

Figura 21. Superficie de respuesta estimada para la transformación de una matriz acuosa simulada que contiene una concentración final de 100 ppm de ácido gálico, fenol, 4-clorofenol, β -naftol y 2-tert-butilfenol, a 72 horas de reacción, en condiciones de oscuridad, con un intervalo de confianza del 95%.84

Figura 22. Porcentaje de transformación de ácido gálico, 4-clorofenol, fenol, β -naftol y 2-*tert*-butilfenol presentes en una matriz acuosa simulada con concentración final de 50 (naranja), 100 (azul) y 500 (rosado) ppm por 300 UL⁻¹ de extracto enzimático con actividad lacasa de *Dictyopanus pusillus* LMB4 (cuadrados) y lacasa comercial de *Trametes versicolor* (circulos) a 96 horas de incubación, en condiciones de oscuridad, pH 5,4 y temperatura 45°C. Los valores representan la media de los datos $\pm$ DS de tres replicas.....86

Figura 23. Prueba de múltiples rangos (Tukey, HSD) para la transformación de 100 ppm de fenol por a) pH, b) temperatura, c) agitación y d) concentración de actividad lacasa a 96 horas, en condiciones de oscuridad.....115

Lista de Apéndices

Apéndice A. Crecimiento, halo y REE de los aislamientos fúngicos.....	105
Apéndice B. ANOVA del extracto enzimático con actividad lacasa de <i>Dictyopanus pusillus</i> LMB4.....	112
Apéndice C. Prueba de Tukey.....	115

Glosario de Abreviaturas

ANOVA: Análisis de varianza

ABTS: Ácido 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

AST: Agar extracto salvado de trigo

EPA: Agencia de Protección Ambiental

EC: Enzyme Commission numbers

LiP: Lignina Peroxidasa

LMMA: Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental

MCB: Medio de cultivo base

MCBs: Medio de cultivo base suplementado

MF: Medio fermentación

MnP: Manganese Peroxidasa

NPRI: Inventario Nacional de Emisiones de Contaminantes

PCB: Policlorobifenilos

PDA: Agar papa dextrosa

PPM: Partes por millón

REE: Relación eficiencia enzimática

RPM: Revoluciones por minuto

SSF: Fermentación estado sólido

UE: Unión Europea

VA: 3,4-dimetoxibencílico

VAD: Aldehído veratrílico

VP: Versátil Peroxidasa

Resumen

Título: Evaluación de la biodegradación de compuestos fenólicos presentes en una matriz acuosa simulada usando extractos enzimáticos ligninolíticos de hongos basidiomicetos autóctonos de Santander. *

Autor: Jesús David Rueda Villabona **

Palabras clave: Enzimas ligninolíticas, Lacasa, Transformación, Compuestos fenólicos, Fenol.

Descripción:

Los fenoles son compuestos orgánicos que presentan uno o más grupos hidroxilo (OH) enlazado a un anillo aromático. Se encuentran en el ambiente en concentraciones $<1 \mu\text{gL}^{-1}$ producto de la fermentación natural de algunos microorganismos. Así mismo, se han reportado en efluentes de industrias de plástico, pinturas, papel, petroquímicas y farmacéuticas en concentraciones de 35 a 2600 mgL^{-1} . La descarga de este tipo de compuestos sin tratamiento previo afecta a los seres vivos debido a su toxicidad. Una alternativa biotecnológica es la exploración de hongos lignocelulolíticos con capacidad de oxidar compuestos xenobióticos, a partir de la producción de enzimas extracelulares como: lacasas y peroxidasas. El objetivo de este trabajo fue determinar la capacidad de transformación que poseen extractos enzimáticos ligninolíticos de hongos basidiomicetos autóctonos de Santander sobre compuestos fenólicos presentes en una matriz acuosa simulada. Se evaluó el potencial de *Byssomerulius corium* LMB1, *Dictyopanus pusillus* LMB4, *Hyphodontia* sp. LMB5, y *Trametes* sp. LMB15 para transformar ácido gálico, 4-clorofenol, fenol, β -naftol, 2-nitrofenol, 2,4-nitrofenol y 2-tert-butilfenol a concentraciones de 50, 100 y 500 ppm. LMB1, LMB4, LMB5 y LMB15 transformaron 3, 7, 1 y 0 compuestos fenólicos respectivamente. Finalmente se seleccionó LMB4 para la producción de extractos enzimáticos ligninolíticos y para evaluar el porcentaje de transformación cuantitativa de los compuestos fenólicos en una matriz acuosa simulada. En el extracto enzimático de LMB4 se determinaron 255 UL^{-1} de actividad lacasa, que permitió una transformación de ácido gálico (67, 73 y 81%), 4-clorofenol (73, 68 y 86%), fenol (71, 85 y 85%), β -naftol (59, 67 y 86%), y 2-tert-butilfenol (48, 60 y 81%) a concentraciones de 50, 100 y 500 ppm respectivamente. El extracto de LMB4 en la matriz acuosa simulada de compuestos fenólicos degradó 50, 100 y 500 ppm en un 52, 66 y 74% respectivamente.

* Trabajo de grado

** Universidad Industrial de Santander. Facultad de salud. Escuela de microbiología. Directora: PhD. Giovanna Rincón Cruz. Codirector: PhD. Andrés Mauricio Rueda Rueda.

Abstract

Title: Evaluation of the biodegradation of phenolic compounds present in a simulated aqueous matrix using ligninolytic enzymatic extracts of native basidiomycete fungi from Santander. *

Author: Jesús David Rueda Villabona **

Keywords: Ligninolytic enzymes, Laccase, Transformation, Phenolic compounds, Phenol.

Description:

Phenols are organic compounds that have one or more hydroxyl (OH) groups attached to an aromatic ring. They are found in the environment in concentrations $<1 \mu\text{gL}^{-1}$ product of the natural fermentation of some microorganisms. Likewise, they have been reported in effluents from the plastic, paint, paper, petrochemical and pharmaceutical industries in concentrations of 35 to $2,600 \text{ mgL}^{-1}$. The discharge of this type of compound without prior treatment affects living beings due to its toxicity. A biotechnological alternative is the exploration of lignocellulolytic fungi with the ability to oxidize xenobiotic compounds, from the production of extracellular enzymes such as laccases and peroxidases. The objective of this work was to determine the transformation capacity of ligninolytic enzymatic extracts of autochthonous Santander basidiomycete fungi on phenolic compounds present in a simulated aqueous matrix. The potential of *Byssomerulius corium* LMB1, *Dictyopanus pusillus* LMB4, *Hyphodontia* sp. LMB5, and *Trametes* sp. LMB15 to transform gallic acid, 4-chlorophenol, phenol, β -naphthol, 2-nitrophenol, 2,4-nitrophenol and 2-tert-butylphenol at concentrations of 50, 100 and 500 ppm. LMB1, LMB4, LMB5 and LMB15 transformed 3, 7, 1 and 0 phenolic compounds respectively. Finally, LMB4 was selected for the production of ligninolytic enzyme extracts and to evaluate the percentage of quantitative transformation of phenolic compounds in a simulated aqueous matrix. 255 UL^{-1} laccase activity was determined in the LMB4 enzyme extract, which allowed a transformation of gallic acid (67, 73 and 81%), 4-chlorophenol (73, 68 and 86%), phenol (71, 85 and 85%), β -naphthol (59, 67 and 86%), and 2-tert-butylphenol (48, 60 and 81%) at concentrations of 50, 100 and 500 ppm respectively. The LMB4 extract in the simulated aqueous matrix of phenolic compounds degraded 50, 100 and 500 ppm by 52, 66 and 74% respectively.

* Trabajo de grado

** Universidad Industrial de Santander. Facultad de salud. Escuela de microbiología. Directora: PhD. Giovanna Rincón Cruz. Codirector: PhD. Andrés Mauricio Rueda Rueda.

Introducción

Los compuestos fenólicos se encuentran presentes en efluentes de industrias de refinación del petróleo, farmacéuticas, resinas, petroquímicas, plásticos, pintura, papel y de madera en concentraciones que van desde 35 a 2600 mgL⁻¹ producto de la fabricación de herbicidas, drogas, pinturas, cosméticos, lubricantes, entre otros (Kulkarni, 2013; Mohammadi *et al.*, 2014; Villegas *et al.*, 2016). La descarga en vertientes de agua de esta clase de compuestos sin tratamiento previo puede ocasionar riesgos para la salud humana, animales y sistemas acuáticos (Pradeep *et al.*, 2015; Sun, Wang, Li, Wang, & Wei, 2015).

Los fenoles se ven asociados al deterioro de ecosistemas acuáticos y terrestres, dado que pueden encontrarse en forma de clorofenoles, nitrofenoles y metilfenoles que modifican e intoxican la flora y fauna existente, causando en humanos y algunos mamíferos acidosis metabólica, anorexia, hiperventilación, insuficiencia renal aguda, afecciones del sistema nervioso central, alteraciones del estado de conciencia, inflamación de tráquea, edema pulmonar, ulceración de piel y mucosas, cáncer, muerte, entre otros (Pradeep *et al.*, 2015; Villegas *et al.*, 2016). Por esta razón han sido catalogados como contaminantes prioritarios por la Agencia de Protección Ambiental de EE. UU. (EPA), el Inventario Nacional de Emisiones de Contaminantes (NPRI) de Canadá y la Unión Europea (UE) (Singh, Bhatiya, Mishra, & Srivastava, 2020; Villegas *et al.*, 2016).

Dadas las implicaciones ambientales y en salud de los compuestos fenólicos, se han empleado diferentes metodologías físico-químicas para la remoción de fenoles en aguas residuales, entre las que se encuentran: destilación por arrastre con vapor, extracción líquido-líquido, adsorción, extracción en fase sólida, oxidación en aire húmedo, oxidación electroquímica, fotooxidación, ozonización, reacción de Fenton, procesos de membrana y UV/H₂O₂ (Kulkarni, 2013; Pradeep *et al.*, 2015). Sin embargo, los procesos físico-químicos no son eficaces en la eliminación total de

compuestos fenólicos presentes en aguas residuales, razón por la cual se ha comenzado a implementar el uso de microorganismos como: bacterias, hongos o sus enzimas para la degradación de compuestos de naturaleza fenólica (Pradeep *et al.*, 2015; Villegas *et al.*, 2016).

Diferentes autores han evidenciado que levaduras (Especies de *Candida*), bacterias (*Pseudomonas putida*, *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus subtilis*) y en especial hongos filamentosos descomponedores de la madera (*Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*) han presentado capacidad de degradar compuestos fenólicos presentes en efluentes industriales por medio de su maquinaria enzimática de tipo oxidorreductasa (Ajaz, Noor, Rasool, & Khan, 2004; Jiang, Cai, Wu, & Ren, 2010; Pradeep *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2011).

Entre las diferentes enzimas producidas por hongos se encuentran: catalasas (lacasa y tirosinasa) y peroxidasas (manganeso peroxidasa, lignina peroxidasa y versátil peroxidasa), capaces de catalizar una amplia gama de sustratos aromáticos, incluidos derivados del fenol como: bencenotioles, polifenoles e hidrocarburos aromáticos policíclicos, entre otros (Ku, 2015; Ting, Yuan, Wu, & Chang, 2011; J. Zhang, Liu, Xu, Chen, & Yang, 2008). *Phanerochaete chrysosporium* fue el primer hongo basidiomiceto reportado en la degradación de contaminantes orgánicos como los clorofenoles y policlorobifenilos (PCB) y ha servido de modelo para estudiar la degradación de otros compuestos xenobióticos (Lu *et al.*, 2009; Zouari, Labat, & Sayadi, 2002). Así mismo, *Trametes versicolor* y sus enzimas ligninolíticas han sido estudiados en la degradación de 2,4-diclorofenol, 4-clorofenol, 2-clorofenol, tetrabromobisfenol A, 4-bromofenol y 2,4-dibromofenol (Uhnáková, Petr, Papoušková, Šulc, & Martínková, 2009; Y. Zhang *et al.*, 2012).

Basados en la capacidad enzimática que poseen los hongos de la podredumbre blanca sobre la degradación de compuestos xenobióticos y recalcitrantes, es de interés biotecnológico evaluar aislamientos fúngicas de la división basidiomicota resguardadas en el Cepario del laboratorio de

Microbiología y Mutagénesis Ambiental de la Universidad Industrial de Santander (LMMA-UIS), sobre concentraciones de 50, 100 y 500 ppm de ácido gálico, 4-clorofenol, 2,4-dinitrofenol, fenol, β -naftol, 2-nitrofenol, 2-*tert*-butilfenol y 2,4,6-tribromofenol, de las cuales se puedan obtener extractos enzimáticos ligninolíticos con capacidad de transformar compuestos fenólicos en diferentes condiciones de pH y temperatura, para su postulación sobre tratamiento de aguas residuales y/o procesamiento de vertimientos en procesos industriales.

1. Hipótesis

Los hongos basidiomicetos del Cepario del laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental de la Universidad Industrial de Santander (LMMA-UIS) poseen enzimas ligninolíticas capaces de transformar compuestos fenólicos en sustancias químicas menos contaminantes.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Determinar la capacidad de biodegradación que poseen extractos enzimáticos ligninolíticos de hongos basidiomicetos autóctonos de Santander sobre compuestos fenólicos presentes en una matriz acuosa simulada.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1. Seleccionar aislamientos fúngicos ligninolíticos con capacidad de tolerar compuestos fenólicos.

2.2.2. Determinar las condiciones de pH, agitación, temperatura y relación enzima: sustrato que favorezcan la transformación de compuestos fenólicos.

2.2.3. Evaluar la biodegradación de compuestos fenólicos presentes en una matriz acuosa simulada usando extractos enzimáticos ligninolíticos.

3. Marco teórico y estado del arte

3.1 Aspectos fisicoquímicos de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son compuestos orgánicos aromáticos derivados del benceno, se caracterizan por presentar en su estructura química uno o más grupos hidroxilo (OH) ligado directamente a un anillo aromático (**Figura 1**), a temperatura ambiente se encuentran como líquidos incoloros o sólidos blancos (Asadgol, Forootanfar, Rezaei, Mahvi, & Faramarzi, 2014; Mohammadi et al., 2014). Los fenoles sustituidos se nombran frecuentemente como derivados del fenol, en la **Tabla 1** se evidencian algunas propiedades fisicoquímicas de estos compuestos (Michałowicz & Duda, 2007; Mohammadi et al., 2014). Los compuestos fenólicos presentan propiedades análogas a los alcoholes, sin embargo, forman enlaces de hidrógeno fuertes, presentan mayor solubilidad en agua y tienen puntos de ebullición más altos que los alcoholes (Rappoport, 2003).

Figura 1. Estructura química de la molécula de fenol

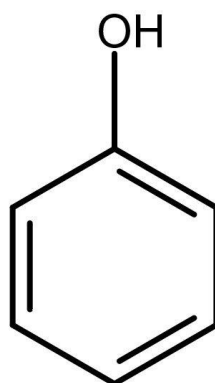


Tabla 1.*Propiedades físicas y químicas del fenol*

Propiedades	Valores	Unidades
Peso molecular	94.11	g/mol
Punto de fusión	40.91	°C
Punto de ebullición	181.75	°C
Densidad	1.07	g/cm ³
Punto de inflamación	79	°C
Acidez en el agua (pKa)	9.89	-
Solubilidad en agua (20 °C)	8.3	g fenol/100 mL H ₂ O (wt. %)
Solubilidad en agua (25 °C)	8	
Presión de vapor	0.35	mm Hg

Nota: Michałowicz & Duda, 2007; Mohammadi *et al.*, 2014

3.2 Compuestos fenólicos en efluentes

Los compuestos fenólicos en efluentes se atribuyen a fuentes naturales y antropogénicas (Anku, 2017; Villegas et al., 2016). Las fuentes naturales de contaminación de compuestos fenólicos en aguas se encuentran a una concentración $<1 \mu\text{gL}^{-1}$ e incluyen la síntesis por microorganismos y plantas, y la descomposición de plantas y animales (Anku, 2017; Pradeep et al., 2015; Villegas et al., 2016). Las fuentes antropogénicas de contaminación del agua con compuestos fenólicos se atribuyen a industrias como refinación de petróleo, productos petroquímicos, productos farmacéuticos, fabricación de resina, plásticos, pintura, pulpa, papel y productos de madera (Musa

et al, 2018; Pradeep et al., 2015; Villegas et al., 2016). En la **Tabla 2** se evidencian los compuestos fenólicos de mayor presencia en efluentes industriales y sus concentraciones.

Tabla 2.

Compuestos fenólicos generados en efluentes industriales y su concentración

Industria	Compuesto generado	Concentración fenoles totales, mg /L	Referencia
Refinería de petróleo	Fenoles, cresoles, clorofenoles, metilfenoles y bifenilos.	40 – 185	(Rodríguez delgado et al., 2016; L. Yan et al., 2014)
Petroquímica	Fenoles, cresoles, nitrofenoles e hidroquinonas.	200 – 1220	(Abdelwahab, Amin, & El-ashtoukhy, 2009)
Farmacéutica	Ácidos fenil acéticos y fenoles.	0.01 – 1	(Upadhyay, Shrivastava, & Kumar, 2016)
Papelera	Ácidos fenil propiónicos, fenoles y clorofenoles.	22	(Kumaran y Paruchuri, 1997)
Fibras sintéticas	Bisfenoles	100 – 150	(Kumaran y Paruchuri, 1997)

Manufactura de compuestos químicos	Amino fenoles, fenoles y nitrofenoles.	40 – 2564	(Kumaran y Paruchuri, 1997)
Fabricación de resinas	Fenoles, cresoles y xilenoles.	1270 – 1600	(Yamasaki, Makihata, & Fukunaga, 2006)
Pintura	Fenoles	1.1	(Anku, 2017)
Madera	Fenoles	50 – 953	(Anku, 2017)

Nota: Adaptado de (Girish & Murty, 2014)

3.3 Efectos del fenol y sus derivados

Los fenoles, bisfenoles, clorofenoles, nitrofenoles y cresoles se incorporan en los ecosistemas resultado del drenaje de aguas residuales en aguas superficiales (Chang et al., 2011; Mukherjee & Basak, 2013; Villegas et al., 2016). La mayoría de los compuestos fenólicos se encuentran clasificado por la EPA como sustancias peligrosas debido a su toxicidad y baja biodegradabilidad (EPA, 2014). Los compuestos fenólicos pueden causar efectos agudos (malestar gastrointestinal, dolores de cabeza, irritación de la piel, los ojos y membranas mucosas) o crónicos (anorexia, pérdida de peso, diarrea, vértigo, salivación, una coloración oscura de la orina, irritación, daños en el sistema gastrointestinal, sistema nervioso central y en los tejidos hepático, renal y cardiovascular de los animales) en los seres vivos, dependiendo la concentración a la que se encuentren expuestos (Chang et al., 2011; Mukherjee & Basak, 2013; Villegas et al., 2016). En la **Tabla 3** se muestran los principales efectos que tienen los compuestos fenólicos sobre los seres vivos.

Tabla 3.*Efectos nocivos generado a los seres vivos por compuestos fenólicos*

Compuesto fenólico	Efecto nocivo	Referencia
Fenoles	Fatiga muscular, erupciones cutáneas, diarrea.	(Alshabib & Onaizi, 2019; Kulkarni, 2013; Villegas et al., 2016; Wang et al., 2011)
	Broncoconstricción y efectos adversos en pulmones de humanos y ratas.	
	Muerte de glóbulos rojos en humanos.	
	Modifica la biota acuática	
	Marchitamiento y muerte de plantas.	
Bisfenoles	Trastorno metabólico y anormalidades en bebes humanos.	(Alshabib & Onaizi, 2019; Garcia, Torres, Parra, & Mahlknecht, 2015; Lassouane, Aït-amar, Amrani, & Rodriguez-couto, 2019; Vom, F. S. et al., 2007)
	Cáncer en glándulas mamarias y prostáticas	
	Inducción mutaciones e interrupciones en los sistemas de reproducción en animales.	
Clorofenoles	Infecciones del tracto digestivo, asma, enfermedades cardiacas y sarcoma en humanos.	(Alshabib & Onaizi, 2019; Ge et al., 2017; Igbinosa et al., 2013)

	Estrés oxidativo, mutaciones en el ADN y cáncer de pulmón en organismos vivos. Alteración de órganos del sistema endocrino en organismos acuáticos. Afecta negativamente el crecimiento celular o induce mutaciones genéticas en peces.	
Cresoles	Problemas cardiovasculares. Suprime la formación de coágulos sanguíneos. Reducción de la producción de especies reactivas de oxígeno en humanos, lo que conduce a trastornos hemorrágicos.	(Alshabib & Onaizi, 2019; Chang et al., 2011; Peng et al., 2013)
Nitrofenoles	Induce cambios en los tejidos testiculares. Disminución de la cantidad de hormonas en plasma. Dificulta el proceso de transcripción, afectando el nivel de genes del sistema tiroideo. Suprime la vía de señalización del receptor de andrógenos.	(Ceylan & Turgay, 2016; Tang, Song, Watanabe, Nagaoka, & Rui, 2016; Wu et al., 2016; H. Zhang, Taya, Nagaoka, Yoshida, & Watanabe, 2017)

Debido a los efectos nocivos que tienen los compuestos fenólicos en los seres vivos, se han establecido límites de descarga para los compuestos fenólicos en cuerpos de agua (Pradeep et al., 2015; Villegas et al., 2016). La EPA, ente internacional encargado de regular los parámetros y valores máximos permisibles en cuerpos de agua residual, ha establecido que el agua superficial debe contener menos de 1 parte por billón (ppb) de fenol (EPA, 2014). En Colombia, el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, ente regulador nacional establece en la resolución 0883 del 18 de mayo de 2018 que el valor máximo permisible de fenoles totales en los vertimientos de cuerpos de aguas residuales domésticas y no domésticas es de 0.1 y 0.2 ppm respectivamente.

3.4 Métodos de transformación de compuestos fenólicos en efluentes

Se han descrito métodos físicos, químicos y biológicos para remover fenoles de aguas residuales industriales (Villegas et al., 2016). Dentro de los métodos fisicoquímicos se incluye adsorción, destilación, extracción líquido-líquido, oxidación y separación basada en membranas (Villegas et al., 2016).

En la adsorción se utilizan materiales adsorbentes como carbonos activados, zeolitas, grafeno, arcillas y cáscara de arroz pirolizado para captar selectivamente los fenoles de las corrientes de aguas residuales a través de interacciones físicas o químicas (Ramírez, Asunción, Saucedo, Martínez, & Velasco, 2016). En la destilación, los compuestos fenólicos son separados del agua en función a su volatilidad relativa (Mohammadi et al., 2014). En la extracción líquido-líquido, los fenoles se recuperan de soluciones acuosas en función de las solubilidades relativas con la ayuda de disolventes extractivos como tolueno, n-hexano, ciclohexano, entre otros (Abbassian, Kargari, & Kaghazchi, 2015).

En la oxidación de aire húmedo, los fenoles se oxidan cuando se exponen al oxígeno o al aire a alta presión y a alta temperatura; en la oxidación catalítica de aire húmedo, los fenoles se oxidan por oxígeno o aire a alta presión y alta temperatura en presencia de catalizadores; en la oxidación química, se utilizan ozono, peróxido de hidrógeno, cloro, permanganatos y ferratos para oxidar los fenoles en las aguas residuales; en la oxidación electroquímica directa los fenoles se adsorben físicamente por radicales hidroxilos o químicamente por el oxígeno activo directamente en la superficie del ánodo; en la oxidación electroquímica indirecta, se utilizan cloro o hipoclorito con peróxido de hidrógeno e iones metálicos como intermediarios en el proceso de destrucción de fenoles; en la fotooxidación los fenoles se degradan bajo irradiación UV en presencia de agentes oxidantes (Kulkarni, 2013; Villegas et al., 2016; Zhou, Cao, Descorme, & Xie, 2018). En las técnicas de separación basadas en membrana, la separación de fenoles de las corrientes de aguas residuales es impulsada por el cambio en el gradiente de concentración o el gradiente de presión transmembrana (Kulkarni, 2013; Villegas et al., 2016).

Dentro de los métodos biológicos se incluye el uso de bacterias, *Pseudomonas* spp., *Corynebacterium* spp., *Proteus* spp., *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp.; microalgas, *Chlorella* spp., *Chlamydomonas* spp.; levaduras, *Rhodotorula* spp., *Trichosporon* spp. y hongos filamentosos, *Aspergillus* spp., *Trametes* spp., *Pleurotus* spp., *Phanerochaete* spp., o sus enzimas, catalasas y peroxidasas, para la transformación de compuestos fenólicos (Mukherjee & Basak, 2013; Pradeep et al., 2015; Villegas et al., 2016). Estos microorganismos tienen la capacidad de incorporar los compuestos fenólicos a su metabolismo en un ambiente aerobio o anaerobio y usarlos como nutrientes, fuentes de carbono o energía e intermediarios para la producción de metabolitos primarios o secundarios, mediante procesos de oxidación, reducción, carboxilación y

dihidroxilación (Chiong, Lau, Khor, & Danquah, 2014; Krastanov, Alexieva, & Yemendzhiev, 2013; Mishra & Kumar, 2017; Villegas et al., 2016).

3.5 Hongos en la transformación de compuestos fenólicos

Los hongos macromicetes de la división *Basidiomycota* son los organismos más empleados en la degradación de contaminantes recalcitrantes como: fenoles, naftoles, bisfenoles, colorantes textiles fenólicos o no fenólicos, compuestos aromáticos halogenados, hidrocarburos poliaromáticos, debido a su capacidad de producir enzimas extracelulares como catalasas y varios tipos de peroxidasas como manganeso peroxidasa (MnP), lignina peroxidasa (LiP), versátiles peroxidasas (VP) y peroxidasas decolorantes (Ku, 2015).

A partir de las enzimas ligninolíticas obtenidas a nivel fúngico se han dilucidado tres mecanismos principales para la degradación o transformación de contaminantes ambientales, I) sistema mediadores de despolimerización de la lignina, que se realiza mediante el uso de radicales libres generados por enzimas extracelulares (peroxidasas y oxidasas) y ácidos orgánicos, que se encargan de realizar ataques oxidativos a moléculas orgánicas, II) fase I del metabolismo, donde intervienen las enzimas citocromo P-450 monooxigenasas, que se encargan de introducir un átomo de oxígeno en las moléculas contaminantes transformándolas en moléculas más polares e hidrosolubles y III) fase II del metabolismo, donde un grupo de enzimas cataliza reacciones de conjugación reduciendo las moléculas contaminantes, haciéndolas más solubles en agua, menos tóxicas y más fácilmente eliminables (González Rodríguez & Guerra Rodeiro, 2014; Quintero, 2011). En la **Tabla 4** se muestran enzimas ligninolíticas producidas por hongos basidiomicetes con capacidad para degradar compuestos fenólicos (Ku, 2015).

Tabla 4.*Compuestos fenólicos degradados por enzimas de hongos basidiomicetos*

Compuesto	Enzima	Fuente de enzima	Referencia
Fenol	Lacasa	<i>Trametes versicolor</i>	(Kurniawati & Nicell, 2008; Y. Zhang <i>et al.</i> , 2012)
		<i>Paraconiothyrium variable</i>	(Asadgol <i>et al.</i> , 2014)
		<i>Pleurotus ostreatus</i>	(Hublik & Schinner, 2000)
		<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	(Reddy & Gold, 2018)
	Lignina peroxidasa		
	Polifenol oxidasa	<i>Trametes trogii</i>	(Paper, 1998)
	Manganeso peroxidasa	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	(Reddy & Gold, 2018)
Bisfenol A	Lacasa	<i>Trametes pubescens</i>	(Sgorbini <i>et al.</i> , 2015)
2,4-Diclorofenol,		<i>Pycnoporus sanguineus</i>	(Rodríguez <i>et al.</i> , 2016)
4-Clorofenol,	Lacasa	<i>Trametes versicolor</i>	(J. Zhang <i>et al.</i> , 2008)
2-Clorofenol			
Clorofenoles,			
cresoles,	Lacasa	<i>Trametes sanguineus</i>	(Balcázar <i>et al.</i> , 2016)
nitrofenoles			

Pentaclorofenol	Lacasa	<i>Pleurotus ostreatus</i>	(Ashe et al., 2016)
4- <i>tert</i> -butilfenol, 4- <i>tert</i> -octilfenol	Lacasa	<i>Myceliophthora thermophila</i>	(Nguyen et al., 2016)

Nota: Adaptado de Ku, 2015

3.5.1. Enzimas ligninolíticas

Las enzimas ligninolíticas, lacasa (EC. 1.10.3.2), lignina peroxidasa (EC. 1.11.1.14) y manganeso peroxidasa (EC. 1.11.1.13), son un complejo de enzimas versátiles principalmente ubicadas en la naturaleza, involucradas en la despolimerización de la lignina (Cullen D & Kersten PJ, 2004; Pradeep et al., 2015). La capacidad de las enzimas ligninolíticas de mineralizar la lignina, un compuesto químicamente complejo, ha llevado a los investigadores a estudiar el uso de catalasas y peroxidases en la transformación de compuestos xenobióticos y recalcitrantes como: colorantes, pesticidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos, compuestos fenólicos entre otros (Pradeep et al., 2015; Quintero, 2011; Villegas et al., 2016; Wong, 2009).

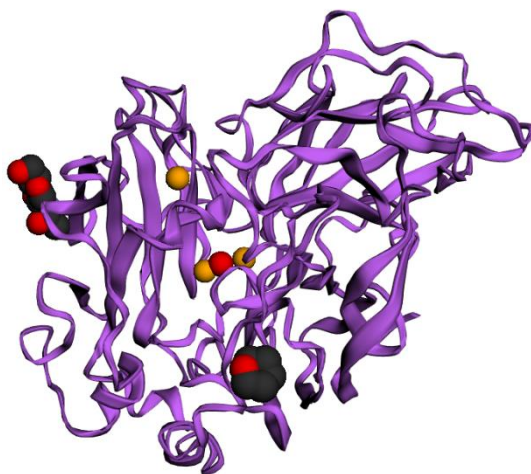
3.5.1.1. Lacasa

Las lacasas pertenecen a una familia de enzimas multi cobre que combinan la reducción de cuatro electrones de oxígeno con la oxidación de una amplia gama de sustratos orgánicos, incluidos fenoles, polifenoles, anilinas e incluso ciertos compuestos inorgánicos mediante un mecanismo de transferencia de un electrón (Kunamneni, Plou, Ballesteros, & Alcalde, 2008). Se distribuyen ampliamente en plantas y hongos superiores, así mismo, han sido reportadas en insectos y bacterias (Asadgol et al., 2014).

Las lacasas fúngicas son comúnmente producidas como isoenzimas con estructuras proteicas monoméricas o diméricas (Piontek, Antorini, & Choinowski, 2002). Las proteínas monoméricas tienen una masa molecular que oscila entre 50 y 110 kDa, con un punto isoelectrico cercano a pH

4 y con una temperatura de reacción óptima media de 55°C (25 a 80 °C) (Kunamneni et al., 2008; Wong, 2009; Yang et al., 2017). Se ha reportado que la mayoría de hongos basidiomicetos produce más de un tipo de isoenzima (Kunamneni et al., 2008). Sin embargo, muestran una arquitectura similar que consiste en tres dominios dispuestos secuencialmente de una estructura de tipo β -barril, relacionada con pequeñas proteínas de cobre azul, como la azurina y la plastocianina (**Figura 2**) (Piontek et al., 2002; Strong & Claus, 2011).

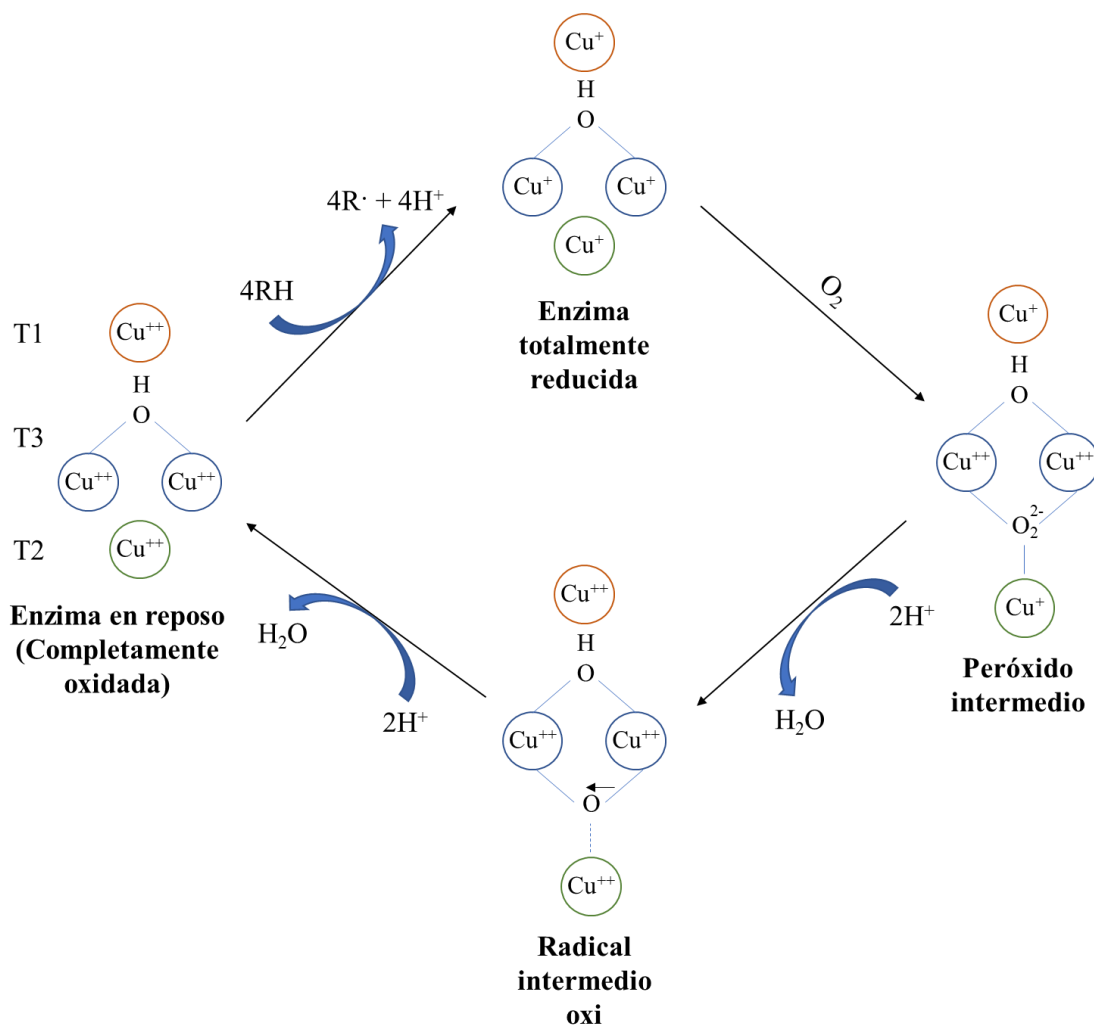
Figura 2. Estructura tridimensional de lacasa de *Trametes versicolor* (PDB #1GYC)



La lacasa en forma de holoenzima activa, es una glucoproteína dimérica o tetramérica, que contiene cuatro átomos de cobre, que se dividen en tres tipos, T1 es un cobre azul paramagnético, T2 es un cobre no azul paramagnético, mientras que T3 son un par diamagnético de cobre-cobre acoplado por rotación (Kunamneni et al., 2008; Wong, 2009; Yang et al., 2017). Los átomos de cobre son esenciales en el mecanismo catalítico, existen tres pasos principales en la catálisis de lacasa, I) T1 se reduce mediante un sustrato reductor, que por lo tanto se oxida, II) el electrón se transfiere internamente desde el T1 a un grupo trinuclear formado por los átomos de T2 y T3,

formando un peróxido intermedio y III) la molécula de O_2 se reduce a agua en el grupo trinuclear (Figura 3) (Wong, 2009). La lacasa fúngica es importante en la formación de pigmentos en las esporas, la desintoxicación de compuestos fenólicos producidos durante la degradación de la lignina y actúa sinérgicamente con las peroxidasa y otras enzimas en la descomposición de la lignina (Wong, 2009).

Figura 3. Ciclo catalítico de la lacasa



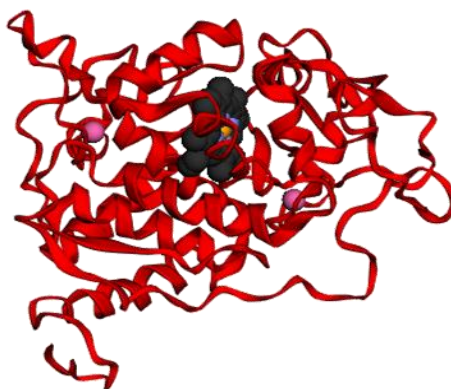
Nota: Adaptado de Wong, 2009

3.5.1.2. Lignina peroxidasa

Lignina peroxidasa pertenece a una familia de enzimas hemo peroxidadas clase II, que contiene un grupo hemo que cataliza la oxidación de varios sustratos orgánicos e inorgánicos en presencia de peróxido de hidrógeno como aceptor de electrones y ha sido descrita en bacterias y hongos (Falade et al., 2017; Wong, 2009).

Lignina peroxidasa (LiP) de origen fúngico, se produce generalmente como isoenzimas monoméricas (Falade et al., 2017; Wong, 2009). Las isoenzimas son glucoproteínas de 38 – 46 kDa, con un punto isoeléctrico que varía de 3.2 a 4, con una propiedad distintiva de presentar un pH óptimo cercano a 3 (Falade et al., 2017; Wong, 2009). Se ha reportado que en hongos basidiomicetos puede generar diferentes isoformas (Falade et al., 2017). Sin embargo, muestran una estructura globular similar, compuesta por un dominio proximal (C-terminal) y distal (N-terminal) que recubren el grupo hemo, ocho hélices α mayores y ocho menores y una estructura β limitada en el dominio proximal (**Figura 4**) (Wong, 2009).

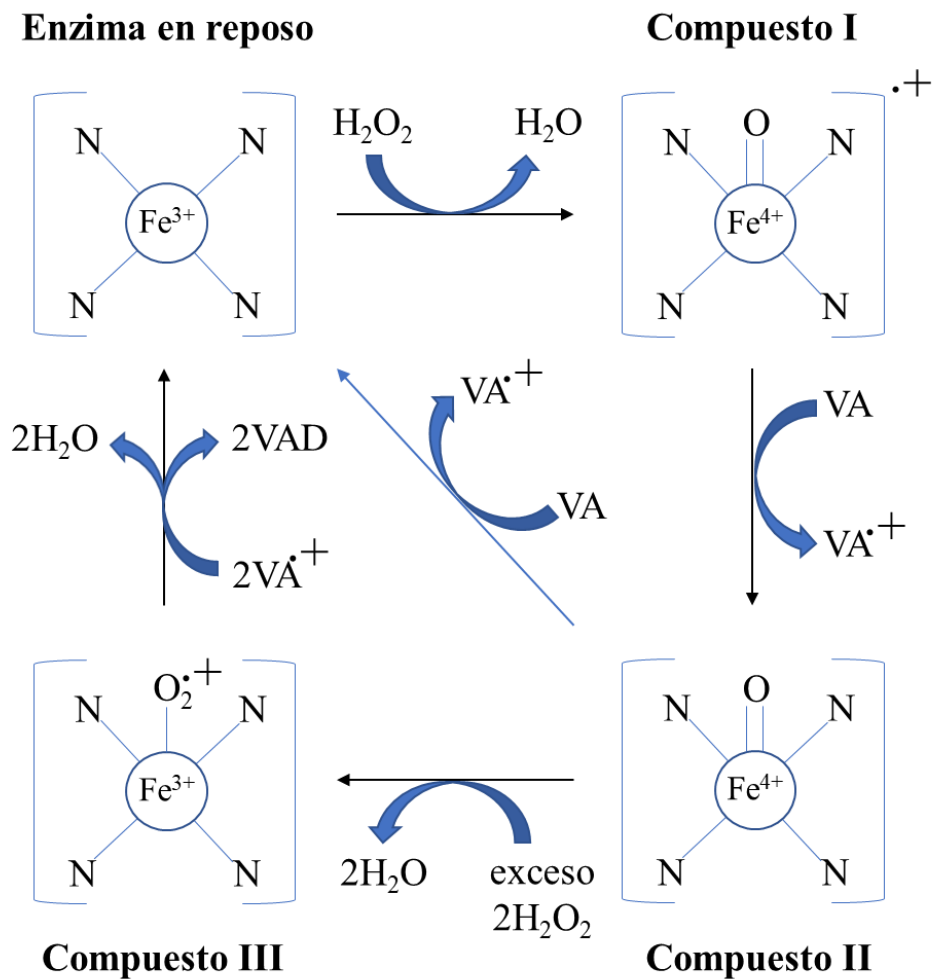
Figura 4. Estructura tridimensional de lignina peroxidasa de *Phanerochaete chrysosporium* (PDB #1LGA)



El ciclo catalítico de lignina peroxidasa implica tres pasos: 1) la oxidación de la enzima férrica en reposo por el peróxido de hidrógeno como un aceptor de electrones que da como resultado la

formación del compuesto I; 2) el compuesto I se reduce por una molécula de sustrato aromático no fenólico para formar el compuesto II; 3) una segunda reducción del compuesto II por el sustrato reducido forma el compuesto III; devolviendo así la LiP al estado de oxidación férrica en reposo que indica la finalización del ciclo de oxidación (Abdel, Solbiati, & Cann, 2013; Falade et al., 2017; Wong, 2009). En algunos casos, el compuesto I puede volver a la enzima en estado de reposo por una segunda reducción directa (**Figura 5**).

Figura 5. Ciclo catalítico de lignina peroxidasa



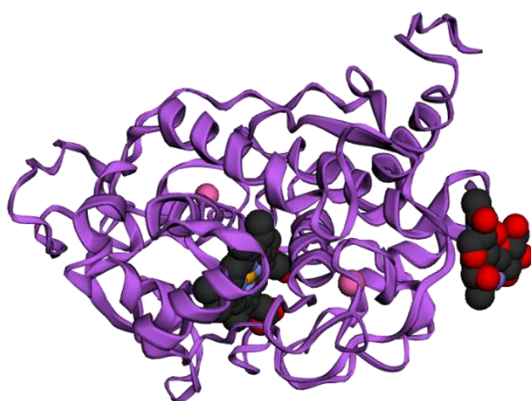
Nota: Adaptado de Wong, 2009

3.5.1.2. Manganese peroxidasa

Manganese peroxidasa pertenece a una familia de enzimas hemo peroxidadas clase II, que contiene un grupo hemo que cataliza la oxidación de varios sustratos orgánicos e inorgánicos en presencia de peróxido de hidrógeno como aceptor de electrones, su expresión y producción se encuentra regulada por la presencia de Mn^{2+} y ha sido obtenida únicamente en algunos hongos basidiomicetos (Hofrichter, 2002; Qin, Zhang, Zhang, & Yang, 2014; Wong, 2009).

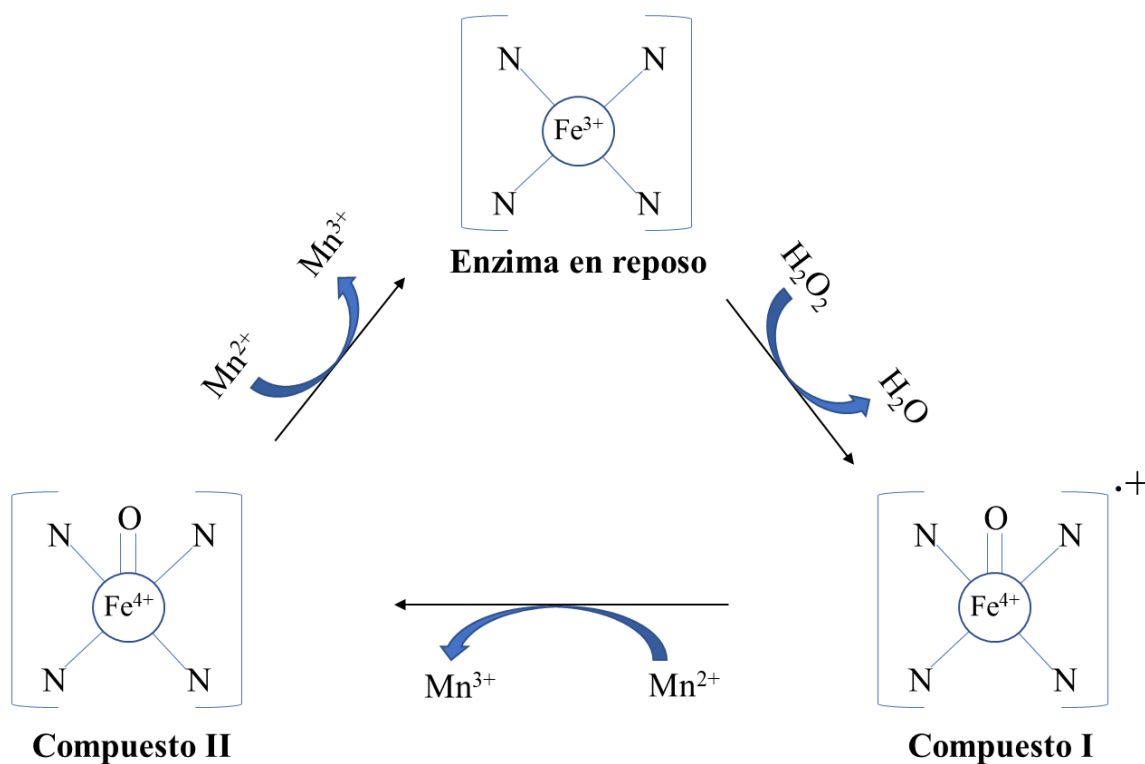
Manganese peroxidasa (MnP) es una isoenzima monomérica con peso molecular que varía de 38 a 62.5 kDa según las isoformas de MnP. Sin embargo, la mayoría de enzimas purificadas tienen un peso molecular de 45 kDa, con un punto isoeléctrico de 3 a 4 (Hofrichter, 2002; Hosseinzadeh et al., 2016; Wong, 2009). MnP muestra una estructura globular similar a LiP, compuesta por un dominio proximal (C-terminal) y distal (N-terminal) que recubren el grupo hemo, diez hélices principales y una hélice menor (**Figura 6**) (Hosseinzadeh et al., 2016; Wong, 2009).

Figura 6. Estructura tridimensional de manganeso peroxidasa de *Phanerochaete chrysosporium* (PDB #1YYD)



El ciclo catalítico de manganeso peroxidasa inicia con la oxidación de la enzima férrica en reposo por el peróxido de hidrógeno como un aceptor de electrones que da como resultado la formación del compuesto I, MnP regresa al estado de reposo en dos pasos consecutivos de oxidación de un electrón, convirtiendo dos equivalentes de Mn^{2+} en Mn^{3+} durante el proceso, el Mn resultante (Mn^{3+}) sale del sitio activo (**Figura 7**) (Hofrichter, 2002; Hosseinzadeh et al., 2016; Wong, 2009).

Figura 7. Ciclo catalítico de manganeso peroxidasa



Nota: Adaptado de Wong, 2009

4. Metodología

4.1 Aislamientos fúngicos

Cuatro aislamientos fúngicos del Cepario del Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental de la Universidad Industrial de Santander (LMMA-UIS), pertenecientes a los géneros *Byssomerulius* sp., *Dictyopanus* sp., *Hyphodontia* sp., y *Trametes* sp. fueron usados para el desarrollo de este proyecto. La pureza de los aislamientos fúngicos se realizó mediante el crecimiento en agar papa dextrosa (PDA) a 25 °C durante 15 días, para la observación de las características macroscópicas del cultivo fúngico y montaje entre lámina y laminilla con azul de lactofenol para la observación de las características microscópicas de los aislamientos. Adicionalmente se corroboró la identidad de los aislamientos mediante la amplificación de las regiones espaciadoras transcritas internas (ITS) del ADN ribosómico. El ADN genómico total de los aislados fúngicos fue extraído siguiendo un protocolo estándar de fenol-cloroformo (Płaza, Upchurch, Brigmon, Whitman, & Ulfig, 2004), seguido por la amplificación de la ITS por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los cebadores universales para hongos (ITS1/ITS4). El producto de la PCR obtenido fue separado en geles de agarosa al 1% y su peso molecular fue verificado usando un marcador de peso molecular de un kiloBase, tanto los productos de PCR y el marcador en el gel fueron visualizados usando el colorante *GelRed*. La secuenciación de los productos se realizó por el método de Sanger usando el cebador ITS1 en el Génome Québec Innovation Centre (McGill University, Montreal, Canada). La identificación molecular se realizó por alineamiento de la secuencia obtenida usando *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) usando el servidor del *National Center for Biotechnology Information*. La inducción de las enzimas ligninolíticas en los aislamientos fúngicos se realizó mediante el crecimiento en agar extracto salvado de trigo, (AST) (**Tabla 5**) (Rueda et al., 2020), durante 15 días a 25 °C (Fernández & Pedroza, 2009).

Tabla 5.*Composición del medio cultivo agar extracto salvado de trigo,*

Composición	Cantidad (g/L)
Glucosa	10
Peptona	5
Extracto de levadura	2
KH ₂ PO ₄	0.1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1
MnSO ₄	0.085
Agar	15
Extracto salvado trigo	1000 mL

4.2 Selección cualitativa de aislamiento fúngico con capacidad de transformación de compuestos fenólicos.

La selección del aislamiento fúngico con la mayor capacidad de transformar compuestos fenólicos a diferentes concentraciones se realizó cualitativamente mediante la técnica dilución en placa, utilizando medio de cultivo base (MCB) como control (**Tabla 6**) y medio de cultivo base suplementado (MCBs) con concentraciones de 50, 100 y 500 ppm de cada uno de los compuestos fenólicos evaluados (Saha, Taylor, Bewtra, Asce, & Biswas, 2011). Los compuestos fenólicos evaluados fueron ácido gálico, 4-clorofenol, 2,4-dinitrofenol, fenol, β-naftol, 2-nitrofenol, 2-*tert*-butilfenol y 2,4,6-tribromofenol de grado analítico marca Merck (Darmstadt, Alemania). Los medios de cultivo se esterilizaron a 121°C, por 15 minutos y los compuestos fenólicos fueron

filtrados con membrana de acetato 0.2 μm y adicionados a los medios de cultivos estériles antes de la gelificación usando una cabina de seguridad biológica tipo IIA.

Tabla 6.

Composición del medio cultivo base

Composición	Cantidad (g/L)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.4
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.3
KH_2PO_4	2
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.4
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.25
Urea	0.3
Peptona	0.75
Extracto de levadura	0.2
Glucosa	10
$(\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$	0.005
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.0016
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0014
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0037
Agar	15

Nota: Saha, Taylor, Bewtra, Asce, & Biswas, 2011

Los MCBs con los compuestos fenólicos a las diferentes concentraciones evaluadas y los MCB, se inocularon con un disco de 5 mm de diámetro de los aislamientos fúngicos con un crecimiento

previo de 15 días en AST. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se incubaron a 25°C en condiciones de oscuridad, por un periodo de 30 días. Se realizaron mediciones diarias del diámetro de crecimiento de la colonia y del halo de degradación y/o oxidación, indicativo de la actividad catalasa y/o peroxidasa extracelular de los aislamientos fúngicos. Las mediciones se realizaron empleando un calibrador de tornillo de ajuste Ubermann (Camacho, Gerardo, Navarro, & Sánchez, 2017; Papinutti & Forchiassin, 2007).

La selección del aislamiento fúngico con la mayor capacidad de transformar cualitativamente compuestos fenólicos se realizó mediante la determinación de la relación eficiencia enzimática (REE) calculada usando la **Ecuación 1** (Ang, Ngoh, Seak, & Chua, 2011).

$$\text{REE} = \frac{\text{Área de halo}}{\text{Área de colonia}} (\text{Ecuación 1})$$

4.3 Obtención extractos enzimáticos ligninolíticos

La producción del extracto enzimático ligninolítico del aislamiento fúngico seleccionado en el ensayo cualitativo (Sección 3.2), se realizó mediante fermentación en estado sólido (SSF), usando erlenmeyers de 250 mL que contenía cada uno 2.5 g de raquis de palma, como sustrato y 12 mL de medio de fermentación (MF) (**Tabla 7**). Cada erlenmeyer que contenía el raquis de palma y el medio de fermentación fue inoculado con 8 discos de 5 mm de diámetro con 15 días del crecimiento fúngico en AST (Rueda et al., 2020). Se usó como blanco de fermentación erlenmeyers bajo las mismas condiciones antes descritas sin inóculo fúngico. Todos los erlenmeyers se incubaron a 25°C, durante 30 días, sin agitación, 60% de humedad y en condiciones de oscuridad (Deswal, Khasa, & Kuhad, 2011; X. Xu, Lin, Zang, & Shi, 2017).

Tabla 7.*Composición medio de fermentación*

Composición	Cantidad (g/L)
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.4
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.3
KH ₂ PO ₄	2
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.4
CuSO ₄ .5H ₂ O	1.25
Urea	0.3
Peptona	0.75
Extracto de levadura	0.2
Glucosa	10
(FeSO ₄ .7H ₂ O	0.005
MnSO ₄ .H ₂ O	0.0016
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.0014
CoCl ₂ .6H ₂ O)	0.0037

Nota: Deswal, Khasa, & Kuhad, 2011; X. Xu, Lin, Zang, & Shi, 2017

Para establecer el tiempo de fermentación, la obtención de los extractos enzimáticos se realizó por triplicado cada dos días, y consistió en una extracción sólido-líquido con 30 mL de buffer fosfato pH 7 estéril (50 mM) a cada uno de los erlenmeyer, se incubó a 28°C, 150 rpm, durante 24 horas en un agitador orbital Excella E24 (Deswal et al., 2011). El contenido de fermentación se recolectó en tubos falcón de 50 mL estériles y se agitaron en vórtex a 1500 rpm durante 15 minutos, posteriormente, se centrifugó a 9072 *xg* a 4°C, durante 20 minutos para separar la biomasa del

sobrenadante (X. Xu et al., 2017). En el sobrenadante se determinaron las actividades ligninolíticas volumétricas de lacasa, lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa (sección 3.3.1, 3.3.2 y 3.3.3).

Una vez establecido el tiempo de fermentación con las actividades enzimáticas máximas, se realizaron 20 fermentaciones de 40 erlenmeyer cada una. El extracto enzimático obtenido de las 20 fermentaciones se liofilizó para obtener un lote de extracto enzimático que se usó para desarrollar los experimentos posteriores.

4.3.1. Actividad lacasa

La actividad lacasa se determinó mediante la oxidación del ácido 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS). La actividad se evaluó mezclando 40 µL de sobrenadante del extracto enzimático con 150 µL de tampón de acetato 50 mM [pH 4.5] y se inició con 10 µL de ABTS 1.8 mM. El cambio de la absorbancia en el tiempo se monitoreó a una longitud de onda de 420 nm durante un minuto utilizando un espectrofotómetro de microplaca (ThermoFisher Multiskan™ GO). Una unidad de actividad lacasa se definió como la cantidad de enzima requerida para oxidar 1 µmol de ABTS por minuto y se calculó utilizando la **Ecuación 2** (Johannes & Majcherczyk, 2000). La metodología de cuantificación de actividad lacasa se validó usando como control una lacasa comercial de *Trametes versicolor* (38429 Sigma–Aldrich).

4.3.2. Actividad lignina peroxidasa

La actividad lignina peroxidasa se determinó mediante la transformación del alcohol 3,4-dimetoxibencílico (VA) en aldehído veratrílico (VAD). La actividad se evaluó mezclando 20 µl de sobrenadante de extracto enzimático, 100 µl de tampón citrato 20 mM a pH 3, 40 µl de VA 10 mM y se inició con 40 µl de H₂O₂ fresco 0.8 mM. El cambio de la absorbancia en el tiempo se monitoreó a una longitud de onda de 310 nm durante un minuto utilizando un espectrofotómetro

de microplaca (ThermoFisher Multiskan™ GO). Una unidad de actividad lignina peroxidasa se definió como la cantidad de enzima requerida para oxidar 1 μmol de alcohol veratrílico por minuto y se calculó utilizando la **Ecuación 2** (Khindaria, Yamazaki, & Aust, 1996). La metodología de cuantificación de actividad lignina peroxidasa se validó usando como control una lignina peroxidasa comercial (42603 Sigma–Aldrich).

4.3.3. Actividad manganeso peroxidasa

La actividad manganeso peroxidasa se determinó mediante la formación del complejo de malonato de Mn^{3+} [pH 4.5] en tampón de malonato de sodio 50 mM con MnSO_4 0.5 mM. La actividad se evaluó mezclando 20 μL de sobrenadante del extracto enzimático, 100 μl de tampón de citrato 20 mM [pH 4.5], 40 μl de tampón de malonato de sodio y se inició con 40 μl de 0.8 mM de H_2O_2 fresco. El cambio de la absorbancia en el tiempo se monitoreó a una longitud de onda de 270 nm durante un minuto utilizando un espectrofotómetro de microplaca (ThermoFisher Multiskan™ GO). Una unidad de actividad lignina peroxidasa se definió como la cantidad de enzima requerida para oxidar 1 μmol de malonato por minuto y se calculó utilizando la **Ecuación 2** (Järvinen, Taskila, Isomäki, & Ojamo, 2012). La metodología de cuantificación de actividad manganeso peroxidasa se validó usando como control enzima manganeso peroxidasa comercial de *Phanerochaete chrysosporium* (93014 Sigma–Aldrich).

$$\text{Actividad ligninolítica} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{L}-1} \right) = \left(\frac{\Delta\text{ABS} \cdot \text{Vr} \cdot \text{fd}}{t \cdot E \cdot P \cdot \text{Vm}} \right) (\text{Ecuación 2})$$

Donde, ΔABS es la lectura de absorbancia final – absorbancia inicial, Vr es el volumen total de reacción (L), fd es el factor de dilución, t es el tiempo de medición (min), E es el coeficiente de

extinción molar del compuesto, P es la longitud del pozo (cm), V_m es el volumen de la muestra (L).

4.4 Determinación de las variables independientes que favorecen la transformación de compuestos fenólicos

La determinación de las variables independientes que favorecen la transformación de compuestos fenólicos se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) simple y un diseño experimental empleando el extracto enzimático seleccionado (sección 3.2). Se evaluó el efecto en la transformación de compuestos fenólicos de las variables independientes pH, temperatura (°C), agitación (rpm) y unidades de actividad enzimática (UL⁻¹). Como variable de respuesta se cuantificó la reducción de compuestos fenólicos totales por el método Folin-Ciocalteu modificado utilizando como patrón una curva de calibración con 500 ppm de fenol (Sánchez Rangel, Benavides, Heredia, Cisneros Zevallos, & Jacobo Velázquez, 2013). El porcentaje de transformación se calculó usando la **Ecuación 3** (Ancona et al., 2018). Cada experimento se realizó en ausencia de luz y por triplicado (Peterson, 1979).

$$\% \text{ Transformación} = \left(\frac{C_i - C_f}{C_i} \right) * 100 (\text{Ecuación 3})$$

Ci: Concentración inicial hora 0

Cf: Concentración final hora X

4.4.1. Cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu modificado.

Los fenoles totales presentes en la mezcla de reacción (sección 3.4) fueron cuantificados por el método de Folin-Ciocalteu modificado (Sánchez Rangel et al., 2013). El método se fundamenta en la capacidad de los compuestos fenólicos para reducir el reactivo de Folin-Ciocalteu (wolframato sódico y molibdato sódico en presencia de ácido fosfórico), y reducirlo dando una

coloración azul, determinable espectrofotométricamente a λ 765 nm. La determinación de la concentración de fenoles totales se realizó usando tubos de 5 mL que contenían 600 μ L de reacción. Cada 600 μ L de reacción estaba compuesto de 25 μ L de muestra, 25 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu, 200 μ L de agua des ionizada, 250 μ L de Na_2CO_3 (70 g/L) y 100 μ L de agua desionizada. La mezcla de reacción se incubó a 25°C durante una hora, en condiciones de oscuridad y se leyó en un espectrofotómetro de microplaca (ThermoFisher Multiskan™ GO). Los experimentos fueron realizados por triplicado para cada muestra evaluada y la concentración de compuestos fenólicos totales fue expresada en partes por millón (ppm).

4.4.2. Efecto del pH en la transformación de compuestos fenólicos

El efecto de pH sobre el extracto enzimático seleccionado en la transformación de fenol se realizó usando tubos de 15 mL que contenían 5 mL de medio reaccionante. Cada 5 ml de medio reaccionante estaba compuesto por 500 μ L de fenol 100 ppm, 50 μ L cobre 5 mM, 4.37 mL buffer a evaluar (acetato 50 mM, [pH 3 y 4], citrato 50 mM [pH 5], fosfato 50 mM [pH 6 y 7]) y 83.3 μ L extracto enzimático seleccionado a una concentración de 100 UL^{-1} de actividad enzimática volumétrica. La reacción se incubó a 25°C, sin agitación. Se cuantificó el porcentaje de transformación de fenol cada 24 horas, durante 96 horas, por el método de Folin-Ciocalteu modificado. Como control negativo se preparó una mezcla de reacción como se mencionó anteriormente, sin la adición del extracto enzimático seleccionado. Los experimentos fueron realizados por triplicado por cada valor de pH evaluado.

4.4.3. Efecto de la temperatura en la transformación de compuestos fenólicos

El efecto de la temperatura sobre el extracto enzimático seleccionado en la transformación de fenol se realizó usando tubos de 15 mL que contenían 5 mL de medio reaccionante. Cada 5 ml de

medio reaccionante estaba compuesto por 500 μL de fenol 100 ppm, 50 μL cobre 5 mM, 4.37 mL buffer citrato 50 mM [pH 5] y 83.3 μL extracto enzimático seleccionado a una concentración de 100 UL^{-1} actividad enzimática volumétrica. La reacción se incubó a 25, 35 y 45°C, sin agitación. Se cuantificó el porcentaje de transformación de fenol cada 24 horas, durante 96 horas, por el método de Folin-Ciocalteu modificado. Como control negativo se preparó una mezcla de reacción como se mencionó anteriormente, sin la adición del extracto enzimático seleccionado. Los experimentos fueron realizados por triplicado para cada valor de temperatura evaluado.

4.4.4. Efecto de la agitación en la transformación de compuestos fenólicos

El efecto de la agitación sobre el extracto enzimático seleccionado en la transformación de fenol se realizó usando tubos de 15 mL que contenían 5 mL de medio reaccionante. Cada 5 mL de medio reaccionante estaba compuesto por 500 μL de fenol 100 ppm, 50 μL cobre 5 mM, 4.37 mL buffer citrato 50 mM [pH 5] y 83.3 μL extracto enzimático seleccionado a una concentración de 100 UL^{-1} actividad enzimática volumétrica. La reacción se incubó a 25°C, a 0, 75, 150, 225 y 300 revoluciones por minuto (rpm). Se cuantificó el porcentaje de transformación de fenol cada 24 horas, durante 96 horas, por el método de Folin-Ciocalteu modificado. Como control negativo se preparó una mezcla de reacción como se mencionó anteriormente, sin la adición del extracto enzimático seleccionado. Los experimentos fueron realizados por triplicado por cada valor de agitación evaluado.

4.4.5. Efecto de las unidades de actividad ligninolítica volumétrica en la transformación de compuestos fenólicos.

El efecto de la concentración de actividad ligninolítica de las unidades enzimáticas volumétricas del extracto enzimático seleccionado en la transformación de fenol, se realizó usando tubos de 15 mL que contenían 5 mL de medio reaccionante. Cada 5 mL de medio reaccionante estaba

compuesto por 500 μL de fenol 100 ppm, 50 μL cobre 5 mM, 4.37 mL buffer citrato 50 mM [pH 5] y 83.3 μL extracto enzimático seleccionado a una concentración de 50, 100 y 200 UL^{-1} actividad enzimática volumétrica. La reacción se incubó a 25°C , sin agitación. Se cuantificó el porcentaje de transformación de fenol cada 24 horas, durante 96 horas, por el método de Folin-Ciocalteu modificado. Como control negativo se preparó una mezcla de reacción como se mencionó anteriormente, sin la adición del extracto enzimático seleccionado. Los experimentos fueron realizados por triplicado para cada valor de concentración de actividad volumétrica evaluado.

4.4.6. Efectos combinados de las variables independientes en la transformación de compuestos fenólicos

El efecto combinado de las variables independientes en la transformación de fenol se evaluó mediante un diseño de cribado con dos niveles, cuatro factores, un punto central y dos replicas (**Tabla 8**). Según los resultados obtenidos del diseño experimental se realizó un diseño multifactorial con dos réplicas, que permitió determinar el valor teórico de las variables independientes en que se obtendría el mayor porcentaje de transformación de compuestos fenólicos. Como variable de respuesta se cuantificó el porcentaje de transformación de compuestos fenólicos, a 72 horas, por el método de Folin-Ciocalteu modificado, en condiciones de oscuridad. Los datos fueron normalizados utilizando como control negativo la mezcla de reacción sin la adición del extracto enzimático seleccionado.

Tabla 8.

Factores y niveles empleados en la realización del diseño de experimentos de cribado 2⁴

Factores	Niveles	
	-1	1

pH	4.5	6.5
Temperatura, °C	35	55
Agitación, rpm	200	400
Actividad lacasa, UL ⁻¹	33	300

4.5 Transformación de compuestos fenólicos en el tiempo

La evaluación de la transformación de los compuestos fenólicos en el tiempo se realizó con base en los resultados obtenidos de la optimización del diseño experimental (sección 3.4.5). Se cuantificó el porcentaje de transformación para cada uno de los compuestos fenólicos evaluados a concentraciones de 50, 100 y 500 ppm, por un periodo de 96 horas, con mediciones del porcentaje de transformación cada 12 horas, por el método de Folin-Ciocalteu modificado. Como control negativo se utilizó una mezcla de reacción sin la adición del extracto enzimático seleccionado, la cual se utilizó para normalizar los datos.

4.6 Transformación de compuestos fenólicos en una matriz acuosa simulada

Se evaluó el efecto del pH y temperatura sobre el extracto enzimático con actividad ligninolítica en la transformación de compuestos fenólicos combinados en una matriz acuosa simulada, que contenía 20 ppm de ácido gálico, fenol, 4-clorofenol, β -naftol y 2-*tert*-butilfenol para una concentración final de 100 ppm, mediante un diseño experimental multifactorial 4², con dos replicas (**Tabla 9**). Como variable de respuesta se cuantificó el porcentaje de transformación de compuestos fenólicos totales por el método de Folin-Ciocalteu modificado, a 72 horas, en condiciones de oscuridad. Los datos fueron normalizados utilizando como control negativo la mezcla de reacción sin la adición del extracto enzimático seleccionado.

Tabla 9.

Factores y variables empleados en la realización del diseño multifactorial 4²

Factores	Niveles			
pH	35	45	55	65
Temperatura, °C	4	5	6	7

4.6.1. Validación de la transformación de compuestos fenólicos presentes en una matriz acuosa simulada en el tiempo

La validación de la transformación de compuestos fenólicos presentes en una matriz acuosa simulada en el tiempo se basó en los resultados obtenidos de pH y temperatura del diseño multifactorial 4² (sección 3.6). Se simularon tres matrices acuosas a una concentración final de 50, 100 y 500 ppm que contenían ácido gálico, fenol, 4-clorofenol, β -naftol y 2-*tert*-butilfenol, como se muestra en la **Tabla 10**. Se cuantificó el porcentaje de transformación de compuestos fenólicos totales por un periodo de 96 horas, con mediciones del porcentaje de transformación cada 12 horas, mediante el método Folin-Ciocalteu modificado, en condiciones de oscuridad. Como control negativo se utilizó una mezcla de reacción sin la adición del extracto enzimático seleccionado, la cual se utilizó para normalizar los datos.

Tabla 10.

Concentración de compuestos fenólicos empleada para la simulación de tres matrices acuosas con concentración final de 50, 100 y 500 ppm.

Compuesto	Matriz acuosa 1	Matriz acuosa 2	Matriz acuosa 3
Ácido gálico, ppm	10	20	100
Fenol, ppm	10	20	100

4-Clorofenol, ppm	10	20	100
β -Naftol, ppm	10	20	100
2- <i>tert</i> -butilfenol, ppm	10	20	100
Fenoles totales, ppm	50	100	500

4.7 Análisis estadístico

Se empleó *Statgraphics® Centurion XVI.I* como software para los análisis estadísticos de ANOVA, diseño de experimentos y prueba de múltiples rangos (Tukey, HSD) utilizados en la sección 3.4, 3.5 y 3.6. Se aplicaron pruebas de comparación con un nivel de confianza del 95% y se consideró significancia estadística cuando el valor p fue < 0.05 . El mejoramiento de la transformación de compuestos fenólicos se calculó utilizando la herramienta de optimización *Statgraphics® Centurion XVI.I*. Los experimentos se realizaron por triplicado.

5. Resultados y discusión

5.1 Aislamientos fúngicos

Los cuatro aislamientos fúngicos del Cepario LMMA-UIS empleados fueron *Byssomerulius*-LMB1, *Dictyopanus* LMB4, *Hyphodontia* LMB5 y *Trametes* LMB15. Las características macroscópicas observadas de los cuatro aislamientos fúngicos se describen a continuación, *Byssomerulius* LMB1 presentó colonias radiadas, de color blanco, textura algodonosa y abundante micelio aéreo, *Dictyopanus* LMB4, colonias radiadas, de color blanco y textura algodonosa, *Hyphodontia* LMB5, colonias radiadas, de color blanco, textura lanosa y superficie crateriforme y *Trametes* LMB15, colonias radiadas, de color blanco, textura algodonosa y superficie cerebriforme. Microscópicamente se observaron en los cuatro aislamientos hifas hialinas septadas,

clamp o fíbula (flecha roja) y ausencia de conidios y conidióforos, características propias de hongos basidiomicetos macromicetos (Ramirez & Arango, 2017). En la **Figura 8** se muestran las colonias y las características microscópicas de los cuatro aislamientos fúngicos.

La identificación molecular a través de la extracción y secuenciación de ADN de las regiones ITS1 y ITS4 permitió confirmar que los aislamientos fúngicos pertenecen a los géneros *Byssomerulius* sp., *Dictyopanus* sp., *Hyphodontia* sp. y *Trametes* sp. *Byssomerulius* LMB1 y *Dictyopanus* LMB4 mostraron un 98% de identidad con cinco aislamientos diferentes de *Byssomerulius corium* y *Dictyopanus pusillus* respectivamente, informados en el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (**Tabla 11**). El uso de las regiones espaciadoras transcritas internas (ITS), junto con la identificación de las características macroscópicas y microscópicas se consideran un método apropiado en la identificación de género y especies en cepas de hongos (Begerow, Nilsson, Unterseher, & Maier, 2010; Raja, Miller, Pearce, & Oberlies, 2017).

Figura 8. Características macroscópicas y microscópicas de **a)** *Byssomerulius corium* LMB1, **b)** *Dictyopanus pusillus* LMB4, **c)** *Hyphodontia* LMB5, y **d)** *Trametes* LMB15, en AST a 15 días de crecimiento, 25°C en objetivo de 40x con azul de lactofenol como colorante.

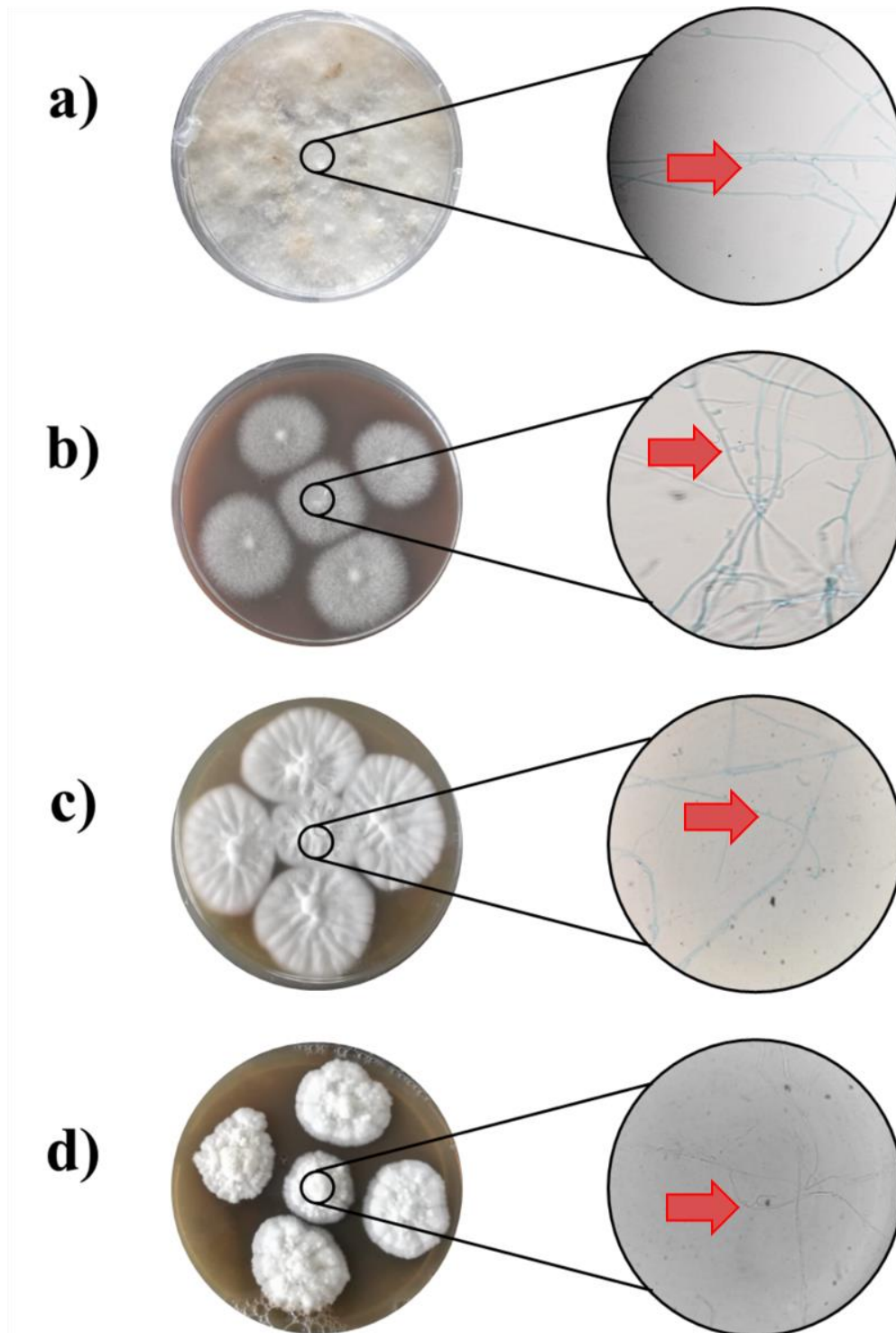


Tabla 11.

Especies homologas para los aislamientos fúngicos Byssomerulius LMB1, Dictyopanus LMB4, Hyphodonthia LMB5 y Trametes LMB15

Aislamiento fúngico	Especie homologa	Query cover, %	Porcentaje de identidad, %	Número de acceso
Byssomerulius LMB1	<i>Byssomerulius corium</i> FP-107055	92	98.77	KP135008.1
	<i>Byssomerulius corium</i> voucher CLZhao-689	95	98.63	MG231472.1
	<i>Byssomerulius corium</i> voucher CLZhao-1274	95	98.47	MG231482.1
	<i>Byssomerulius corium</i> voucher CLZhao-1560	95	98.46	MG231485.1
	<i>Byssomerulius corium</i> FD-376	87	98.31	KP135005.1
	<i>Dictyopanus</i> sp. P-238	85	98.81	KR135361.1
	<i>Dictyopanus pusillus</i> #8265	89	96.77	AF289061.1
Dictyopanus LMB4	<i>Dictyopanus pusillus</i> voucher FLAS-F-60991	87	96.69	MH016934.1
	<i>Dictyopanus pusillus</i> voucher FLAS-F-61475	87	96.69	MH211914.1
	<i>Dictyopanus pusillus</i> voucher FLAS-F-61126	84	97.06	MH211761.1

Hyphodontia LMB5	<i>Hyphodontia nothofagi</i> voucher PDD-91630	40	89.7	GQ411524.1
	<i>Hyphodontia crustosa</i> Wu-1007- 31	37	90.38	KC460313.1
	<i>Hyphodontia crustosa</i> Wu-0711- 90	37	90.38	KC460312.1
	<i>Hyphodontia abieticola</i> #5181b	33	96.06	DQ873601.1
	<i>Hyphodontia mongolica</i> voucher Cui-13240	33	96.8	KY290985.1
Trametes LMB15	<i>Trametes palisotii</i> #5.25	30	94.38	EU661873.1
	<i>Trametes hirsuta</i> extr23	34	93.37	MH507021.1
	<i>Trametes corrugata</i> LCJ-165	37	91.96	KF383137.1
	<i>Trametes corrugata</i> #5.61	48	91.67	EU661875.1
	<i>Trametes versicolor</i> voucher CLZhao-717	29	91.67	MG231879.1

Byssomerulius corium LMB1, *Dictyopanus pusillus* LMB4, *Hyphodontia* LMB5 y *Trametes* LMB15 pertenecen a la clase *Agaricomycetes*, que ha sido reportada por su capacidad de producir enzimas hidrolasas y oxidorreductasas capaces de descomponer la lignina y transformar compuestos xenobióticos recalcitrantes como hidrocarburos aromáticos policíclicos, colorantes, compuestos fenólicos, entre otros recalcitrantes (Eastwood & Park, 2014; Kim et al., 2016; Pradeep et al., 2015; Wang et al., 2011). Lo observado en las características macroscópicas, microscópicas y la identificación molecular de *Byssomerulius corium* LMB1, *Dictyopanus*

pusillus LMB4, *Hyphodontia* LMB5 y *Trametes* LMB15 confirmó la pureza de estos aislamientos fúngicos. Por tanto, se consideraron aislamientos viables para ser utilizados en los experimentos posteriores.

5.2 Selección cualitativa de aislamiento fúngico con capacidad de transformación de compuestos fenólicos.

Los aislamientos *Byssomerulius corium* LMB1, *Dictyopanus pusillus* LMB4, *Hyphodontia* LMB5 y *Trametes* LMB15 crecieron sobre MB y en los MBs que contenían los compuestos ácido gálico, 4-clorofenol, 2,4-dinitrofenol, fenol, β -naftol, 2-nitrofenol y 2,4,6-tribromofenol (**Figura 9**). Sin embargo, se observó una inhibición del crecimiento de los aislamientos *Byssomerulius corium* LMB1 en presencia de 4-clorofenol (500 ppm), fenol (500 ppm) y 2-nitrofenol (100 y 500 ppm); *Dictyopanus pusillus* LMB4 en presencia de 4-clorofenol (50, 100 y 500 ppm), 2,4-dinitrofenol (50, 100 y 500 ppm), fenol (500 ppm), β -naftol (500 ppm) y 2-nitrofenol (500 ppm); *Hyphodontia* LMB5 en presencia de ácido gálico (500 ppm), 4-clorofenol (50, 100 y 500 ppm), fenol (500 ppm) y 2-nitrofenol (100 y 500 ppm) y *Trametes* LMB15 en presencia de ácido gálico, 4-clorofenol, 2,4-dinitrofenol, fenol, β -naftol, 2-nitrofenol y 2,4,6-tribromofenol a todas las concentraciones evaluadas con respecto al crecimiento en MCB (**Tabla 12**). También, se observó un aumento en el crecimiento de los aislamientos fúngicos con respecto al crecimiento en MCB (% de inhibición negativo), *Byssomerulius corium* LMB1 en 50 y 100 ppm de fenol, *Dictyopanus pusillus* LMB4 en 500 ppm de ácido gálico, *Hyphodontia* LMB5 en 500 ppm de 4-dinitrofenol y 2,4,6-tribromofenol (**Tabla 12**).

Con base en el halo de oxidación y/o degradación observada, se determinó la relación eficiencia enzimática (REE) de los aislamientos fúngicos en la degradación de compuestos fenólicos.

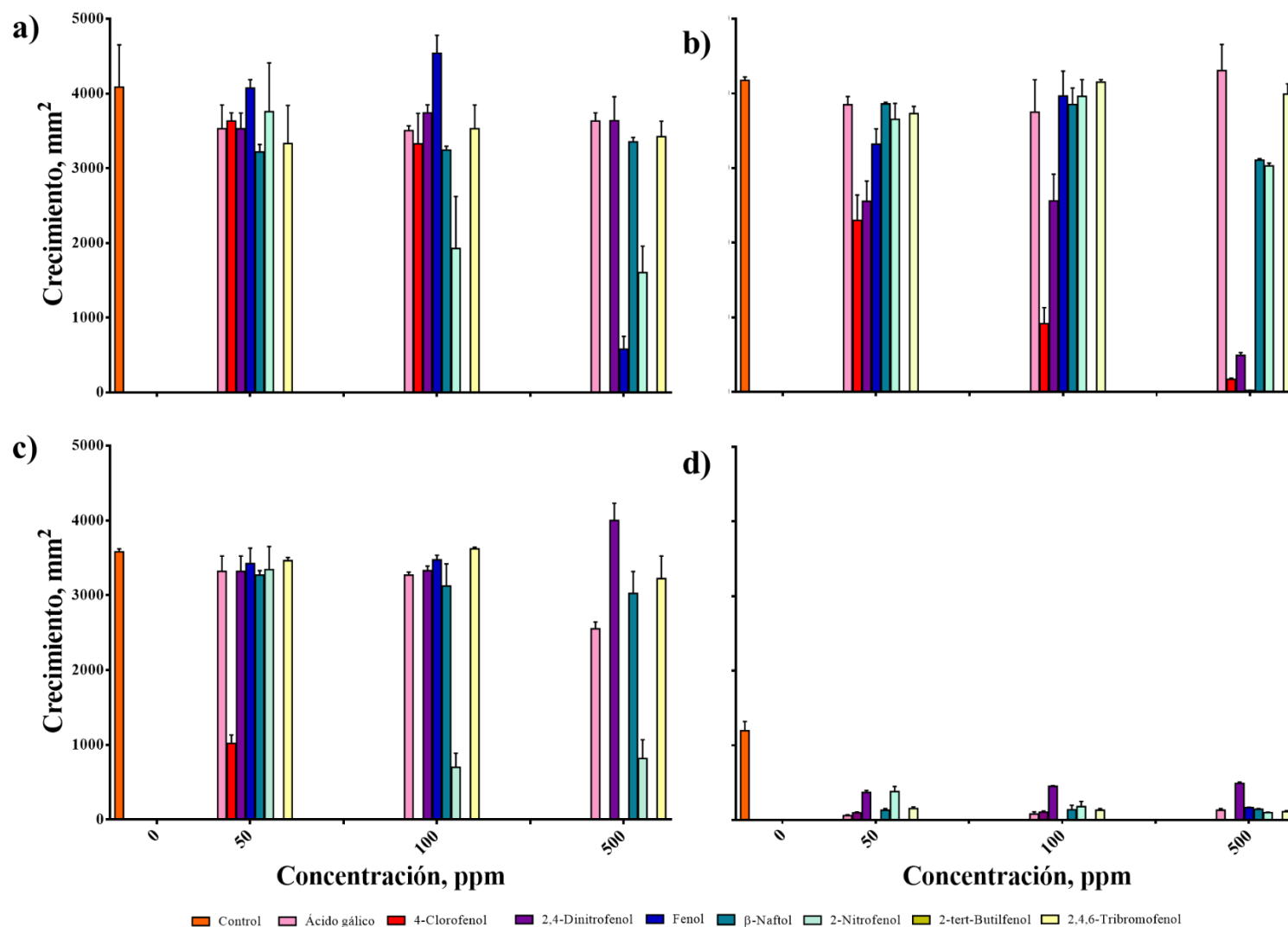
Byssomerulius corium LMB1 degradó tres compuestos fenólicos, 2,4-dinitrofenol en concentraciones de 50 y 100 ppm con una REE de 0.11 y 0.068 respectivamente; fenol en concentraciones de 100 y 500 ppm con una REE de 0.126 y 3.1 respectivamente, y 2,4,6-tribromofenol en una concentración de 500 ppm con una REE de 0.22 (**Figura 10a**). *Dictyopanus pusillus* LMB4 degradó siete compuestos fenólicos, ácido gálico, 4-clorofenol, 2,4-dinitrofenol, fenol, β -naftol, 2-nitrofenol y 2,4,6-tribromofenol en concentraciones de 50, 100 y 500 ppm con una REE aproximada de 1, exceptuando fenol en 500 ppm, donde presentó una REE de 3.5 (**Figura 10b**). *Hyphodontia* LMB5 degradó solo un compuesto fenólico, 2-nitrofenol en concentraciones de 100 y 500 ppm con una REE 2.7 y 0.7 respectivamente (**Figura 10c**). *Trametes* LMB15 no degradó ninguna concentración de los compuestos fenólicos evaluados (**Apéndice A**).

Tabla 12.

Porcentaje de inhibición de crecimiento de *Byssomerulius corium* LMB1, *Dictyopanus pusillus* LMB4, *Hyphodontia* LMB5 y *Trametes* LMB15, a 30 días en medio de cultivo base suplementado (MCBs) con concentraciones de 50, 100 y 500 ppm de ácido gálico, 4-clorofenol, 2,4-dinitrofenol, fenol, β -naftol, 2-nitrofenol, 2-tert-butilfenol y 2,4,6-tribromofenol. Los valores

Compuesto	Concentración, ppm	Inhibición crecimiento, %											
		<i>B. corium</i> LMB1			<i>D. pusillus</i> LMB4			<i>Hyphodontia</i> LMB5		<i>Trametes</i> LMB15			
Ácido gálico	50	13	±	4	8	±	2	7	±	5	95	±	0.4
	100	13	±	11	10	±	9	8.7	±	0.1	93	±	2
	500	10	±	10	-3	±	7	29	±	2	88.9	±	0.6
4-Clorofenol	50	10	±	10	45	±	8	72	±	3	91.7	±	0.1
	100	18	±	1	78	±	5	100	±	0	91.2	±	0.5
	500	100	±	0	95.9	±	0.4	100	±	0	100	±	0
2,4-Dinitrofenol	50	13	±	7	39	±	6	7	±	5	69	±	0.9
	100	7	±	10	39	±	8	7	±	1	62	±	3
	500	11	±	5	88	±	1	-12	±	5	59	±	3
Fenol	50	-1	±	11	20	±	4	4	±	5	100	±	0
	100	-12	±	10	5	±	7	2.9	±	0.6	100	±	0
	500	86	±	2	99.487	±	0.002	100	±	0	85.9	±	1.1
β-Naftol	50	20	±	8.6	7.5	±	0.5	8.7	±	0.6	88.9	±	0.6
	100	20	±	10	8	±	4	13	±	7	89	±	4
	500	17	±	10	25.6	±	0.3	16	±	7	87.8	±	0.5
2-Nitrofenol	50	8	±	3	13	±	4	7	±	7	68	±	3
	100	54	±	11	5	±	4	80	±	5	85	±	4
	500	61	±	3	27.4	±	0.1	77	±	7	91.6	±	0.4
2-tert -butilfenol	50	100	±	0	100	±	0	100	±	0	100	±	0
	100	100	±	0	100	±	0	100	±	0	100	±	0
	500	100	±	0	100	±	0	100	±	0	100	±	0
2,4,6-Tribromofenol	50	19	±	1	11	±	1	3.23	±	0.02	87.1	±	0.5
	100	13	±	4	0.5	±	0.3	-1.2	±	0.6	88.9	±	0.6
	500	16	±	7	4	±	2	10	±	7	90.6	±	0.1

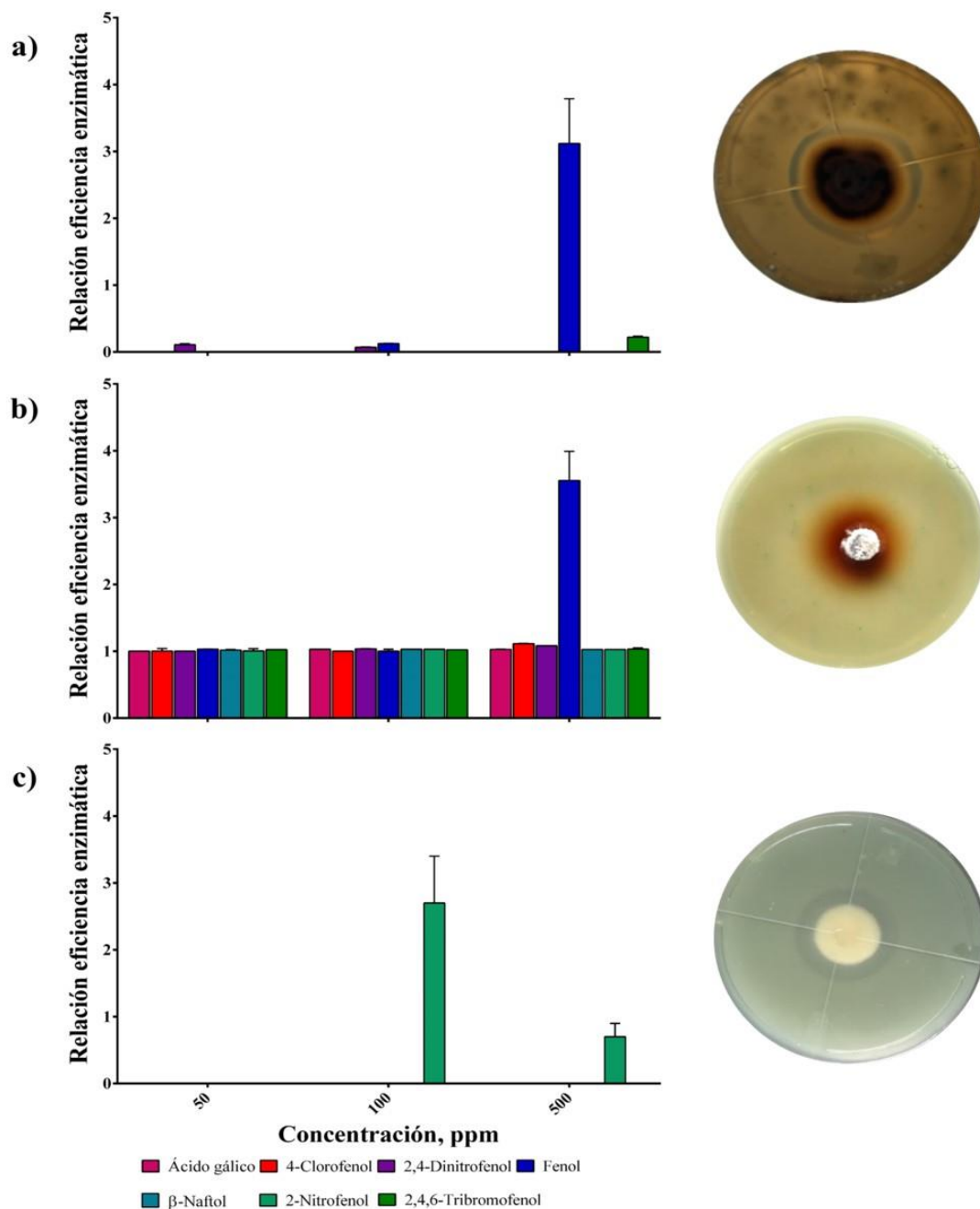
Figura 9. Crecimiento de **a)** *Byssomerulius corium* LMB1, **b)** *Dictyopanus pusillus* LMB4, **c)** *Hyphodontia* LMB5 y **d)** *Trametes* LMB15 en presencia de 50, 100 y 500 ppm de ácido gálico, 4-clorofenol, 2,4-dinitrofenol, fenol, β -naftol, 2-nitrofenol, 2-*tert*-butilfenol y 2,4,6-tribromofenol a 30 días, 25 °C, en condiciones de oscuridad. Los valores representan la media de los datos $\pm$ DS de tres replicas.



En la **Figura 10** se muestra la relación eficiencia enzimática (REE) de *Byssomerulius corium*-LMB1, *Dictyopanus pusillus* LMB4 e *Hyphodontia* LMB5 en presencia de 50, 100 y 500 ppm de ácido gálico, 4-clorofenol, 2,4-dinitrofenol, fenol, β -naftol, 2-nitrofenol y 2,4,6-tribromofenol. No se muestran los resultados de 2-*tert*-butilfenol dado que ningún aislamiento fúngico creció en presencia de este compuesto fenólico. Se observa la imagen del crecimiento de la colonia y del halo de degradación y/o oxidación donde se produjo la mayor REE para cada aislamiento fúngico. *Byssomerulius corium* LMB1 500 ppm de fenol, *Dictyopanus pusillus* LMB4 500 ppm de fenol e *Hyphodontia* LMB5 100 ppm de 2-nitrofenol.

El efecto fungicida (no crecimiento) y fungistático (disminución del crecimiento) observado sobre *Byssomerulius corium* LMB1, *Dictyopanus pusillus* LMB4, *Hyphodontia* LMB5 y *Trametes* LMB15 en presencia de 2-*tert*-butilfenol, 4-clorofenol, fenol, 2-nitrofenol y 2,4-dinitrofenol, se puede atribuir a la naturaleza hidrofóbica de los compuestos fenólicos y su capacidad de interactuar con la membrana celular de los hongos, ocasionando una disminución en la homeostasis celular; al afectar las lipoproteínas de membrana ocasionando una disminución del pH intracelular y daños en la estructura celular (Pietarinen, Willför, Vikström, & Bjarne, 2007; Rao, Zhang, Muend, & Rao, 2010; Vidhyasekaran, 2007; J. Xu, Zhou, Ji, Pei, & Xu, 2008; J. Zhang et al., 2008). Autores como Levin, Carabajal, & Hofrichter, 2016 encontraron que concentraciones de 94 ppm, 471 ppm, 706 ppm y 941 ppm de fenol inhibieron el crecimiento de *Corioloopsis floccosa*, *Corioloopsis gallica*, *Fomes fasciatus*, *Ganoderma resinaceum*, *Irpex lacteus*, *Lentinus lindquistii*, *Phlebia brevispora*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus djamor*, *Pycnoporus sanguineus*, *Schizopora paradoxa*, *Trametes trogii* y *Trametes villosa* a 28 días de incubación.

Figura 10. Relación eficiencia enzimática de **a)** *Byssomerulius corium* LMB1, **b)** *Dictyopanus pusillus* LMB4 y **c)** *Hyphodontia* LMB5 en presencia de 50, 100 y 500 ppm de ácido gálico, 4-clorofenol, 2,4-dinitrofenol, fenol, β -naftol, 2-nitrofenol y 2,4,6-tribromofenol a 30 días, 25 °C, en condiciones de oscuridad. Los valores representan la media de los datos $\pm$ DS de tres replicas. A la derecha se muestra el crecimiento y halo de degradación y/o oxidación donde se produce la mayor REE para cada aislamiento fúngico.



Así mismo, Levin, Carabajal, & Hofrichter, 2016 observaron que, a una concentración de 706 ppm de ácido gálico, 2,6-dimetoxifenol, 2-metoxifenol y 2,4-diclorofenol se inhibió el crecimiento de *Irpex lacteu*, *Lentinus tigrinus*, *Lentinus lindquistii*, *Phanerochaete sórdida*, *Schizopora paradoxa*, *Lenzites elegans* y *Trametes versicolor*. Zouari et al., 2002 observaron que a 300 ppm de 4-clorofenol se inhibía el crecimiento de *Phanerochaete chrysosporium*.

Si bien se observó inhibición del crecimiento de *Byssomerulius corium* LMB1, *Dictyopanus pusillus* LMB4, *Hyphodontia* LMB5 y *Trametes* LMB15 en los compuestos fenólicos evaluados, se evidenció la capacidad de transformación que posee *Byssomerulius corium* LMB1 sobre 2,4-dinitrofenol, fenol y 2,4,6-tribromofenol; *Dictyopanus pusillus* LMB4 sobre ácido gálico, 4-clorofenol, 2,4-dinitrofenol, fenol, β -naftol, 2-nitrofenol y 2,4,6-tribromofenol e *Hyphodontia* LMB5 sobre 2-nitrofenol. Este comportamiento se puede atribuir a la similitud en la estructura química de los compuestos fenólicos y la lignina (Cháves & Dominie, 2013). Estos compuestos orgánicos al ser similares a la lignina estimulan en hongos basidiomicetos el sistema enzimático inespecífico encargado de descomponer el material ligninocelulolítico (Eastwood & Park, 2014; Kim et al., 2016; Pradeep et al., 2015; Wang et al., 2011).

Diferentes autores han demostrado que hongos basidiomicetos tienen la capacidad de degradar compuestos fenólicos mediante el uso de enzimas extracelulares, lacasas, peroxidasas y tirosinasas (Ku, 2015; Lu et al., 2009). Asadgol et al., 2014 observaron que la lacasa de *Paraconiothyrium variable* transformó fenol después de 30 minutos de reacción. Kadimaliev, Revin, Atykhan, Nadezhina, & Parshin, 2011 evidenciaron que *Lentinus tigrinus* degradó fenol después de seis días de incubación en cultivo sumergido. Bettin et al., 2019 encontró que *Pleurotus sajor* degradó fenol después de 84 horas de incubación en un reactor de tanque agitado. Rodríguez et al., 2016 observaron que un coctel de lacasas de *Pycnoporus sanguineus* transformó β -naftol y 2,4-

diclorofenol después de 8 horas de reacción. Tsujiyama, Muraoka, & Takada, 2013 encontraron que *Lentinula edodes* degradó 2,4-diclorofenol después de 21 días de incubación en cultivo sumergido. Zhang et al., 2012 determinó que la lacasa de *Trametes versicolor* transformó fenol después de 24 horas de incubación. Ryan, Leukes, & Burton, 2007 observaron que especies de *Trametes* transformaron fenol después de 2 días de incubación en cultivo sumergido. Uhnáková et al., 2009 de igual manera observó que *Trametes versicolor* degradó 2-bromofenol, 4-bromofenol, 2,4-dibromofenol, 2,6-dibromofenol, 2,4,6-tribromofenol y tetrabromobisfenol A después de cuatro días de incubación en cultivo agitado.

Aunque se han reportado diferentes especies de *Trametes* con la capacidad de transformar compuestos fenólicos, en esta investigación *Trametes* LMB15 no transformó ningún compuesto fenólico. Esto se puede atribuir a que los compuestos fenólicos no indujeron la producción de enzimas oxidorreductasas en *Trametes* LMB15 o que el medio de cultivo empleado no tenía los oligoelementos necesarios para activar el metabolismo del mismo, ya que se ha demostrado que el aumento o disminución de los niveles de expresión génica de enzimas ligninolíticas depende de las condiciones de pH, sustrato y tiempo del cultivo (Moiseenko et al., 2018; Pradeep et al., 2015; Villegas et al., 2016). Por otro lado, no se encontraron reportes en literatura científica que evidencien el potencial de *Byssomerulius* sp., *Dictyopanus* sp. e *Hyphodontia* sp. en la degradación de compuestos fenólicos. Sin embargo, en esta investigación se observó la capacidad que tienen estos tres aislamientos fúngicos autóctonos de Santander en la degradación de compuestos fenólicos. Este hallazgo a futuro puede representar una alternativa en la transformación de compuestos fenólicos presentes en efluentes de diferentes industrias.

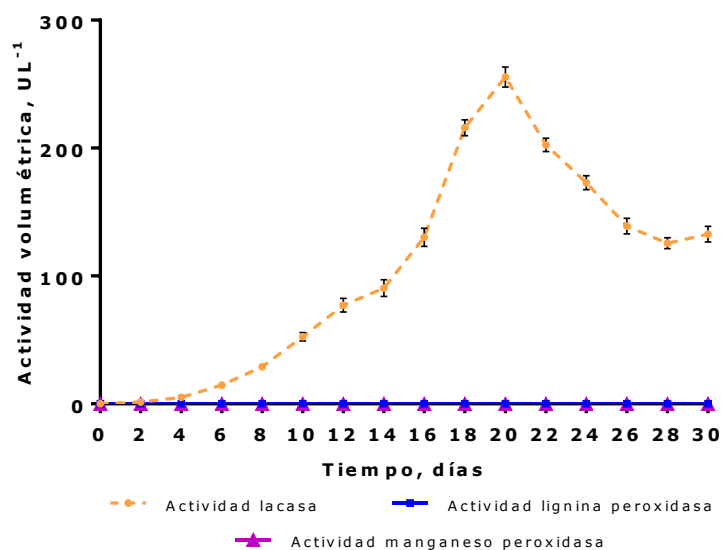
Se seleccionó a *Dictyopanus pusillus* LMB4, como el aislamiento fúngico con capacidad de transformar la mayor cantidad de compuestos fenólicos en el ensayo cualitativo, dado que presentó

una REE en concentraciones de 50, 100 y 500 ppm en siete de los ocho compuestos fenólicos evaluados.

5.3 Obtención extractos enzimáticos ligninolíticos

Se obtuvieron extractos enzimáticos con actividad ligninolítica de *Dictyopanus pusillus* LMB4 mediante fermentación en estado sólido (SFF) como se describió en la sección 3.3. En el ensayo de oxidación de ABTS como indicativo de actividad lacasa se observó que a los 20 días de fermentación se alcanzó un máximo de actividad con un valor de $255.6 \pm 0.9 \text{ UL}^{-1}$ (**Figura 11**). No se detectó actividad lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa en el extracto enzimático obtenido de *Dictyopanus pusillus* LMB4 mediante en ensayo de formación de VA^{+} y Mn^{+3} respectivamente. Los resultados obtenidos permitieron establecer el tiempo de fermentación en que se produce la mayor actividad ligninolítica y el tipo de enzimas ligninolíticas presentes en el extracto enzimático obtenido de *Dictyopanus pusillu* LMB4. Estos resultados confirman otros estudios donde se establece que la lacasa, es la enzima ligninolítica más expresada durante la fermentación cuando se utiliza como sustrato lignocelulosa (Fernández et al., 2016; Mali, Kuuskeri, Shah, & Lundell, 2017).

Figura 11. Oxidación de ABTS como indicativo de actividad lacasa en el extracto enzimático obtenido por *Dictyopanus pusillus* LMB4 durante 30 días en fermentación en estado sólido (SSF), utilizando subproductos lignocelulósicos del beneficio de la palma aceitera. Los valores representan la media de los datos $\pm$ DS de tres replicas.



La causa de la ausencia de lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa no es clara, sin embargo, la fuente de carbono y nitrógeno, el sustrato ligninocelulolítico y algunos compuestos orgánicos empleados en el medio de cultivo pueden regular el metabolismo de *Dictyopanus pusillus* LMB4 y actuar como inductores de enzimas lacasa e inhibidores de enzimas peroxidadas (Janusz, Kucharzyk, Pawlik, Staszczak, & Paszczynski, 2013; Moiseenko et al., 2018). Rueda et al., 2020 observaron que la composición del medio de cultivo influye en el perfil de enzimas ligninolíticas expresadas y secretadas por *Dictyopanus pusillus* LMB4 durante la fermentación en estado sólido.

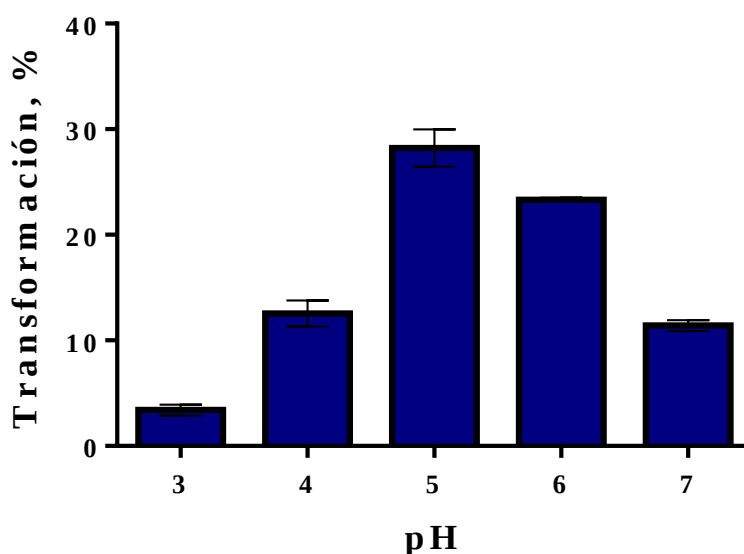
5.4 Determinación de las variables independientes que favorecen la transformación de compuestos fenólicos.

5.4.1. Efecto del pH en la transformación de compuestos fenólicos

El extracto enzimático con actividad lacasa obtenido de *Dictyopanus pusillus* LMB4, transformó 100 ppm de fenol en un 3, 12, 28, 23 y 11% a un pH de 3,4,5,6 y 7 respectivamente después de 96 horas de reacción (**Figura 12**). El análisis estadístico mostró una significancia de $p < 0.0001$ entre cada uno de los pH evaluados (**Apéndice B**). El efecto producido por el pH 5 en la transformación de fenol fue mayor en comparación con los otros valores de pH evaluados según

la prueba de Tukey (**Apéndice C**). Por esta razón, se seleccionó el pH 5, como el pH ideal para evaluar el efecto de la temperatura, agitación y unidades de la actividad lacasa en la transformación de fenol.

Figura 12. Efecto del pH sobre el extracto enzimático con actividad lacasa (100 UL^{-1}) de *Dictyopanus pusillus* LMB4, en la transformación de 100 ppm de fenol, a 96 horas de incubación, en condiciones de oscuridad. Los valores representan la media de los datos $\pm$ DS de tres replicas.



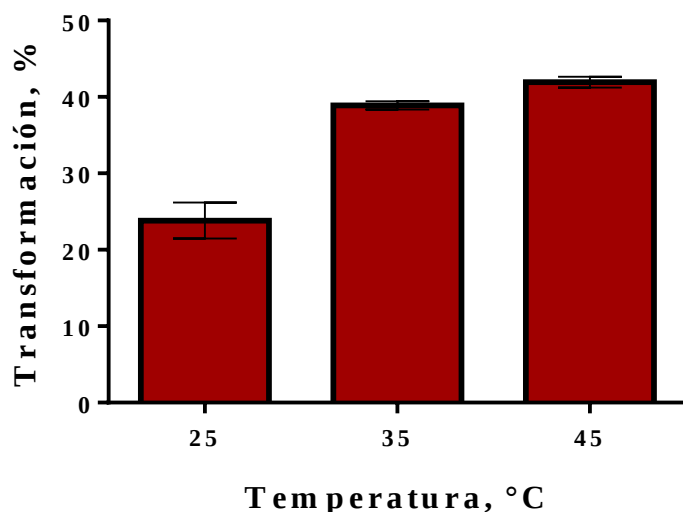
El pH es un factor regulador de la actividad enzimática, las lacasas presentan un pH óptimo entre tres y siete en la oxidación de fenoles, sin embargo, esto dependerá de la naturaleza de la lacasa (Kunamneni et al., 2008). Diferentes autores han establecido el pH en que se produce el mayor porcentaje de transformación de fenol para lacasas obtenidas de diferentes hongos. Asadgol et al., 2014 identificaron que utilizando la lacasa purificada de *Paraconiothyrium variabile* (5 U/mL) el mayor porcentaje de transformación de 376 ppm de fenol (77%) se obtuvo a pH 5 después de 30 minutos de reacción. Liu et al., 2012 determinaron que seis era el pH ideal para

eliminar 50 ppm de fenol usando la lacasa recombinante de *Trametes versicolor* (1.155 U/mL) después de seis horas de reacción. Zahra, Rezaei, Mohammad, & Mehran, 2019 encontraron que 4.5 era el pH óptimo para transformar 38 ppm de fenol usando la lacasa inmovilizada de *Trametes versicolor* (100 U/mL) después de 40 minutos de reacción. Kurniawati & Nicell, 2008 determinaron que seis era el pH en que la lacasa de *Trametes versicolor* (1.5 U/mL) transformó el mayor porcentaje de 47 ppm de fenol (90%) después de seis horas de reacción. Estos resultados corroboran que la mayoría de lacasas fúngicas favorecen su actividad a pH ácido (Morozova, Shumakovich, Gorbacheva, Shleev, & Yaropolov, 2007).

5.4.2. Efecto de la temperatura en la transformación de compuestos fenólicos

El extracto enzimático con actividad lacasa obtenido de *Dictyopanus pusillus* LMB4, transformó 100 ppm de fenol en un 23, 38 y 41% a una temperatura de 25, 35 y 45°C respectivamente después de 96 horas de reacción (**Figura 13**). El análisis estadístico mostró una significancia de $p < 0.0001$ entre cada una de las temperaturas evaluadas (**Apéndice B**). Así mismo, el efecto producido por la temperatura a 45°C en la transformación de fenol fue mayor en comparación con las otras temperaturas evaluadas según la prueba de Tukey (**Apéndice C**). La tendencia a aumentar el porcentaje de transformación de fenol a medida que se incrementa la temperatura sugiere que el extracto enzimático con actividad lacasa obtenido de *Dictyopanus pusillus* LMB4 podría tolerar altas temperatura y favorecer su actividad enzimática, mejorando la exposición del sitio activo, aumentando el contacto enzima-sustrato y realizando cambios estructurales en las cadenas de aminoácidos para producir un mayor porcentaje de transformación de fenol (Yan, Chen, Niu, Chen, & Chagan, 2015).

Figura 13. Efecto de la temperatura sobre el extracto enzimático con actividad lacasa (100 UL^{-1}) de *Dictyopanus pusillus* LMB4, en la transformación de 100 ppm de fenol, a 96 horas de incubación, en condiciones de oscuridad. Los valores representan la media de los datos $\pm$ DS de tres replicas.



Cada enzima posee una temperatura óptima de trabajo, valores superiores o inferiores disminuyen la velocidad de reacción enzimática (Wong, 2009). Las lacasas poseen una temperatura de reacción óptima que varía de 25 a 80 °C (Kunamneni et al., 2008; Yang et al., 2017). Diferentes autores como Asadgol et al., 2014 determinaron que a pH 5 y 50°C se produce el mayor porcentaje de transformación de fenol (96%) utilizando lacasa purificada de *Paraconiothyrium variable* (5 U/mL) después de 30 minutos de reacción. Kurniawati & Nicell, 2008 observaron que a pH 6 y 50°C se produce el mayor porcentaje de transformación de fenol (80%) utilizando 1.5 U/mL de lacasa de *Trametes versicolor* después de seis horas de reacción. Liu et al., 2012 identificó que a pH 6, la temperatura ideal para eliminar 50 ppm de fenol usando la lacasa recombinante de *Trametes versicolor* (1.155 U/mL) después de seis horas de reacción es

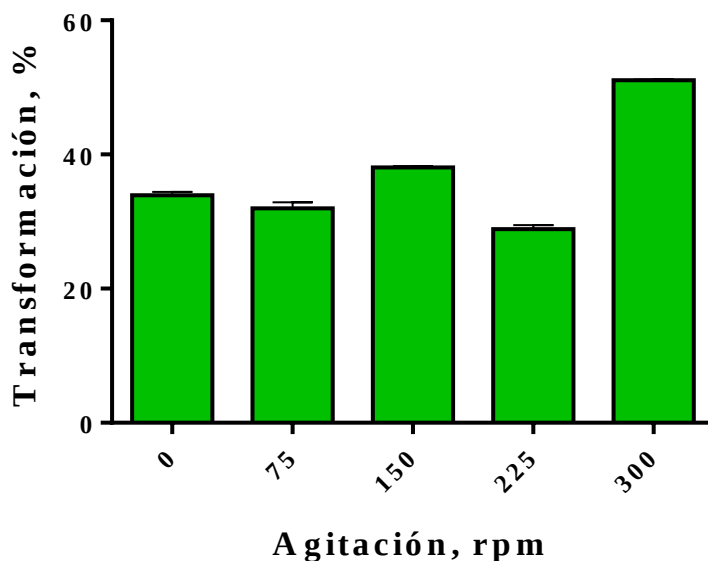
50°C. Estos resultados sugieren que la temperatura óptima para la degradación de 100 ppm de fenol se encuentra por encima de los 45°C, por esta razón se decidió ampliar el rango de temperatura a estudiar en la transformación de fenol en el diseño experimental realizado en la sección 4.4.5.

5.4.3. Efecto de la agitación en la transformación de compuestos fenólicos

El extracto enzimático con actividad lacasa obtenido de *Dictyopanus pusillus* LMB4, transformó 100 ppm de fenol con agitación de 75 y 300 rpm. La mayor transformación se observó a 300 rpm (51%) y la menor transformación se observó a 225 rpm (28%) (**Figura 14**). Se observó que a 0, 75 y 225 rpm no existe una diferencia en la transformación de fenol. Sin embargo, a 300 rpm el efecto es notorio. El análisis estadístico mostró una significancia de $p < 0.0001$ entre cada una de las agitaciones evaluadas (**Apéndice B**). Así mismo, el efecto producido por la agitación a 300 rpm en la transformación de fenol fue mayor en comparación con las otras agitaciones evaluadas según la prueba de Tukey (**Apéndice C**). Estos resultados permitieron elegir el rango de agitación a evaluar en la sección 4.4.5. La agitación es otra variable que influye sobre la actividad enzimática (Shekher, Sehgal, Kamthania, & Kumar, 2011). Diferentes autores han establecido que la agitación tiene un efecto en la transformación de fenol. Bettin et al., 2019 observaron que en un reactor de tanque agitado la lacasa de *Pleurotus sajor* transformó 94, 188, 282 y 376 ppm de fenol en un 77, 82, 92 y 36% después de 84 horas de reacción. Asadgol et al., 2014 encontraron que a 50 rpm la lacasa de *Paraconiothyrium variabile* transformaba en un 80% 376 ppm de fenol después de 30 min de reacción.

Figura 14. Efecto de la agitación sobre el extracto enzimático con actividad lacasa (100 UL⁻¹) de *Dictyopanus pusillus* LMB4, en la transformación de 100 ppm de fenol, a 96 horas de

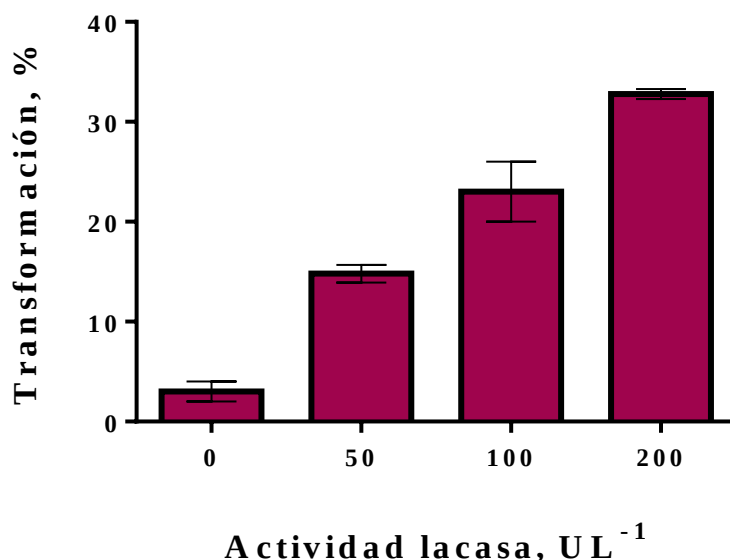
incubación, en condiciones de oscuridad. Los valores representan la media de los datos $\pm$ DS de tres replicas.



5.4.4. Efecto de las unidades de actividad ligninolítica volumétrica en la transformación de compuestos fenólicos

El efecto de la cantidad de actividad volumétrica lacasa obtenida de *Dictyopanus pusillus* LMB4 sobre 100 ppm de fenol se muestra en la **Figura 15**. Se observó que aumentar la cantidad de enzima de 50 a 200 UL^{-1} aumentó el porcentaje de transformación de fenol de un 3 a un 32% después de 96 horas de reacción (**Figura 15**). El análisis estadístico mostró una significancia de $p < 0.0001$ para la actividad lacasa en la transformación de fenol (**Apéndice B**). Así mismo, el efecto producido por la actividad lacasa a 200 UL^{-1} del extracto enzimático de *Dictyopanus pusillus* LMB4 en la transformación de fenol fue mayor en comparación con las otras unidades de actividad lacasa evaluadas según la prueba de Tukey (**Apéndice C**).

Figura 15. Efecto de la actividad lacasa del extracto enzimático de *Dictyopanus pusillus* LMB4, en la transformación de 100 ppm de fenol, a 96 horas de incubación, en condiciones de oscuridad. Los valores representan la media de los datos $\pm$ DS de tres replicas.



La velocidad de reacción enzimática depende de la cantidad de enzima o sustrato, siendo diferente para cada tipo de enzima (Zeng, Zhao, & Xia, 2017). En el presente estudio se demostró que a medida que se aumenta la actividad lacasa del extracto enzimático obtenido de *Dictyopanus pusillus* LMB4 de 0 a 200 U L⁻¹, se aumenta el porcentaje de transformación de fenol. Estos resultados son similares a los reportados por Saha et al., 2011, quienes encontraron que aumentar la cantidad de lacasa de *Trametes villosa* de 0.001 a 1.4 U/mL aumentaba la transformación de 94 ppm de fenol de 45 a 95% después de tres horas de reacción. Asadgol et al., 2014 determinaron que aumentar la cantidad de lacasa de *Paraconiothyrium variabile* de 1 a 20 U/mL aumentó la transformación de 376 ppm de fenol de 30 a 90% después de 30 min de reacción.

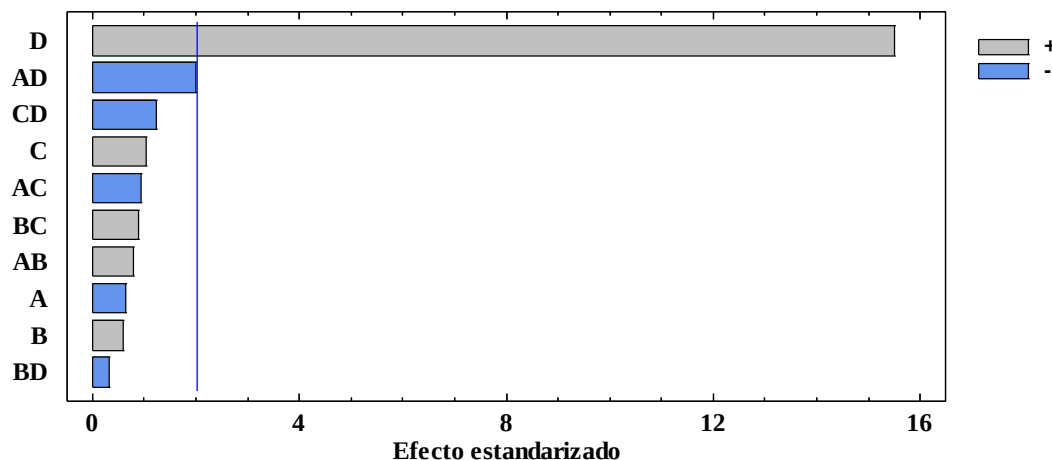
5.4.5. Efectos combinados de las variables independientes en la transformación de compuestos fenólicos

Los resultados obtenidos del ANOVA de las variables independientes permitieron determinar los rangos de pH (4.5 a 6.5), temperatura (35 a 55 °C), agitación (200 a 400 rpm) y unidad de actividad lacasa (33 a 300 UL⁻¹) a utilizar en el diseño de cribado con dos niveles, cuatro factores, un punto central y dos replicas, diseño con el que se evaluó el efecto en la transformación de 100 ppm de fenol, de estas variables independientes combinadas (valor de $P < 0.05$ con IC del 95%).

En el diagrama de Pareto obtenido del diseño de cribado 2⁴ se observó que aumentar la cantidad de la actividad lacasa, es el único factor que tiene un efecto significativo en la transformación de fenol (**Figura 16**), lo que confirma los resultados obtenidos en la sección 4.4.4 donde se evidencia que a medida que aumenta la cantidad de enzima, se incrementa el porcentaje de transformación de fenol. Se cree que el efecto de la cantidad de la actividad lacasa del extracto enzimático obtenido de *Dictyopanus pusillus* LMB4 afecta en gran medida la transformación de fenol que oculta el efecto del pH, la temperatura y la agitación.

Para confirmar el efecto del pH, temperatura y agitación sobre la transformación de compuestos fenólicos, se decidió realizar un diseño de cribado 2³ utilizando los mismos niveles y factores del diseño 2⁴, excluyendo el factor de actividad lacasa, el cual se fijó a una concentración de 300 UL⁻¹ (valor de $P < 0.05$ con IC del 95%).

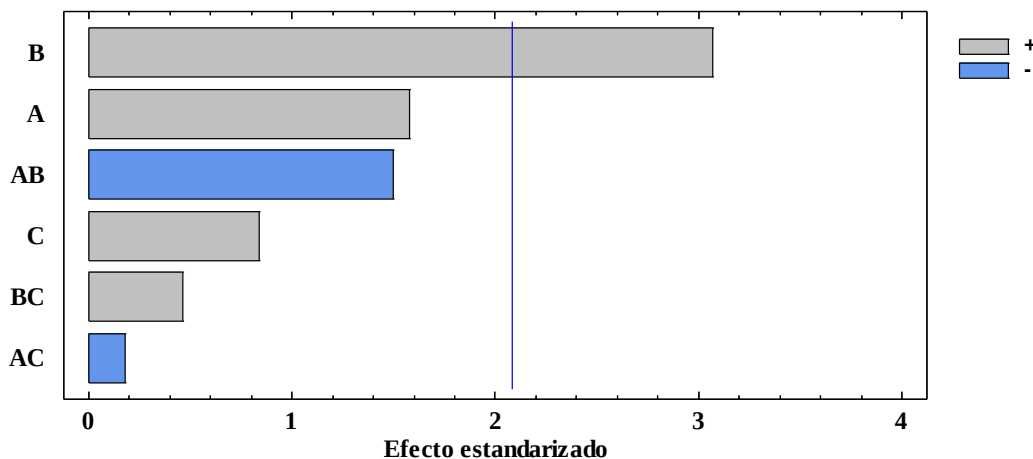
Figura 16. Diagrama de Pareto del diseño de cribado 2⁴ en la transformación de fenol a 72 horas, en condiciones de oscuridad. Parámetros: **A**, temperatura; **B**, agitación; **C**, pH; **D**, Unidad de actividad lacasa. La línea azul representa el umbral estadísticamente significativo con IC 95%, mientras que las barras grises y azules resaltan el efecto positivo y negativo, respectivamente.



En el diagrama de Pareto obtenido del diseño de cribado 2^3 se observó que el aumento de la temperatura tiene un efecto positivo en la transformación de fenol (**Figura 17**), lo que confirma los resultados obtenidos en la sección 4.4.2 donde se evidencia que a medida que aumenta la temperatura, se incrementa el porcentaje de transformación de fenol. Además, se observó que la agitación y el pH no presentaron un efecto estadísticamente significativo en la transformación de fenol. Sin embargo, se decide mantener el pH y descartar la agitación en la formulación de un diseño multifactorial que permita optimizar las variables independientes para obtener los valores teóricos en los que se produce el mayor porcentaje de transformación de fenol, dado que, en la sección 4.4.1 se demostró que el pH tiene un efecto en la transformación de compuestos fenólicos, y pensando en su implementación mantener la variable de agitación a escala industrial implica aumento en el costo de la transformación de fenoles por el alto consumo de energía en el proceso (Bettin, 2019). Así mismo, estudios como el propuesto por Bettin et al., 2019 demostraron que la agitación disminuye el porcentaje de transformación de fenol usando la lacasa de *Pleurotus sajor*.

Figura 17. Diagrama de Pareto del diseño de cribado 2^3 en la transformación de fenol a 72 horas, en condiciones de oscuridad. Parámetros: **A**, pH; **B**, temperatura; **C**, agitación. La línea azul

representa el umbral estadísticamente significativo con IC 95%, mientras que las barras grises y azules resaltan el efecto positivo y negativo, respectivamente.



Con base en los resultados obtenidos del diseño experimental mencionado anteriormente, se decidió realizar un diseño multifactorial con dos factores, cuatro variables, y dos replicas (**Tabla 13**). Los resultados obtenidos del diseño multifactorial 4^2 permitió determinar los valores de pH y temperatura donde se produce el mayor porcentaje de transformación de compuestos fenólicos, basados en la superficie de respuesta calculada siguiendo el modelo matemático utilizando factores cuadráticos (**Figura 18**). El pH y la temperatura varió dependiendo el compuesto fenólico evaluado. Se observó que el pico máximo de transformación para ácido gálico se encuentra en pH 5.8 y 47 °C; para fenol en pH 4.2 y 50 °C; para 4-clorofenol en pH 5.5 y 44 °C, para β -naftol en pH 5.6 y 47 °C y para 2-tert-butilfenol en pH 5.6 y 45 °C.

Tabla 13.

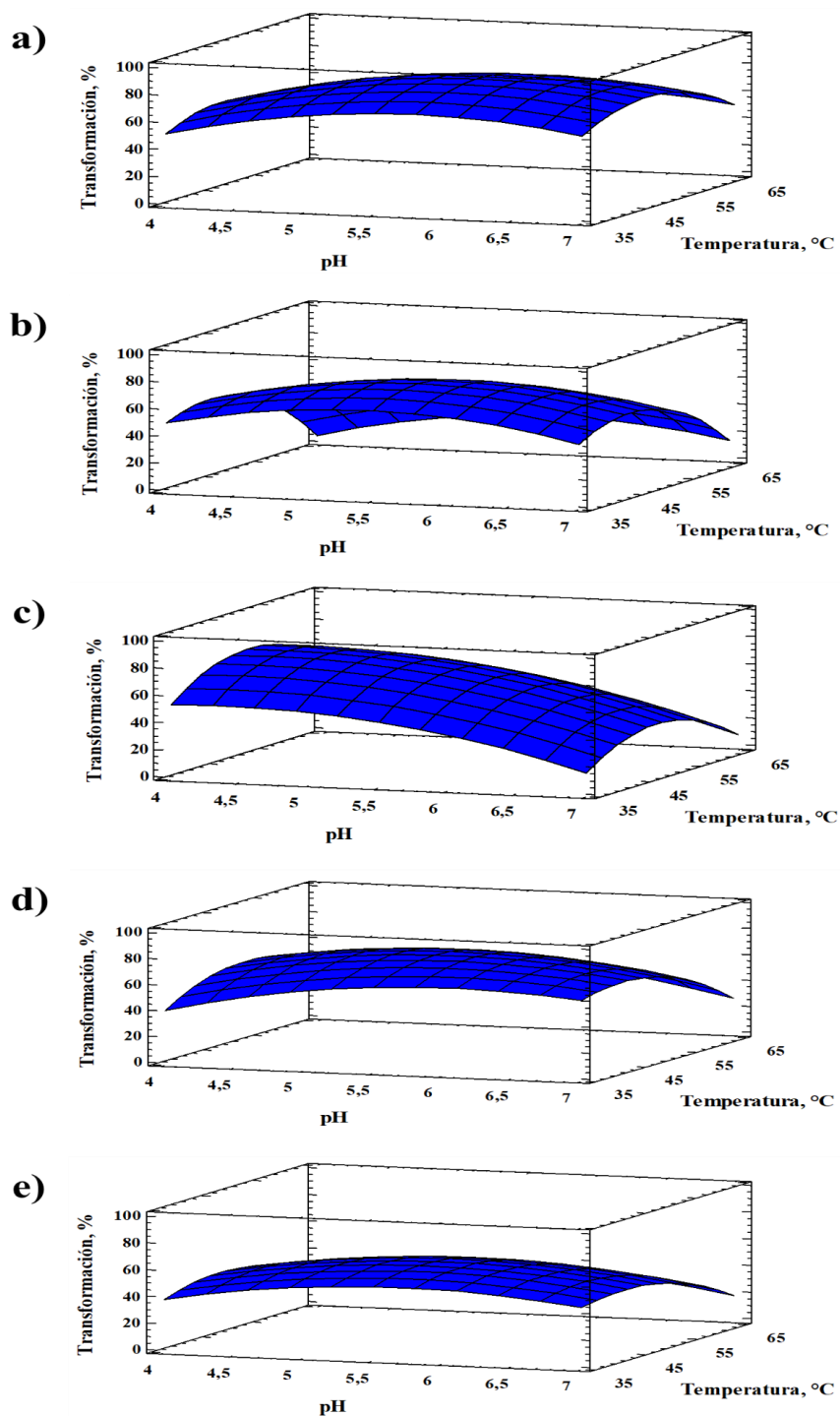
Factores y niveles empleados en la realización del diseño multifactorial 4^2

Factores	Niveles
----------	---------

Temperatura, °C	35	45	55	65
pH	4	5	6	7

En la **Figura 18** se muestran las superficies de respuestas calculadas para la transformación de ácido gálico, fenol, 4-clorofenol, β -naftol y 2-tert-butilfenol, dado que, al realizar la curva de calibración para 2,4-dinitrofenol, 2-nitrofenol y 2,4,6-tribromofenol no se evidenció un aumento de la linealidad en el rango de concentración evaluado por Folin-Ciocalteu modificado. Esto se debe a que los nitrofenoles y otras sustancias reductoras como mercaptoetanol y ditiotreitól generan una interferencia con el reactivo de Folin (Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall, 1951).

Figura 18. Superficie de respuesta estimada para la transformación de **a)** ácido gálico, **b)** 4-clorofenol, **c)** fenol **d)** β -naftol y **e)** 2-tert-butilfenol a 72 horas, en condiciones de oscuridad, con un intervalo de confianza del 95%.



5.5 Transformación de compuestos fenólicos en el tiempo

Con base en los resultados obtenidos de pH y temperatura teórico donde se produce el mayor porcentaje de transformación para cada compuesto fenólico (**Tabla 14**), se decidió evaluar el porcentaje de transformación para ácido gálico, fenol, 4-clorofenol, β -naftol y 2-tert-butilfenol, a concentraciones de 50, 100 y 500 ppm, usando el extracto enzimático con actividad lacasa obtenido de *Dictyopanus pusillus* LMB4 y una lacasa comercial de *Trametes versicolor*.

Tabla 14.

pH y temperatura teórico donde se produce el mayor porcentaje de transformación de 100 ppm de ácido gálico, fenol, 4-clorofenol, β -naftol y 2-tert-butilfenol a 72 horas de incubación, en condiciones de oscuridad.

Compuesto fenólico	pH	Temperatura, °C	Transformación teórica, %
Ácido gálico	5.8	47	84.4
Fenol	4.2	50	76.4
4-Clorofenol	5.5	44	73.6
β -Naftol	5.6	47	74.8
2-tert-Butilfenol	5.6	45	58.3

Se observó que a 96 horas de reacción, el extracto con actividad lacasa obtenido de *Dictyopanus pusillus* LMB4 transformó concentraciones de 50, 100 y 500 ppm de ácido gálico en un 67, 73 y 81%, fenol en un 71, 85 y 85%, 4-clorofenol en un 73, 68 y 86%, β -naftol en un 59, 67 y 86%, y

2-tert-butilfenol en un 48, 60 y 81% y la lacasa comercial de *Trametes versicolor* transformó ácido gálico en un 99, 93 y 85%, fenol en un 39, 33 y 9%, 4-clorofenol en un 83, 50 y 21%, β -naftol en un 100, 100 y 89.1%, y 2-tert-butilfenol en un 87, 78 y 84% a 50, 100 y 500 ppm respectivamente (**Figura 19**). Se observó que en las 12 primeras horas de reacción con el extracto enzimático con actividad lacasa obtenido de *Dictyopanus pusillus* LMB4 y la lacasa comercial de *Trametes versicolor*, es donde ocurre el mayor efecto en la transformación de compuestos fenólicos (**Figura 19**). El extracto enzimático con actividad lacasa obtenido de *Dictyopanus pusillus* LMB4 presentó un mayor porcentaje de transformación a altas concentraciones de compuestos fenólicos, efecto contrario se observó con la lacasa comercial de *Trametes versicolor*, quien presentó mayor porcentaje de transformación a bajas concentraciones de compuestos fenólicos (**Figura 19**). En la transformación de los compuestos fenólicos se observó que a medida que aumentaba el porcentaje de transformación, las muestras tomaban una coloración de amarillo a café, siendo más intenso su color en las concentraciones más altas de compuestos fenólicos (**Figura 20**). Así mismo, se observó material precipitado, que se homogenizaban al agitar la muestra.

La diferencia en el comportamiento del extracto enzimático con actividad lacasa de *Dictyopanus pusillus* LMB4 y la lacasa comercial de *Trametes versicolor*, se atribuye a tres razones: i) La no purificación del extracto enzimático de *Dictyopanus pusillus* LMB4, por tanto, su actividad se puede ver disminuida; ii) el pH, dado que la especificidad por el sustrato y la afinidad de la lacasa se ve afectada por cambios en el mismo, y las condiciones utilizadas en este diseño fueron las ideales para el extracto enzimático de *Dictyopanus pusillus* LMB4 y iii) el tipo de isoenzima lacasa expresado, ya que se conocen diferentes tipos de isoenzimas lacasas expresadas en hongos basidiomicetos, y dependiendo el tipo de isoenzima las condiciones óptimas

de trabajo varían y por tanto la actividad de la enzima (Karigar & Rao, 2011; Kunamneni et al., 2008).

El cambio de color observado en la transformación de ácido gálico, 4-clorofenol, fenol, β -naftol y 2-*tert*-butilfenol por el extracto enzimático con actividad lacasa de *Dictyopanus pusillus* LMB4 y la lacasa comercial de *Trametes versicolor* se podría deber a los productos generados de la transformación de los compuestos fenólicos (catecol, hidroquinona, benzoquinona, ácido maleico, oxálico ácido y ácido acético) (Mahiuddin, Fakhruddin, & Al-Mahin, 2012; Martínkova, Kotik, Marková, & Homolka, 2016; Mijangos & Varona, 2006). Los colores observados se deben principalmente a la formación de hidroquinonas (incolores), p-benzoquinonas (amarillo), y una mezcla de quinonas y anillos dihidroxilados (café) (Karigar & Rao, 2011; Mijangos & Varona, 2006). El color se atribuye a la estructura quinoideal, que contiene grupos cromóforos sustituidos en anillos de benceno (Mijangos & Varona, 2006). El precipitado observado en la transformación de compuestos fenólicos se atribuye a la formación de polímeros producto de la reacción ocurrida (Martínkova et al., 2016). En este trabajo no se realizó identificación de los productos obtenidos de la transformación de compuestos fenólicos, sin embargo, es importante realizar su identificación para evaluar si presentan menor o mayor toxicidad.

La disminución de la actividad enzimática observada en el extracto enzimático con actividad lacasa de *Dictyopanus pusillus* LMB4 y la lacasa comercial de *Trametes versicolor* después de 12 horas de reacción con los compuestos fenólicos, se puede atribuir a inhibición por sustrato, es decir la cantidad de sustrato es baja, lo que hace que la enzima actúe lentamente; y/o inhibición por producto, los productos intermediarios o finales pueden estar modificando el sitio activo de la enzima, o uniéndose en un sitio alostérico, ocasionando pérdida de la actividad enzimática (R. Couto & Toca, 2006; Sanroma, Lorenzo, Moldes, & Rodri, 2005).

Figura 19. Porcentaje de transformación de 50 (rosado), 100 (morado) y 500 (azul) ppm de **a)** ácido gálico, **b)** 4-clorofenol, **c)** fenol, **d)** β -naftol y **e)** 2-*tert*-butilfenol por 300 UL⁻¹ de actividad lacasa del extracto enzimático de *Dictyopanus pusillus* LMB4 (cuadrados) y la lacasa comercial de *Trametes versicolor* (círculos), a 96 horas, en condiciones de oscuridad. Los valores representan la media de los datos $\pm$ DS de tres replicas

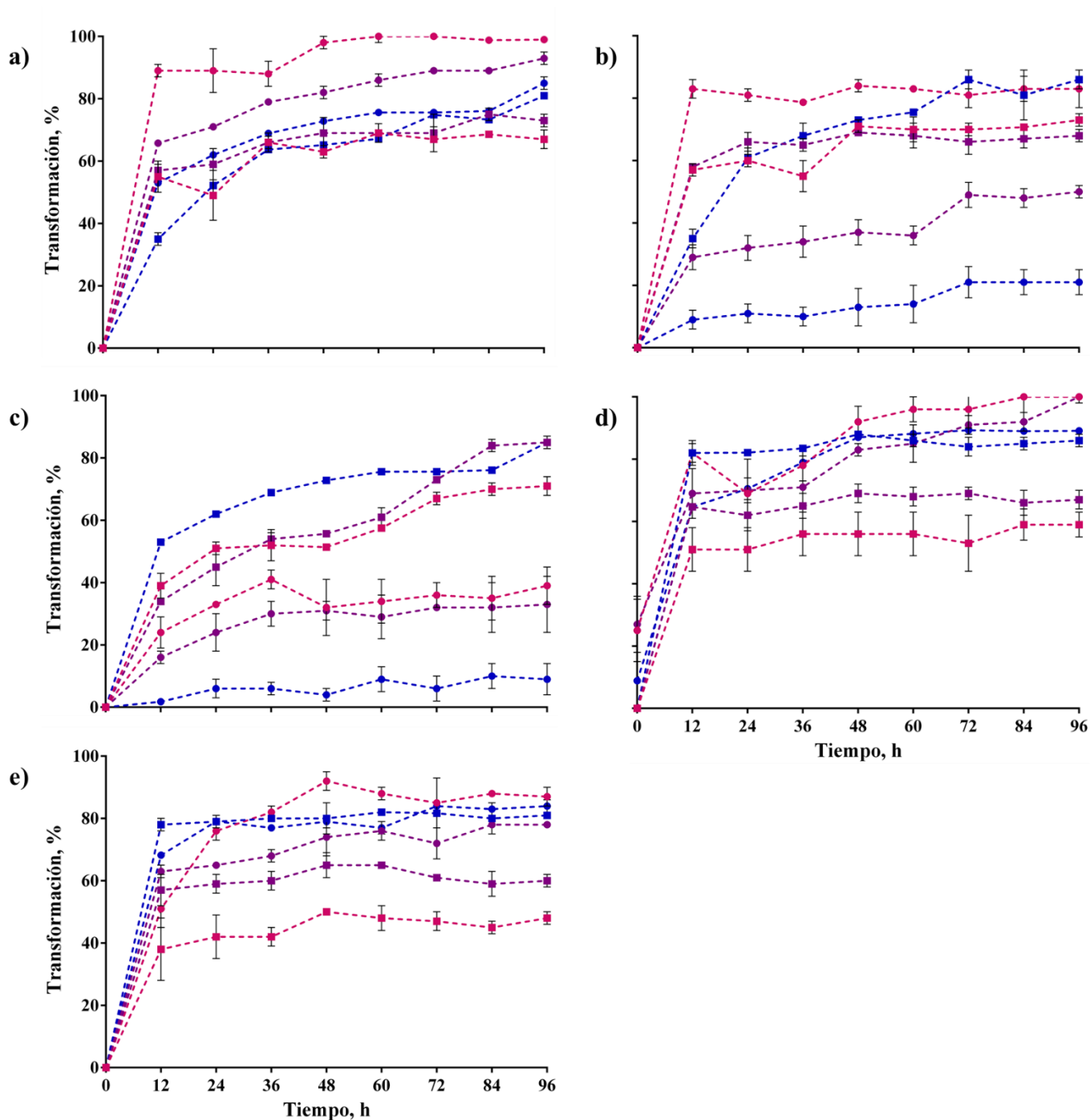
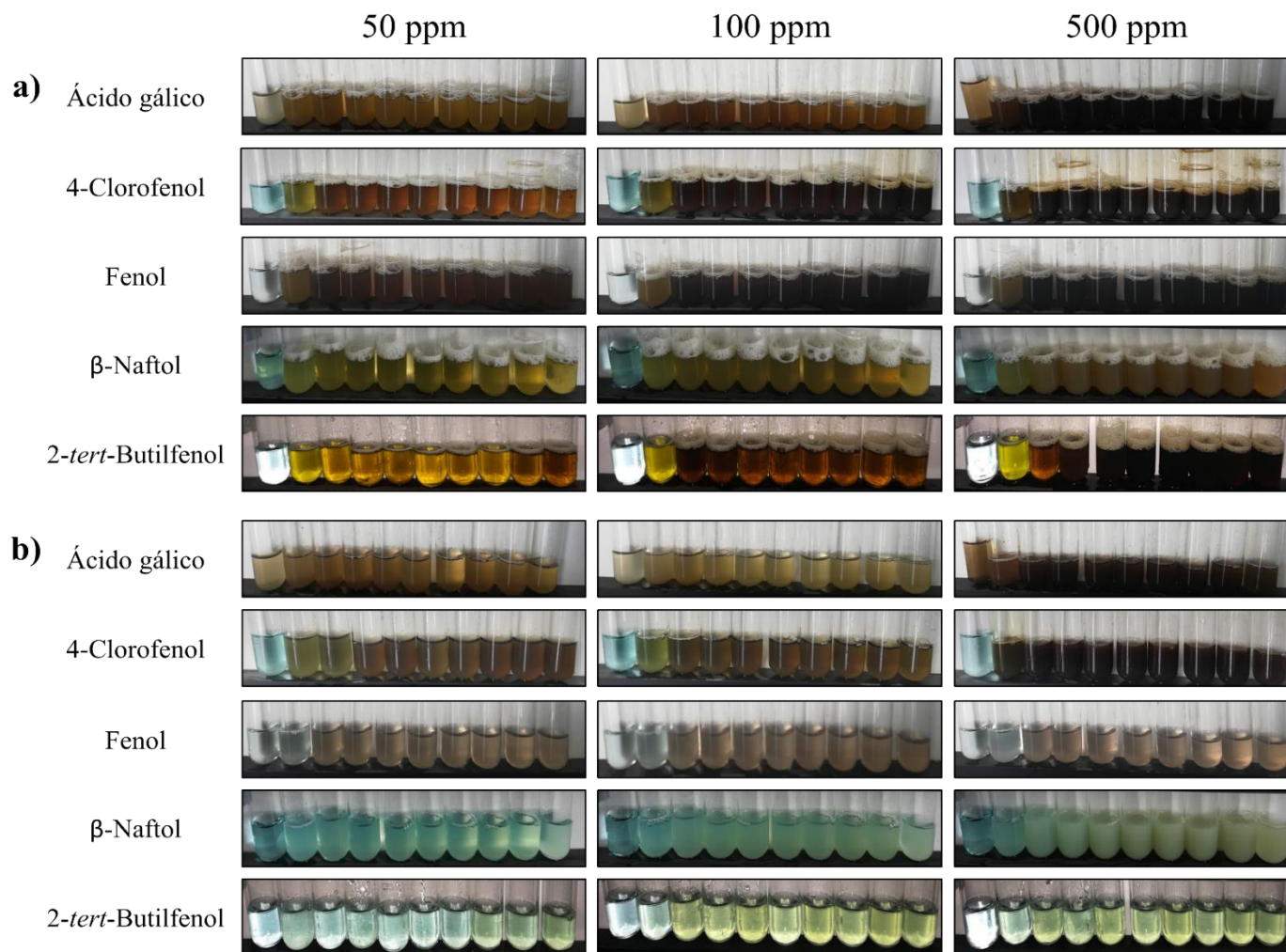


Figura 20. Transformación de ácido gálico, 4-clorofenol, fenol, β -naftol y 2-*tert*-butilfenol por **a)** extracto enzimático con actividad lacasa de *Dictyopanus pusillus* LMB4 y **b)** lacasa comercial de *Trametes versicolor*. De izquierda a derecha se muestra blanco, 0,12,24,36,48,60,72,84 y 96 horas de reacción.

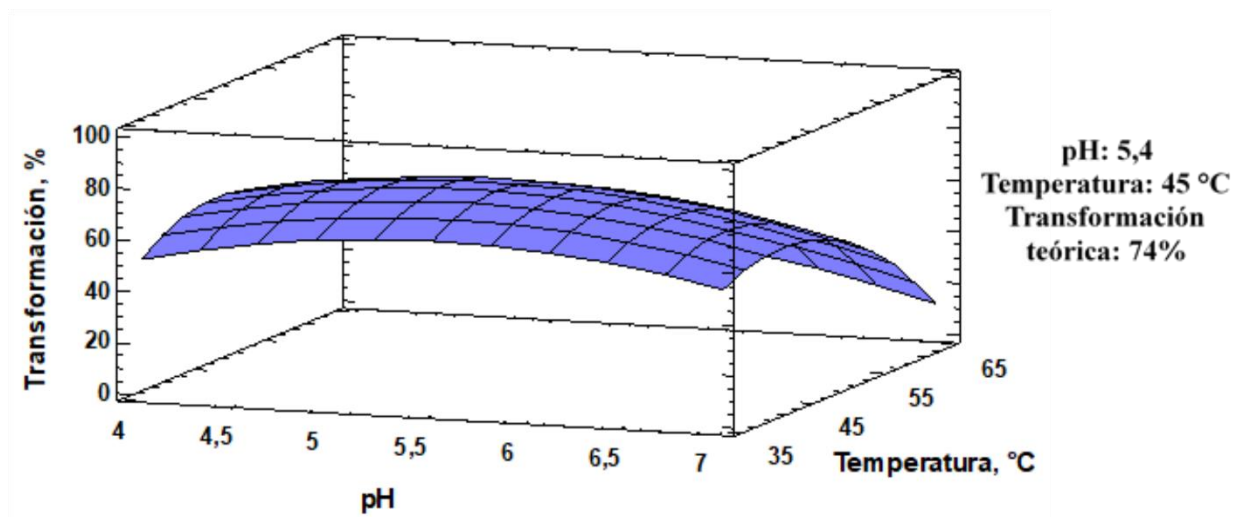


5.6 Transformación de compuestos fenólicos en una matriz acuosa simulada

Se evaluó en efecto que tiene el pH y temperatura sobre la transformación de 100 ppm de compuestos fenólicos presentes en una matriz acuosa simulada, usando el extracto enzimático con actividad lacasa obtenido de *Dictyopanus pusillus* LMB4 mediante un diseño experimental multifactorial 4^2 .

Basados en la superficie de respuesta calculada siguiendo el modelo matemático utilizando factores cuadráticos se determinó el valor de pH y temperatura donde se produce el mayor porcentaje de transformación de compuestos fenólicos, se observa que a pH 5,4 y temperatura de 45°C, se produce el mayor porcentaje de transformación teórica de compuestos fenólicos presentes en una matriz acuosa simulada con un 74% a 72 horas de reacción, en condiciones de oscuridad (Figura 21).

Figura 21. Superficie de respuesta estimada para la transformación de una matriz acuosa simulada que contiene una concentración final de 100 ppm de ácido gálico, fenol, 4-clorofenol, β -naftol y 2-tert-butilfenol, a 72 horas de reacción, en condiciones de oscuridad, con un intervalo de confianza del 95%.

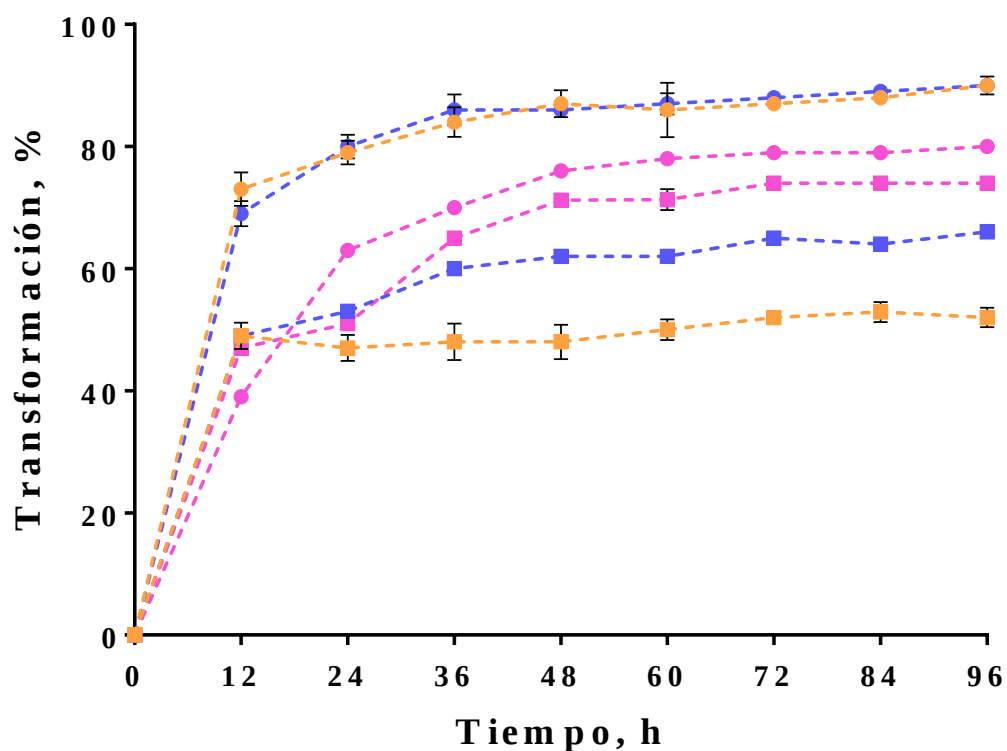


Con base en los resultados obtenidos de pH y temperatura donde se produce teóricamente el mayor porcentaje de transformación para la matriz acuosa simulada de 100 ppm de compuestos fenólicos, se decidió validar el porcentaje de transformación de una matriz acuosa que contenía 10, 20 y 100 ppm de cada compuesto fenólico evaluado, para obtener una matriz simulada con concentración final de 50, 100 y 500 ppm respectivamente, usando el extracto enzimático con actividad lacasa obtenido de *Dictyopanus pusillus* LMB4 y una lacasa comercial de *Trametes versicolor*, por un periodo de 96 horas, a condiciones de oscuridad, con mediciones cada 12 horas del porcentaje de transformación.

Se observa que el extracto enzimático con actividad lacasa obtenido de *Dictyopanus pusillus* LMB4 transformó las concentraciones de 50, 100 y 500 ppm de compuestos fenólicos en un 52, 66 y 74% respectivamente (**Figura 22**). Así mismo, la lacasa comercial de *Trametes versicolor* transformó las concentraciones de 50, 100 y 500 ppm de compuestos fenólicos en un 90, 90 y 80% respectivamente (**Figura 22**). En la matriz acuosa simulada se observa el mismo efecto encontrado en las transformaciones de los compuestos fenólicos individuales, donde el extracto enzimático con actividad lacasa obtenido de *Dictyopanus pusillus* LMB4 presentó un mayor porcentaje de transformación a altas concentraciones de compuestos fenólicos, y la lacasa comercial de *Trametes versicolor*, presentó mayor porcentaje de transformación de compuestos fenólicos a bajas concentraciones. Estos resultados sugieren que el extracto enzimático con actividad lacasa obtenido de *Dictyopanus pusillus* LMB4 podría aplicarse en un proceso industrial con alto contenido de compuestos fenólicos. También, se observa que el extracto enzimático con actividad lacasa obtenido de *Dictyopanus pusillus* LMB4 disminuyó el porcentaje de transformación de compuestos fenólicos cuando se encontraban mezclados, en comparación con los compuestos

fenólicos libres (sección 4.5). A diferencia de la lacasa comercial de *Trametes versicolor*, quien aumentó el porcentaje de transformación de compuestos fenólicos al estar mezclados. Esto se puede atribuir posiblemente a la generación de los productos intermedios formados de la transformación de los compuestos fenólicos, quienes pueden actuar como mediadores, inductores o represores de la actividad enzimática de la lacasa (R. Couto & Toca, 2006; Sanroma et al., 2005).

Figura 22. Porcentaje de transformación de ácido gálico, 4-clorofenol, fenol, β -naftol y 2-*tert*-butilfenol presentes en una matriz acuosa simulada con concentración final de 50 (naranja), 100 (azul) y 500 (rosado) ppm por 300 UL⁻¹ de extracto enzimático con actividad lacasa de *Dictyopanus pusillus* LMB4 (cuadrados) y lacasa comercial de *Trametes versicolor* (circulos) a 96 horas de incubación, en condiciones de oscuridad, pH 5.4 y temperatura 45°C. Los valores representan la media de los datos $\pm$ DS de tres replicas.



Algunos autores han descrito lacasas de hongos basidiomicetos capaces de transformar mezclas de compuestos fenólicos presentes en matrices acuosas simuladas o reales. Bollag, Chu, Rao, & Gianfreda, 2003 observaron que en pH 7 y a 25°C la lacasa de *Trametes villosa* (2 U/mL) transformó una matriz acuosa simulada que contenía una concentración total de 1.5 mM de 4-clorofenol (0.5 mM), 2,4-diclorofenol (0.5 mM) y 2,4,6-triclorofenol (0.5 mM) en un 54, 74 y 65% respectivamente después de 24 horas de reacción. Vargas & Ramírez, 2002 encontraron que a pH 4.6 la lacasa de *Trametes versicolor* (5 U/mL) transformó un efluente de agua de la refinería de petróleo que contenía 16 mg/L de fenoles totales en un 98% después de 12 horas de reacción. Así mismo, la lacasa de *Trametes versicolor* (5 U/mL) transformó una muestra de agua de refinería de petróleo que contenía 248.35 mg/L de fenoles totales en un 99% después de 48 horas de reacción a un pH 7.3.

6. Conclusiones

- ❖ El presente trabajo muestra el potencial de *Byssomerulius corium* LMB1, *Dictyopanus pusillus* LMB4 e *Hyphodontia* LMB5; hongos autóctonos de Santander, en la transformación de 50, 100 y 500 ppm de compuestos fenólicos.
- ❖ El extracto enzimático de *Dictyopanus pusillus* LMB4 obtenido en fermentación en estado sólido (SSF) utilizando subproductos lignocelulósicos del beneficio de la palma aceitera como medio inductor de enzimas ligninolíticas, posee únicamente actividad lacasa a una concentración de $255.6 \pm 0.9 \text{ UL}^{-1}$.

- ❖ El extracto enzimático con actividad lacasa obtenido de *Dictyopanus pusillus* LMB4 tiene la capacidad de transformar ácido gálico, fenol, 4-clorofenol, β -naftol y 2-tert-butilfenol de manera individual y cuando se encuentran agrupados en una matriz acuosa. Sin embargo, la actividad catalítica del extracto enzimático se ve disminuida por la mezcla de los cinco compuestos fenólicos.
- ❖ 2-tert-butilfenol es inhibidor del crecimiento de los aislamientos fúngicos empleados en el desarrollo de este proyecto.
- ❖ El extracto enzimático con actividad lacasa obtenido de *Dictyopanus pusillus* LMB4 transformó 50, 100 y 500 ppm de 2-tert-butilfenol en un 48, 60 y 81%.
- ❖ El extracto enzimático con actividad lacasa obtenido de *Dictyopanus pusillus* LMB4 presenta un potencial en la transformación de altas y bajas concentraciones de compuestos fenólicos presentes en matrices acuosas.

7. Recomendaciones

1. Optimizar la fermentación en estado sólido utilizando como sustrato subproductos lignocelulósicos del beneficio de la palma aceitera, mediante el uso de oligoelementos que estimulen la producción y secreción de enzimas ligninolíticas (lacasa, manganeso peroxidasa y lignina peroxidasa).

2. Utilizar otra metodología que permita cuantificar compuestos fenólicos, como los métodos cromatográficos, para determinar el porcentaje de transformación individual de los compuestos fenólicos cuando se encuentran en una matriz acuosa simulada.
3. Identificar los productos generados de la transformación de compuestos fenólicos, para evaluar si presentan menor o mayor toxicidad que el compuesto transformado.
4. Evaluar el porcentaje de transformación de compuestos fenólicos en un matriz acuosa real, ya que estas aguas pueden incluir contaminantes que inhiban la actividad enzimática.

8. Divulgación

Nombre del evento: XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería

Fecha y lugar: 23 – 28 junio 2019, León – Guanajuato, México

Producto asociado: Evaluación cualitativa de la biodegradación de compuestos fenólicos por hongos lignocelulolíticos autóctonos de Santander, Colombia.

Nombre del evento: IV Simposio Internacional de Biotecnología

Fecha y lugar: 2 octubre 2019, Medellín, Colombia

Producto asociado: Degradación de compuestos fenólicos por extractos enzimáticos con actividad lacasa de *Dictyopanus* sp.

Referencias Bibliográficas

- Abbassian, K., Kargari, A., & Kaghazchi, T. (2015). Phenol Removal from Aqueous Solutions by a Novel Industrial Solvent Phenol Removal from Aqueous Solutions by a Novel Industrial Solvent, 6445. <https://doi.org/10.1080/00986445.2013.848804>
- Abdel hamid, A. M., Solbiati, J. O., & Cann, I. K. O. (2013). *Insights into Lignin Degradation and its Potential Industrial Applications*. BS:AAM (Vol. 82). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407679-2.00001-6>
- Abdelwahab, O., Amin, N. K., & El-ashtoukhy, E. Z. (2009). Electrochemical removal of phenol from oil refinery wastewater, 163, 711–716. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.07.016>
- Ajaz, M., Noor, N., Rasool, S. A., & Khan, S. A. (2004). Phenol Resistant Bacteria From Soil: and Genetical Studies, 36(2), 415–424.
- Alshabib, M., & Onaizi, S. A. (2019). A review on phenolic wastewater remediation using homogeneous and heterogeneous enzymatic processes: Current status and potential challenges. *Separation and Purification Technology*, 219(February), 186–207. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2019.03.028>
- Ancona, W., Raul, E., Tussell, T., Pool, L., Abraham, Y., Cauch, C., & Lizama, G. (2018). Laccase-mediator system produced by *Trametes hirsuta* Bm-2 on lignocellulosic substrate improves dye decolorization. *3 Biotech*, 8(7), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1323-y>
- Ang, T. N., Ngoh, G. C., Seak, A., & Chua, M. (2011). A quantitative method for fungal ligninolytic enzyme, (May 2010), 589–595. <https://doi.org/10.1002/apj>
- Anku, W. W. (2017). Phenolic Compounds in Water: Sources , Reactivity , Toxicity and

- Treatment Methods World ' s largest Science , Technology & Medicine Open Access book publisher, (February). <https://doi.org/10.5772/66927>
- Asadgol, Z., Forootanfar, H., Rezaei, S., Mahvi, A. H., & Faramarzi, M. A. (2014a). Environmental Health Removal of phenol and bisphenol-A catalyzed by laccase in aqueous solution, *12*(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/2052-336X-12-93>
- Ashe, B., Nguyen, L. N., Hai, F. I., Lee, D., Merwe, J. P. Van De, Leusch, F. D. L., ... Nghiem, L. D. (2016). International Biodeterioration & Biodegradation Impacts of redox-mediator type on trace organic contaminants degradation by laccase : Degradation efficiency , laccase stability and effluent toxicity. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *113*, 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.04.027>
- Balcázar lópez, E., Méndez lorenzo, L. H., Batista, R. A., Esquivel naranjo, U., Ayala, M., & Kumar, V. V. (2016). Xenobiotic Compounds Degradation by Heterologous Expression of a *Trametes sanguineus* Laccase in *Trichoderma atroviride*, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147997>
- Begerow, D., Nilsson, H., Unterseher, M., & Maier, W. (2010). Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures, 99–108. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2585-4>
- Bettin, F. (2019). Effects of pH , Temperature and Agitation on the Decolourisation of Dyes by Laccase-Containing Enzyme Preparation from *Pleurotus sajor-caju*, *62*(1).
- Bettin, F., Cousseau, F., Martins, K., Amanda, N., Zaccaria, S., Moura, M., ... Dillon, P. (2019). Phenol removal by laccases and other phenol oxidases of *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 in submerged cultivations and aqueous mixtures, *236*(February), 581–590.
- Bollag, J., Chu, H.-L., Rao, M. A., & Gianfreda, L. (2003). Enzymatic Oxidative Transformation

of Chlorophenol Mixtures, 63–69.

Camacho Morales, R. L., GerardoGgerardo, J. L., Navarro, K. G., & Sánchez, J. E. (2017).

Producción de enzimas ligninolíticas durante la degradación del herbicida paraquat por hongos de la pudrición blanca. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(2), 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.11.004>

Ceylan, Z., & Turgay, S. (2016). Embryotoxicity of nitrophenols to the early life stages of zebrafish (*Danio rerio*), 32(8), 1414–1422. <https://doi.org/10.1177/0748233714562444>

Chang, M., Wang, T., Yeung, S., Jeng, P., Liao, C., Lin, T., ... Jeng, J. (2011). Antiplatelet effect by p -cresol , a uremic and environmental toxicant , is related to inhibition of reactive oxygen species , ERK / p38 signaling and thromboxane A 2 production. *Atherosclerosis*, 219(2), 559–565. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.09.031>

Cháves Sifontes, M., & Dominie, M. E. (2013). Lignin , Structure and Applications : Depolymerization Methods for Obtaining Aromatic Derivates of Industrial Interest, 15–46.

Chiong, T., Lau, S. Y., Khor, E. H., & Danquah, M. K. (2014). Enzymatic approach to phenol removal from wastewater using peroxidases, 1–6.

Cullen D & Kersten PJ. (2004). 13 Enzymology and Molecular Biology of Lignin Degradation.

Deswal, D., Khasa, Y. P., & Kuhad, R. C. (2011). Bioresource Technology Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp . RCK2010 under solid state fermentation. *Bioresource Technology*, 102(10), 6065–6072. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.032>

Eastwood, D. C., & Park, S. (2014). Evolution of Fungal Wood Decay.

EPA. (2014). Table II . EPCRA Section 313 Chemical List For Reporting Year 2014, 2014, 1–23.

Falade, A. O., Nwodo, U. U., Iweriebor, B. C., Green, E., Mabinya, L. V., & Okoh, A. I. (2017).

- Lignin peroxidase functionalities and prospective applications, (June 2016), 1–14.
<https://doi.org/10.1002/mbo3.394>
- Fernández Fueyo, E., Dueñas Ruiz, F. J., López Lucendo, M. F., Pérez Boada, M., Rencoret, J., Gutiérrez, A., ... Martínez, A. T. (2016). Biotechnology for Biofuels A secretomic view of woody and nonwoody lignocellulose degradation by *Pleurotus ostreatus*. *Biotechnology for Biofuels*, 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0462-9>
- Fernández, J. A., Henao, L. M., & Pedroza-rodríguez, A. M. (2009). Inmovilización de hongos ligninolíticos para la remoción del colorante negro reactivo 5 Immobilising lignilolytic fungus for removing reactive black 5 dye, (1).
- García, R., Torres, E., Parra, R., & Mahlknecht, J. (2015). Biotransformation of Endocrine-Disrupting Compounds in Groundwater : Bisphenol A , Nonylphenol , Ethynylestradiol and Triclosan by a Laccase Cocktail from *Pycnoporus sanguineus* CS43, 1–14.
<https://doi.org/10.1007/s11270-015-2514-3>
- Ge, T., Han, J., Qi, Y., Gu, X., Ma, L., Zhang, C., & Naeem, S. (2017). The toxic effects of chlorophenols and associated mechanisms in fish. *Aquatic Toxicology*, 184, 78–93.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.01.005>
- Girish, C. R., & Murty, V. R. (2014). Adsorption of Phenol from Aqueous Solution Using Lantana camara , Forest Waste : Kinetics , Isotherm , and Thermodynamic Studies, 2014.
- González Rodríguez, J. C., & Guerra Rodeiro, I. D. (2014). El sistema citocromo P450 y el metabolismo de xenobióticos Cytochrome P450 system and xenobiotic metabolism, 48(2), 495–507.
- Hofrichter, M. (2002). Review : lignin conversion by manganese peroxidase (MnP), 30, 454–466.

- Hosseinzadeh, P., Mirts, E. N., Pfister, T. D., Gao, Y.-G., Mayne, C., Robinson, H., ... Lu, Y. (2016). secondary sphere interactions, 55(10), 1494–1502. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b01299>. Enhancing
- Hublik, G., & Schinner, F. (2000). Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants, 27, 330–336.
- Igbinosa, E. O., Odjadjare, E. E., Chigor, V. N., Igbinosa, I. H., Emoghene, A. O., Ekhaize, F. O., ... Idemudia, O. G. (2013). Toxicological Profile of Chlorophenols and Their Derivatives in the Environment : The Public Health Perspective, 2013.
- Janusz, G., Kucharzyk, K. H., Pawlik, A., Staszczak, M., & Paszczynski, A. J. (2013). Enzyme and Microbial Technology Fungal laccase , manganese peroxidase and lignin peroxidase : Gene expression and regulation. *Enzyme and Microbial Technology*, 52(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2012.10.003>
- Järvinen, J., Taskila, S., Isomäki, R., & Ojamo, H. (2012). Screening of white-rot fungi manganese peroxidases : a comparison between the specific activities of the enzyme from different native producers, 1–9.
- Jiang, Y., Cai, X., Wu, D., & Ren, N. (2010). Biodegradation of phenol and m -cresol by mutated *Candida tropicalis*. *Journal of Environmental Sciences*, 22(4), 621–626. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(09\)60154-6](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(09)60154-6)
- Johannes, C., & Majcherczyk, A. (2000). Laccase activity tests and laccase inhibitors, 78, 193–199.
- Kadimaliev, D. A., Revin, V. V., Atykyan, N. A., Nadezhina, O. S., & Parshin, A. A. (2011). The Role of Laccase and Peroxidase of *Lentinus (Panus) tigrinus* Fungus in Biodegradation of

- High Phenol Concentrations in Liquid Medium, 47(1), 73–78.
<https://doi.org/10.1134/S0003683811010066>
- Karigar, C. S., & Rao, S. S. (2011). Role of Microbial Enzymes in the Bioremediation of Pollutants : A Review, 2011(Figure 1). <https://doi.org/10.4061/2011/805187>
- Khindaria, A., Yamazaki, I., & Aust, S. D. (1996). Stabilization of the Veratryl Alcohol Cation Radical by Lignin Peroxidase †, 2960(1995), 6418–6424.
- Kim, N. K., Park, J. Y., Park, M. S., Lee, H., Cho, H. J., Eimes, A., ... Lim, Y. W. (2016). Five New Wood Decay Fungi (Polyporales and Hymenochaetales) in Korea Mycobiology Five New Wood Decay Fungi (Polyporales and Hymenochaetales) in Korea, 8093.
<https://doi.org/10.5941/MYCO.2016.44.3.146>
- Krastanov, A., Alexieva, Z., & Yemendzhiev, H. (2013). Microbial degradation of phenol and phenolic derivatives, 76–87. <https://doi.org/10.1002/elsc.201100227>
- Ku, U. (2015). ScienceDirect Fungal enzymes for environmental management " es, 268–278.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.03.006>
- Kudo, T. J. M. O. T. (2003). Isolation and cDNA cloning of novel hydrogen peroxide-dependent phenol oxidase from the basidiomycete Termitomyces albuminosus, 220–225.
<https://doi.org/10.1007/s00253-003-1236-4>
- Kulkarni, S. J. (2013). Review on Research for Removal of Phenol from, 3(4), 1–5.
- Kumaran y Paruchuri. (1997). Kinetics of Phenol Biotransformation, 31(1), 11–22.
- Kunamneni, A., Plou, F. J., Ballesteros, A., & Alcalde, M. (2008). Laccases and their applications : A patent review, 1–50.
- Kurniawati, S., & Nicell, J. A. (2008). Characterization of Trametes versicolor laccase for the transformation of aqueous phenol, 99, 7825–7834.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.01.084>

- Lassouane, F., Aït-amar, H., Amrani, S., & Rodriguez-couto, S. (2019). Bioresource Technology A promising laccase immobilization approach for Bisphenol A removal from aqueous solutions. *Bioresource Technology*, 271(September 2018), 360–367. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.129>
- Levin, L., Carabajal, M., & Hofrichter, M. (2016). International Biodeterioration & Biodegradation Degradation of 4-nitrophenol by the white-rot polypore *Trametes versicolor*, 107, 174–179. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.11.023>
- Liu, Z. F., Zeng, G. M., Zhong, H., Yuan, X. Z., Fu, H. Y., Zhou, M. F., ... Li, J. B. (2012). Effect of dirhamnolipid on the removal of phenol catalyzed by laccase in aqueous solution, 175–181. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0806-3>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). The folin by oliver.
- Lu, Y., Yan, L., Wang, Y., Zhou, S., Fu, J., & Zhang, J. (2009). Biodegradation of phenolic compounds from coking wastewater by immobilized white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*, 165, 1091–1097. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.10.091>
- Mahiudddin, M., Fakhruddin, A. N. M., & Al-Mahin, A. (2012). Degradation of Phenol via Meta Cleavage Pathway by *Pseudomonas fluorescens* PU1, 2012. <https://doi.org/10.5402/2012/741820>
- Mali, T., Kuuskeri, J., Shah, F., & Lundell, T. K. (2017). Interactions affect hyphal growth and enzyme profiles in combinations of coniferous wood- decaying fungi of Agaricomycetes, 1–21.
- Martínková, L., Kotik, M., Marková, E., & Homolka, L. (2016). Chemosphere Biodegradation of phenolic compounds by Basidiomycota and its phenol oxidases: A review, 149.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.022>

Michałowicz, J., & Duda, W. (2007). Phenols – Sources and Toxicity, *16*(3), 347–362.

Mijangos, F., & Varona, F. (2006). Changes in Solution Color During Phenol Oxidation by Fenton Reagent, *40*(17), 5538–5543.

Mishra, V. K., & Kumar, N. (2017). Microbial Degradation of Phenol : A Review, (May).

Mohammadi, S., Kargari, A., Sanaeepur, H., Abbassian, K., Najafi, A., & Mofarrah, E. (2014). Desalination and Water Treatment Phenol removal from industrial wastewaters : a short review, (April 2014), 37–41. <https://doi.org/10.1080/19443994.2014.883327>

Moiseenko, K. V, Vasina, D. V, Farukshina, K. T., Savinova, O. S., Glazunova, O. A., Fedorova, T. V, & Tyazhelova, T. V. (2018). AC SC. *Fungal Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.02.006>

Morozova, O. V, Shumakovich, G. P., Gorbacheva, M. A., Shleev, S. V, & Yaropolov, A. I. (2007). “ Blue ” Laccases, *72*(10), 1136–1150.

Mukherjee, S., & Basak, B. (2013). Potential use of polyphenol oxidases (PPO) in the bioremediation of phenolic contaminants containing industrial wastewater, 61–73. <https://doi.org/10.1007/s11157-012-9302-y>

Musa et al. (2018). Biological Removal of Phenol from Waste Water Using a Bacterial Biofilm, (April), 2–5. <https://doi.org/10.24327/IJRSR>

Nguyen, L. N., Merwe, J. P. Van De, Hai, F. I., Leusch, F. D. L., Kang, J., Price, W. E., ... Nghiem, L. D. (2016). Bioresource Technology Laccase – syringaldehyde-mediated degradation of trace organic contaminants in an enzymatic membrane reactor : Removal efficiency and effluent toxicity, *200*, 477–484. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.054>

Paper, O. (1998). Laccase from the white-rot fungus *Trametes trogii*, 545–546.

- Papinutti, V. L., & Forchiassin, F. (2007). Lignocellulolytic enzymes from *Fomes sclerodermeus* growing in solid-state fermentation, *81*, 54–59.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.006>
- Peng, Y., Lin, Y., Wang, S., Hung, K., Chen, Y., & Wang, S. (2013). p-Cresol induces disruption of cardiomyocyte adherens junctions. *Toxicology*, *306*, 176–184.
<https://doi.org/10.1016/j.tox.2013.02.015>
- Peterson, G. L. (1979). Review of the Folin Phenol Protein Quantitation Method of Lowry , *220*, 201–220.
- Pietarinen, S. P., Willför, S. M., Vikström, F. A., & Bjarne, R. (2007). Aspen Knots , a Rich Source of Flavonoids, *3813*. <https://doi.org/10.1080/02773810601023487>
- Piontek, K., Antorini, M., & Choinowski, T. (2002). Crystal Structure of a Laccase from the Fungus *Trametes versicolor* at 1 . 90-Å Resolution Containing a Full Complement of Coppers *, *277(40)*, 37663–37669. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204571200>
- Plaza, G. A., Upchurch, R., Brigmon, R. L., Whitman, W. B., & Ulfig, K. (2004). Rapid DNA Extraction for Screening Soil Filamentous Fungi Using PCR Amplification, *13(3)*, 315–318.
- Pradeep, N. V, Anupama, S., Navya, K., Shalini, H. N., Idris, M., & Hampannavar, U. S. (2015). Biological removal of phenol from wastewaters : a mini review, 105–112.
<https://doi.org/10.1007/s13201-014-0176-8>
- Qin, X., Zhang, J., Zhang, X., & Yang, Y. (2014). Induction , Purification and Characterization of a Novel Manganese Peroxidase from *Irpex lacteus* CD2 and Its Application in the Decolorization of Different Types of, *9(11)*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113282>
- Quintero, C. (2011). Revisión : Degradación de Plaguicidas Mediante Hongos de la Pudrición Blanca de la Madera, *64(1)*, 5867–5882.

- R. Couto, S., & Toca, J. L. (2006). Inhibitors of Laccases : A Review. *Current Enzyme Inhibition*, 2, 343–352. <https://doi.org/10.2174/157340806778699262>
- Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., & Oberlies, N. H. (2017). Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>
- Ramirez Aristizábal, L. S., & Arango Londoño, Á. M. (2017). Artículo de revisión Macromicetos: generalidades, desinfección y cultivo in vitro, 1–13.
- Ramírez, E., Asunción, M., Saucedo, V., Martínez, A., & Velasco, C. (2016). We are IntechOpen , the world ' s leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 %.
- Rao, A., Zhang, Y., Muend, S., & Rao, R. (2010). Mechanism of Antifungal Activity of Terpenoid Phenols Resembles Calcium Stress and Inhibition of the TOR Pathway □, 54(12), 5062–5069. <https://doi.org/10.1128/AAC.01050-10>
- Rappoport. (2003). *The chemistry of phenols Patai Series : The Chemistry of Functional Groups*.
- Reddy, G. V. B., & Gold, M. H. (2018). Degradation of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium* : intermediates and reactions involved, (2000), 405–413.
- Rodríguez delgado, M., Orona navar, C., García morales, R., Hernandez luna, C., Parra, R., Mahlknecht, J., & Ornelas soto, N. (2016). International Biodeterioration & Biodegradation Biotransformation kinetics of pharmaceutical and industrial micropollutants in groundwaters by a laccase cocktail from *Pycnoporus sanguineus* CS43 fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 108, 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.12.003>
- Rueda, A. M., López de los Santos, Y., Vincent, A. T., Létourneau, M., Hernández, I., Sánchez, C. I., ... Doucet, N. (2020). Genome sequencing and functional characterization of a, 1–29.

- Ryan, D., Leukes, W., & Burton, S. (2007). Improving the bioremediation of phenolic wastewaters by *Trametes versicolor*, 98, 579–587. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.02.001>
- Saha, B., Taylor, K. E., Bewtra, J. K., Asce, F., & Biswas, N. (2011). Laccase-Catalyzed Removal of Phenol and Benzenediols from Wastewater, (January), 13–20.
- Sánchez Rangel, J. C., Benavides, J., Heredia, J. B., Cisneros Zevallos, L., & Jacobo Velázquez, D. A. (2013). Analytical Methods The Folin – Ciocalteu assay revisited : improvement of its specificity for total phenolic content determination, 5990–5999. <https://doi.org/10.1039/c3ay41125g>
- Sanroma, M. A., Lorenzo, M., Moldes, D., & Rodri, S. (2005). Inhibition of laccase activity from *Trametes versicolor* by heavy metals and organic compounds, 60, 1124–1128. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.12.051>
- Sgorbini, B., Pignata, C., Spina, F., Cordero, C., Schilir, T., Gilli, G., ... Cristina, G. (2015). Removal of micropollutants by fungal laccases in model solution and municipal wastewater : evaluation of estrogenic activity and ecotoxicity, 100, 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.03.047>
- Shekher, R., Sehgal, S., Kamthania, M., & Kumar, A. (2011). Laccase : Microbial Sources , Production , Purification , and Potential Biotechnological Applications, 2011. <https://doi.org/10.4061/2011/217861>
- Singh, T., Bhatiya, A. K., Mishra, P. K., & Srivastava, N. (2020). *An effective approach for the degradation of phenolic waste : phenols and cresols. Abatement of Environmental Pollutants.* Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818095-2.00011-4>
- Strong, P. J., & Claus, H. (2011). Technology Laccase : A Review of Its Past and Its Future in Bioremediation Laccase : A Review of Its Past and Its Future in Bioremediation, 3389.

<https://doi.org/10.1080/10643380902945706>

- Sun, X., Wang, C., Li, Y., Wang, W., & Wei, J. (2015). Treatment of phenolic wastewater by combined UF and NF / RO processes. *DES*, 355, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2014.10.018>
- Tang, J., Song, M., Watanabe, G., Nagaoka, K., & Rui, X. (2016). Effects of 4-nitrophenol on expression of the ER- α and AhR signaling pathway-associated genes in the small intestine of rats *. *Environmental Pollution*, 216, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.040>
- Ting, W. T. E., Yuan, S. Y., Wu, S. D., & Chang, B. V. (2011). International Biodeterioration & Biodegradation Biodegradation of phenanthrene and pyrene by *Ganoderma lucidum*, 65, 238–242. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.11.007>
- Tsujiyama, S., Muraoka, T., & Takada, N. (2013). Biodegradation of 2, 4-dichlorophenol by shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) using vanillin as an activator, 1079–1083. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1179-5>
- Uhnáková, B., Petr, A., Papoušková, B., Šulc, M., & Martínková, L. (2009). Chemosphere Biodegradation of brominated aromatics by cultures and laccase of *Trametes versicolor* ěc, 76, 826–832. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.04.016>
- Upadhyay, P., Shrivastava, R., & Kumar, P. (2016). Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. 3 *Biotech*, 6(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0316-3>
- Vargas, M. C., & Ramírez, N. E. (2002). Phenol Oxidation of Petrol, 2, 23–30.
- Vidhyasekaran, P. (2007). *Fungal Pathogenesis in Plants and Crops: Molecular Biology and Host Defense Mechanisms* (2nd ed.).
- Villegas, L. G. C., Mashhadi, N., Chen, M., Mukherjee, D., Taylor, K. E., & Biswas, N. (2016). A

- Short Review of Techniques for Phenol Removal from Wastewater. *Current Pollution Reports*, 157–167. <https://doi.org/10.1007/s40726-016-0035-3>
- Vom, F. S., Akingbemi, B. T., Belcher, S. M., Birnbaum, L. S., Crain, D. A., Eriksen, M., & Ho, S. M. (2007). Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement : Integration of mechanisms , effects in animals and potential to, 24, 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.07.005>
- Wang, Y., Song, J., Zhao, W., He, X., Chen, J., & Xiao, M. (2011). In situ degradation of phenol and promotion of plant growth in contaminated environments by a single *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Journal of Hazardous Materials*, 192(1), 354–360. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.05.031>
- Wong, D. W. S. (2009). *Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes*. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8279-z>
- Wu, D., Tao, X., Chen, Z., Han, J., Jia, W., Zhu, N., ... He, Y. (2016). The environmental endocrine disruptor p -nitrophenol interacts with FKBP51 , a positive regulator of androgen receptor and inhibits androgen receptor signaling in human cells. *Journal of Hazardous Materials*, 307, 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.12.045>
- Xu, J., Zhou, F., Ji, B., Pei, R., & Xu, N. (2008). The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*, 47, 174–179. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02407.x>
- Xu, X., Lin, M., Zang, Q., & Shi, S. (2017). Solid state bioconversion of lignocellulosic residues by *Inonotus obliquus* for production of cellulolytic enzymes and saccharification. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.192>
- Yamasaki, H., Makihata, Y., & Fukunaga, K. (2006). Efficient phenol removal of wastewater from

- phenolic resin plants using crosslinked cyclodextrin particles, *1276*(December 2005), 1271–1276. <https://doi.org/10.1002/jctb>
- Yan, J., Chen, Y., Niu, J., Chen, D., & Chagan, I. (2015). Laccase produced by a thermotolerant strain of *Trametes trogii* LK13, *65*, 59–65.
- Yan, L., Wang, Y., Li, J., Ma, H., Liu, H., Li, T., & Zhang, Y. (2014). Comparative study of different electrochemical methods for petroleum refinery wastewater treatment, *341*, 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2014.02.037>
- Yang, J., Li, W., Ng, T. B., Deng, X., Lin, J., & Ye, X. (2017). Laccases : Production , Expression Regulation , and Applications in Pharmaceutical Biodegradation, *8*(May). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00832>
- Zahra, F., Rezaei, S., Mohammad, A. F., & Mehran, H. (2019). International Journal of Biological Macromolecules Catalytic phenol removal using entrapped cross-linked laccase aggregates. *International Journal of Biological Macromolecules*, *122*, 359–366. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.147>
- Zeng, S., Zhao, J., & Xia, L. (2017). Simultaneous production of laccase and degradation of bisphenol A with *Trametes versicolor* cultivated on agricultural wastes. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *40*(8), 1237–1245. <https://doi.org/10.1007/s00449-017-1783-1>
- Zhang, H., Taya, K., Nagaoka, K., Yoshida, M., & Watanabe, G. (2017). 4-Nitrophenol (PNP) inhibits the expression of estrogen receptor b and disrupts steroidogenesis during the ovarian development in. *Environmental Pollution*, *229*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.04.088>
- Zhang, J., Liu, X., Xu, Z., Chen, H., & Yang, Y. (2008). Degradation of chlorophenols catalyzed by laccase \$, *61*, 351–356. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2007.06.015>

- Zhang, Y., Zeng, Z., Zeng, G., Liu, X., Liu, Z., & Chen, M. (2012). Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Effect of Triton X-100 on the removal of aqueous phenol by laccase analyzed with a combined approach of experiments and molecular docking. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 97, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.04.001>
- Zhou, L., Cao, H., Descorme, C., & Xie, Y. (2018). Phenolic compounds removal by wet air oxidation based processes, 12(1), 1–20. <https://doi.org/10.1007/s11783-017-0970-2>
- Zouari, H., Labat, M., & Sayadi, S. (2002). Degradation of 4-chlorophenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* in free and immobilized cultures, 84, 145–150.

Apéndice A

Tablas de área de crecimiento, área de halo de degradación y relación eficiencia enzimática de *Byssomerulis corium* LMB1, *Dictyopanus pusillus* LMB4, *Hyphodontia* LMB5 y *Trametes* LMB15, a 30 días en medio de cultivo base (MCB) y medio de cultivo base suplementado (MCBs) con concentraciones de 50, 100 y 500 ppm de ácido gálico, 4-clorofenol, 2,4-dinitrofenol, fenol, β -naftol, 2-nitrofenol, 2-*tert*-butilfenol y 2,4,6-tribromofenol.

Tabla 15.

Crecimiento, área de halo de degradación y relación eficiencia enzimática de Byssomerulis corium LMB1 en medio de cultivo base (MCB) y medio de cultivo base suplementado (MCBs) con concentraciones de 50, 100 y 500 ppm de ácido gálico, 4-clorofenol, 2,4-dinitrofenol, fenol, β -naftol, 2-nitrofenol, 2-tert-butilfenol y 2,4,6-tribromofenol.

Compuesto	Concentración, ppm	Área crecimiento, mm ² *	Área halo, mm ² *	Relación eficiencia enzimática*
MCB	0	4085 ± 566	0 ± 0	0 ± 0
	50	3530 ± 316	0 ± 0	0 ± 0
Ácido gálico	100	3505 ± 63	0 ± 0	0 ± 0
	500	3632 ± 107	0 ± 0	0 ± 0
	50	3632 ± 107	0 ± 0	0 ± 0
4-Clorofenol	100	3327 ± 408	0 ± 0	0 ± 0
	500	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
2,4-Dinitrofenol	50	3528 ± 210	382 ± 69	0.108 ± 0.013

	100	3740	±	108	255	±	28	0.068	±	0.006
	500	3636	±	320	0	±	0	0	±	0
	50	4072	±	113	0	±	0	0	±	0
Fenol	100	4539	±	239	573	±	42	0.126	±	0.003
	500	580.9	±	169.8	1737	±	148	3.119	±	0.669
	50	3218	±	101	0	±	0	0	±	0
β-Naftol	100	3244	±	51	0	±	0	0	±	0
	500	3353	±	59	0	±	0	0	±	0
	50	3758	±	651	0	±	0	0	±	0
2-Nitrofenol	100	1928	±	694	0	±	0	0	±	0
	500	1604	±	354	0	±	0	0	±	0
	50	0	±	0	0	±	0	0	±	0
2-tert-Butilfenol	100	0	±	0	0	±	0	0	±	0
	500	0	±	0	0	±	0	0	±	0
	50	3331	±	511	0	±	0	0	±	0
2,4,6-Tribromofenol	100	3530	±	316	0	±	0	0	±	0
	500	3423	±	207	757	±	97	0.220	±	0.015

* Valores medios (n=3) ± DS

Tabla 16.

Crecimiento, área de halo de degradación y relación eficiencia enzimática de Dictyopanus pusillus LMB4 en medio de cultivo base (MCB) y medio de cultivo base suplementado (MCBs) con concentraciones de 50, 100 y 500 ppm de ácido gálico, 4-clorofenol, 2,4-dinitrofenol, fenol, β-naftol, 2-nitrofenol, 2-tert-butilfenol y 2,4,6-tribromofenol.

Compuesto	Concentración, ppm	Área crecimiento, mm ² *	Área halo, mm ² *	Relación eficiencia enzimática*
MCB	0	4174 ± 46	0 ± 0	0 ± 0
	50	3849 ± 110	3849 ± 110	1.000 ± 0.000
Ácido gálico	100	3748 ± 434	3857 ± 440	1.029 ± 0.002
	500	4306 ± 349	4423 ± 353	1.027 ± 0.001
	50	2299 ± 339	2295 ± 255	1.002 ± 0.037
4-Clorofenol	100	916 ± 214	916 ± 214	1.000 ± 0.000
	500	170 ± 18	189 ± 19	1.112 ± 0.006
	50	2556 ± 269	2556 ± 269	1.000 ± 0.000
2,4-Dinitrofenol	100	2560 ± 358	2650 ± 364	1.036 ± 0.003
	500	491 ± 39	531 ± 41	1.082 ± 0.003
	50	3320 ± 204	3423 ± 207	1.031 ± 0.001
Fenol	100	3964 ± 335	3961 ± 223	1.001 ± 0.028
	500	21.4 ± 0.2	76 ± 10	3.554 ± 0.436
	50	3859 ± 22	3925 ± 61	1.017 ± 0.010
β-Naftol	100	3851 ± 220	3961 ± 223	1.029 ± 0.001
	500	3107 ± 20	3187 ± 20	1.026 ± 0.000
	50	3652 ± 214	3664 ± 97	1.005 ± 0.033
2-Nitrofenol	100	3961 ± 223	4074 ± 226	1.028 ± 0.001
	500	3029 ± 39	3107 ± 40	1.026 ± 0.000
	50	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
2-tert-Butilfenol	100	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

2,4,6-Tribromofenol	500	0	±	0	0	±	0	0	±	0
	50	3729	±	97	3816	±	99	1.023	±	0.000
	100	4151	±	34	4243	±	35	1.022	±	0.000
	500	3990	±	138	4117	±	80	1.032	±	0.017

* Valores medios (n=3) ± DS

Tabla 17.

Crecimiento, área de halo de degradación y relación eficiencia enzimática de Hyphodonthia LMB5 en medio de cultivo base (MCB) y medio de cultivo base suplementado (MCBs) con concentraciones de 50, 100 y 500 ppm de ácido gálico, 4-clorofenol, 2,4-dinitrofenol, fenol, β-naftol, 2-nitrofenol, 2-tert-butilfenol y 2,4,6-tribromofenol.

Compuesto	Concentración, ppm	Área crecimiento, mm ² *			Área halo, mm ² *			Relación eficiencia enzimática*		
MCB	0	3579	±	42	0	±	0	0	±	0
	50	3320	±	204	0	±	0	0	±	0
Ácido gálico	100	3268	±	41	0	±	0	0	±	0
	500	2552	±	90	0	±	0	0	±	0
4-Clorofenol	50	1020	±	113	0	±	0	0	±	0
	100	0	±	0	0	±	0	0	±	0
	500	0	±	0	0	±	0	0	±	0
2,4-Dinitrofenol	50	3320	±	204	0	±	0	0	±	0
	100	3329	±	61	0	±	0	0	±	0
	500	3999	±	232	0	±	0	0	±	0

Fenol	50	3423	±	207	0	±	0	0	±	0
	100	3473	±	63	0	±	0	0	±	0
	500	0.0	±	0.0	0	±	0	0	±	0
β-Naftol	50	3268	±	61	0	±	0	0	±	0
	100	3122	±	297	0	±	0	0	±	0
	500	3024	±	292	0	±	0	0	±	0
2-Nitrofenol	50	3344	±	307	0	±	0	0	±	0
	100	700	±	188	1782	±	41	2.703	±	0.727
	500	817	±	252	573	±	42	0.737	±	0.179
2-tert-Butilfenol	50	0	±	0	0	±	0	0	±	0
	100	0	±	0	0	±	0	0	±	0
	500	0	±	0	0	±	0	0	±	0
2,4,6-Tribromofenol	50	3463	±	42	0	±	0	0	±	0
	100	3621	±	21	0	±	0	0	±	0
	500	3222	±	302	0	±	0	0	±	0

* Valores medios (n=3) ± DS

Tabla 18.

Crecimiento, área de halo de degradación y relación eficiencia enzimática de Trametes LMB15 en medio de cultivo base (MCB) y medio de cultivo base suplementado (MCBs) con concentraciones de 50, 100 y 500 ppm de ácido gálico, 4-clorofenol, 2,4-dinitrofenol, fenol, β-naftol, 2-nitrofenol, 2-tert-butilfenol y 2,4,6-tribromofenol.

Compuesto	Concentración, ppm	Área crecimiento, mm ² *			Área halo, mm ² *			Relación eficiencia enzimática*		
MCB	0	1197	±	123	0	±	0	0	±	0
	50	60	±	11	0	±	0	0.000	±	0.000
Ácido gálico	100	81	±	31	0	±	0	0.000	±	0.000
	500	133	±	20	0	±	0	0.000	±	0.000
	50	99	±	9	0	±	0	0.000	±	0.000
4-Clorofenol	100	106	±	16	0	±	0	0.000	±	0.000
	500	0	±	0	0	±	0	0.000	±	0.000
	50	370	±	27	0	±	0	0.000	±	0.000
2,4-Dinitrofenol	100	452	±	8	0	±	0	0.000	±	0.000
	500	491	±	16	0	±	0	0.000	±	0.000
	50	0	±	0	0	±	0	0.000	±	0.000
Fenol	100	0	±	0	0	±	0	0.000	±	0.000
	500	167.4	±	4.6	0	±	0	0.000	±	0.000
	50	133	±	20	0	±	0	0.000	±	0.000
β-Naftol	100	137	±	61	0	±	0	0.000	±	0.000
	500	145	±	9	0	±	0	0.000	±	0.000
	50	382	±	69	0	±	0	0.000	±	0.000
2-Nitrofenol	100	181	±	71	0	±	0	0.000	±	0.000
	500	100	±	5	0	±	0	0.000	±	0.000
	50	0	±	0	0	±	0	0.000	±	0.000
2- <i>tert</i> -Butilfenol	100	0	±	0	0	±	0	0.000	±	0.000

2,4,6-Tribromofenol	500	0	±	0	0	±	0	0.000	±	0.000
	50	154	±	22	0	±	0	0.000	±	0.000
	100	133	±	20	0	±	0	0.000	±	0.000
	500	113	±	13	0	±	0	0.000	±	0.000

* Valores medios (n=3) ± DS

Apéndice B

La tabla ANOVA descompone la varianza de transformación fenol en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, es el cociente entre el estimado entre grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de transformación fenol entre un nivel y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 19.

ANOVA de pH para el extracto enzimático con actividad lacasa de Dictyopanus pusillus LMB4

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1182,36	4	295,589	282,21	0,0000
Intra grupos	3	10	104,742		
Total (Corr.)	1192,8	14			

Gl: Grados de libertad

Tabla 20.

ANOVA de temperatura para el extracto enzimático con actividad lacasa de Dictyopanus pusillus LMB4

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
--------	-------------------	----	----------------	---------	---------

Entre grupos	564,559	2	282,28	922,28	0,0000
Intra grupos	1,364	6	0,306067		
Total (Corr.)	566,396	8			

Gl: Grados de libertad

Tabla 21.

ANOVA de agitación para el extracto enzimático con actividad lacasa de Dictyopanus pusillus

LMB4

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	898,751	4	227,688	771,80	0,0000
Intra grupos	29,112	10	0,29112		
Total (Corr.)	901,662	14			

Gl: Grados de libertad

Tabla 22.

ANOVA de concentración de actividad volumétrica ligninolítica para el extracto enzimático con actividad lacasa de Dictyopanus pusillus LMB4

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1435,92	3	478,64	173,11	0,0000
Intra grupos	22,12	8	2,765		
Total (Corr.)	1458,04	11			

Gl: Grados de libertad

Apéndice C

Sé determinó mediante la prueba de múltiples rangos cuales medias de los datos analizados en la transformación de fenol fueron significativamente diferentes de otras. En la **Figura 23** se muestra la diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey, con un nivel de confianza del 95% para el efecto que tiene el pH, temperatura, agitación y concentración de actividad lacasa en la transformación de 100 ppm de fenol a las 96 horas, en condiciones de oscuridad.

Figura 23. Prueba de múltiples rangos (Tukey, HSD) para la transformación de 100 ppm de fenol por **a)** pH, **b)** temperatura, **c)** agitación y **d)** concentración de actividad lacasa a 96 horas, en condiciones de oscuridad.

