UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN

Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia

Tesis Doctoral

"Mecanismos involucrados en la biodecoloración de efluentes con levaduras del género *Trichosporon*"

Lic. Natalia M. Bulacio Gil

2018

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN

Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia

HONORABLE CONSEJO DIRECTIVO

Mag. Adriana Correa Zeballos

Dr. Manuel Javier Aybar

Dra. Viviana Andrea Rapisarda

Bioq. Esp. Ana Verónica Oldano

Dra. Ana Lucrecia Iruzubieta Villagra

Dra. María Antonieta Gordillo

Bioq. Esp. Vanesa Estela Quiroga

Sr. Mario Rodríguez

Sr. Joaquín Hernán Vargas

Srta. Elizabeth Abigail Gutiérrez

Srta. Karen Nahir Ríos

DECANO

Dr. Edgardo Hugo Cutin

VICE-DECANA

Dra. Inés del Carmen Ramos

SECRETARIA DE ASUNTOS ACADEMICOS

Dra. Marta Elena Cecilia

JEFA DEL DEPARTAMENTO POSGRADO

Lic. Marta Quinteros

DEPARTAMENTO DE POSGRADO

AUTORIDADES

DIRECTOR

Dr. Sergio Enrique Pasteris

CONSEJO TITULAR

Dra. Inés del Carmen Ramos

Dra. María Carolina Navarro

Dra. Maria Cristina Gaudioso

Dra. Paula Andrea Vincent

Dra. Maria Cristina Rubio

SUPLENTES

Dra. Maria Graciela Benzal

Dra. Clara del Valle Silvia de Ruiz

Dra. María Inés Nieva Moreno

Dra. Claudia Alejandra Crespo

Dra. María Angélica Véliz

REPRESENTANTE DE POSGRADO

ANTE LA SECRETARÍA DE POSGRADO DE LA UNT

Dra. Paula Andrea Vincent

TRABAJO DE POSGRADO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO ACADÉMICO SUPERIOR DE

DOCTORA EN BIOQUÍMICA

CARRERA DE DOCTORADO EN BIOQUIMICA

Acreditado y Categorizado A ante la

Comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU)

Resolución nº: 732/00

Acreditado y Categorizado A ante la

Comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU)

Resolución n° 489-CONEAU-12

DIRECTOR

Dr. Manuel Javier Aybar

COMITÉ ACADÉMICO

Dra. Aida Ben Altabef

Dra. Gladis Susana Álvarez

Dra. Inés del Carmen Ramos

Dra. Roxana Beatriz Medina

Dr. Raúl Armando Salomón

TRABAJO DE POSGRADO TITULADO:

“Mecanismos involucrados en la biodecoloración de efluentes con levaduras del género *Trichosporon*”

TESISTA

Lic. Natalia María Bulacio Gil

DIRECTOR

Dra. Lucia Inés Castellanos de Figueroa

DIRECTOR ASOCIADO

Dr. Hipólito Fernando Pajot

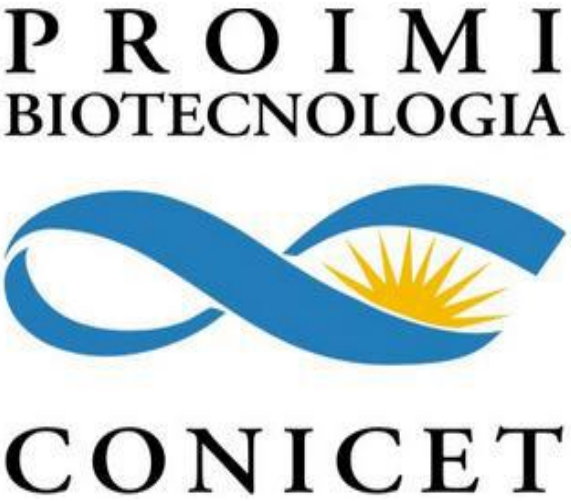
COMISIÓN DE SUPERVISIÓN

Dr. Raúl A. Salomón

Dr. Sergio A. Cuozzo

Este trabajo de Tesis Doctoral se realizó en:

Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos
PROIMI-CONICET



Con el apoyo financiero de:

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

(CONICET)

Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica

(ANPCyT)

Programa de becas BEC.AR

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis, Dra. Lucía Inés Castellanos de Figueroa, por abrirme las puertas de PROIMI y darme un lugar como becaria en su laboratorio. Por darme la posibilidad de realizar este trabajo bajo su dirección.

A mi director asociado, Dr. Hipólito Pajot, por su dedicación y trabajo, sus sugerencias, su responsabilidad y compromiso constante con el desarrollo de esta Tesis. Por su apoyo, su confianza en mi trabajo, su paciencia y por ayudarme a dar siempre lo mejor de mí.

A mi querida compañera y amiga Elisa, por quien conocí a este excelente grupo de trabajo en PROIMI.

A los Dres. Raúl Salomón y Sergio Cuozzo, miembros de la Comisión de Seguimiento, por sus aportes y comentarios durante el desarrollo de este trabajo, por dedicarme su tiempo para la realización de las reuniones.

Al Dr. Justin Powlowski por su generosidad, por recibirme en su grupo de trabajo y por su dirección durante mi estadía en Canadá.

Un agradecimiento a los Investigadores Pablo Fernández, Carlos Nieto y Silvana Viñarta por sus aportes y su buen trato durante mi doctorado.

Al Dr. Daniel Kurt por su ayuda y por su contribución a la realización de este trabajo, la cual fue fundamental para su desarrollo.

A todo el personal de PROIMI, pasantes, becarios, técnicos e investigadores. Mención especial a Turi y Andrea por su afecto y colaboración durante esta etapa y a Argentina por despedirme todos los días con una sonrisa.

Al personal del Departamento de Posgrado de la FBQF-UNT gracias por su ayuda.

AGRADECIMIENTOS

A mi esposo y compañero de vida, Matías. Por su amor, comprensión y paciencia. Por acompañarme, escucharme, reír y llorar durante tantos años. Por apoyarme siempre, especialmente en el difícil último período. Gracias por elegirme.

A mis padres Alejandro y María Ester por su amor, su apoyo, su aliento constante y su compromiso con mi formación desde pequeña.

A mis hermanos Alejandra y Facundo por aguantarme, por su amor y paciencia incondicionales.

A Santino por ser el sobrino más maravilloso que alguien puede tener. Gracias por hacerme feliz, sacarme una sonrisa aún en situaciones de tristeza. Le robaste el corazón a tu "ina".

A mi tía Cris, por su apoyo y cariño incondicional.

A mi familia política por estar siempre presente en cada momento, acompañándome en este trayecto.

A mis compañeros y amigos Eli, Ani, Vicu, Mari, Caro, Ceci, Mili, Ale, Pablo, Cami, Pato, Flor y Maru por estar y compartir cada momento. Por alentarme y sostenerme, por hacer increíbles los días laborales. Por el apoyo a nivel académico y personal. Por ser esas personitas que siempre tienen las palabras justas para cada momento. Gracias por tantos pañuelos prestados. Los quiero.

A mis amigas y confidentes Eli y Anita, por ser amigas incondicionales. Las elegiría una y otra vez para transcurrir la vida.

A mis amigas de la facultad y del colegio, Flor, Lu, Lucre, Ale, Dani, Mari, Ceci, Ani y Bibi. Por estar siempre y darme sus buenas energías en cada paso.

A todas las grandes personas que conocí en mi estadía en Canadá: Felipe. Lore, Sol, Pau, Luciano, Mayra, Pablo, Andrés, Abraham, Patrick, Justin, Logan, quienes me brindaron su amistad y me hicieron sentir en casa estando tan lejos. Una mención especial a Farnaz, una persona maravillosa, fuiste una gran amiga y mi gran contención, ojalá la vida nos cruce de nuevo…

A Dios, por darme la oportunidad de llegar a esta instancia.

Resumen

Las industrias textiles consumen grandes cantidades de agua y generan importantes volúmenes de efluentes líquidos coloreados que pueden alcanzar distintos cuerpos de agua, bloqueando procesos fotosintéticos y produciendo un daño irreparable en el medio ambiente.

Existen métodos físicos/químicos para el tratamiento de efluentes textiles, usualmente son costosos y generan grandes cantidades de lodos y polución secundaria. Como método alternativo la biodecoloración resulta económicamente viable y amigable con el medio ambiente, ya que involucra procesos de biodegradación de los colorantes o bien su acumulación en diversos organismos. Las levaduras son especialmente interesantes por su rápido crecimiento unicelular y su adaptación a crecer en medios líquidos. Su capacidad para remover colorantes está vinculada a la actividad de enzimas ligninolíticas y a mecanismos de formación de radicales hidroxilos altamente reactivos, que por su baja especificidad de sustrato pueden degradar colorantes de diferente naturaleza química. Estos procesos oxidativos de decoloración, tienen además la ventaja de garantizar que no se producirán aminas aromáticas potencialmente carcinogénicas a partir de colorantes textiles.

Trichosporon akiyoshidainum es una levadura basidiomicetácea que demostró ser una herramienta muy importante para la biodegradación de colorantes azoicos aromáticos. En estudios previos se evidenció que la decoloración de Negro Reactivo 5 por esta levadura es un proceso oxidativo que involucra la acción de peroxidasas y fenol oxidasas. Sin embargo, los mecanismos moleculares no han sido completamente elucidados y son objeto de estudio en el presente trabajo.

La secuenciación, anotación y caracterización del genoma de *T. akiyoshidainum*, facilitó el análisis de las vías metabólicas involucradas en la biodecoloración de Negro Reactivo 5 y permitió proponer diversos mecanismos moleculares para su degradación.

Mediante estudios de protéomica comparativa libre de marcado, se identificaron principalmente proteínas extracelulares involucradas en los mecanismos de generación de radicales hidroxilos, entre las que se destacaron enzimas productoras de peróxido de hidrógeno y otras involucradas en la reducción de hierro y homeostasis celular. Muchas de estas proteínas fueron determinadas en mayor abundancia en presencia del colorante

Negro Reactivo 5. En cuanto a las proteínas involucradas en la vía enzimática de degradación, cuyas actividades fueron determinadas en los sobrenadantes de cultivo, solo pudo ser identificada una posible peroxidasa en presencia del colorante Negro Reactivo 5.

Por otro lado, se detectaron proteínas relacionadas a las vías bajas de degradación. Según estos resultados, diversas vías de degradación y metabolismo de xenobióticos fueron activadas.

Con los resultados obtenidos se desarrolló una hipótesis sobre el metabolismo de *T. akiyoshidainum* HP-2023 durante la degradación del colorante Negro Reactivo 5. Sugieren que la degradación del colorante se consigue mediante dos etapas separadas. En primer lugar, las moléculas de colorante son degradadas por peroxidasas o reacciones de tipo Fenton, a compuestos aromáticos de bajo peso molecular. En segundo lugar, estos compuestos aromáticos son catabolizados por diversas vías de degradación de xenobióticos.

La elucidación de los mecanismos moleculares implicados en este proceso de decoloración añade nuevas perspectivas a la comprensión actual de la degradación de los compuestos aromáticos por levaduras y conduce a nuevas estrategias para mejorar la remediación del colorante.

Palabras claves: *Trichosporon akiyoshidauinum*, Biodecoloración, Mecanismos.

Abstract

The textile industry consumes large amounts of water and generate significant volumes of colored liquid effluents that can reach different bodies of water, blocking photosynthetic processes and producing irreparable damage to the environment.

There are physical/chemical methods for the treatment of textile effluents, but they are usually expensive and generate large amounts of sludge and secondary pollution. As an alternative method, biodecolorization is economically viable and friendly to the environment since it involves processes of biodegradation of the dyes or their accumulation in several organisms. Yeasts are especially interesting because of their rapid unicellular growth and their adaptation to growing in liquid media. Its ability to remove dyes is linked to the activity of ligninolytic enzymes and highly reactive hydroxyl radical formation mechanisms, which due to their low specificity of substrate can degrade dyes of different chemical nature. These oxidative discoloration processes also have the advantage of ensuring that potentially carcinogenic aromatic amines will not be produced from textile dyes.

Trichosporon akiyoshidainum is a basidiomycete yeast that has proved to be a promising tool for the biodegradation of aromatic azo dyes. In previous studies it was evidenced that the discoloration of Reactive Black 5 by this yeast is an oxidative process that involves the action of peroxidases and phenol oxidases. However, the molecular mechanisms have not been fully elucidated and are the object of study in the present work.

The sequencing, annotation and characterization of the genome of *T.akiyoshidainum*, simplified the analysis of the metabolic pathways involved in the biodecolorization of Reactive Black 5 and allowed to propose several molecular mechanisms for its degradation.

By means of comparative label-free proteomics studies, extracellular proteins involved in the generation mechanisms of hydroxyl radicals were identified, among which hydrogen peroxide producing enzymes and others involved in the reduction of iron and cellular homeostasis were highlighted. Many of these proteins were determined in greater abundance in the presence of the Reactive Black dye 5. As for the proteins involved in the enzymatic degradation pathway, whose activities were determined in the culture supernatants, only one possible peroxidase could be identified in the presence of the RB5 dye.

On the other hand, proteins related to the low degradation pathways were detected. According to these results, various pathways of degradation and metabolism of xenobiotics were activated.

Finally, the results obtained allowed us to develop a hypothesis about the metabolism of *T. akiyoshidainum* HP-2023 during the degradation of the RB5 dye, and suggest that the degradation of the dye is achieved by two separate stages. First, the dye molecules are degraded, by peroxidases or Fenton-type reactions, to low molecular weight aromatic compounds. Secondly, these aromatic compounds are catabolized by various routes of degradation of xenobiotics.

The elucidation of the molecular mechanisms involved in this discoloration process adds new perspectives to our current understanding of the degradation of aromatic compounds by yeast and could lead to new strategies to improve the remediation of the dye.

Keywords: *Trichosporon akishoyidainum*, Biodecolorization, Mechanisms

INDICE

1. INTRODUCCIÓN GENERAL **1**

1.1. El color en la historia 2

1.2. Colorantes 3

1.2.1. Característica de los colorantes 3

1.2.2 Colorantes industriales 4

1.2.2.1 Colorantes Azoicos 4

Cromóforos de los colorantes azoicos 5

1.3. Contaminación ambiental por efluentes textiles 6

1.4 Efectos nocivos de los colorantes azoicos en la salud 7

1.5. Mecanismos de remoción del color 9

1.5.1. Mecanismos físico-químicos de remoción del color 9

1.5.2. Mecanismos biológicos de remoción del color 12

1.5.2.1. Bioadsorción 12

1.5.2.2. Biodegradación 12

I. Biodegradación enzimática 13

Azo-reductasa 14

DCIP-reductasa 16

Lacasa 17

Lignina peroxidasa 18

Manganeso Peroxidasa 20

Peroxidasa Versátil 21

Dyp Peroxidasa 21

Hemo-tiolato Peroxidasas 23

Citocromo P450 monooxigensasa 25

Oxidasas productoras de peróxido 26

Oxidasas/deshidrogenasas que contienen flavina 26

Copper Radical Oxidases (CRO) 27

II. Biodegradación no-enzimática 28

1.6. *Trichosporon akiyoshidainum* HP-2023 y su capacidad decolorante 31

1.6.1. *Trichosporon akiyoshidainum* HP-2023 31

1.6.2. Remoción de colorantes azoicos textiles por *T. akiyoshidainum* HP-2023 31

1.7. Estudio bioquímico/enzimático de los mecanismos de decoloración 34

Capítulo 1

Comparación de la habilidad decolorante de levaduras del género *Trichosporon* (*Determinaciones enzimáticas. Efecto de inductores*) **38**

1. INTRODUCCIÓN 39

1.1. Decoloración de colorantes azoico por levaduras 39

1.1.2. Mecanismos de decoloración 39

1.1.2.1. Bioadsorción 39

1.1.2.2. Biodegradación 40

1.1.3. Decoloración de colorantes por levaduras del género *Trichosporon* 41

1.1.3.1. Enzimas involucradas en la degradación reductiva de colorantes azoicos por levaduras del género *Trichosporon*. 42

1.1.3.2. Enzimas involucradas en la degradación oxidativa de colorantes azoicos por levaduras del género *Trichosporon*. 42

2. MATERIALES Y MÉTODOS 44

2.1. Microorganismos 44

2.2. Crecimiento y decoloración en diferentes medios de cultivo. Comparación entre *T. akiyoshidainum* HP-2023, *T. chiarellii* MYA-4694 y *Trichosporon porosum* 4029 44

2.2.1. Decoloración 45

2.2.2. Determinación de pH 45

2.2.3. Determinación de Aminas Aromáticas Totales (ATT) 45

2.2.4. Registro de los espectros de absorbancia en la región UV-visible 46

2.2.5. Determinaciones enzimáticas 46

Lacasa 46

Evaluación del efecto de la capacidad antioxidante del medio en la determinación de la actividad enzimática lacasa 46

Fenol oxidasa 46

Manganeso Peroxidasa 47

Azo Reductasa 47

Oxidasas productoras de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 48

2.3. Efecto de diferentes metales e intermediarios redox sobre las actividades enzimáticas y la decoloración de Negro Reactivo 5. 49

2.3.1. Inducción enzimática 49

2.3.2. Efecto de los inductores más efectivos sobre el proceso de decoloración 50

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 51

3.1. Decoloración y crecimiento en NDM_1 y NDM_2 51

Crecimiento 51

Decoloración 51

3.2. Aminas Aromáticas Totales (AAT) 54

3.3. Espectros de absorbancia en la región UV-visible 55

3.3. Actividades enzimáticas 59

Actividades peroxidasa 60

Actividad Fenol Oxidasa 62

Efecto de la capacidad antioxidante del medio en la determinación de la actividad enzimática lacasa 63

Actividad Azo-reductasa 64

Actividad Hierro Reductasa 64

Actividad de oxidasas productoras de peróxido 66

3.4. Efecto de diferentes metales e intermediarios redox sobre la decoloración de Negro Reactivo 5 y actividades enzimáticas 67

Efecto de los inductores y mediadores sobre la Actividad fenol oxidasa 68

Efecto de los inductores y mediadores sobre la Actividad peroxidasa 70

3.5. Efecto de los inductores más efectivos sobre el proceso de decoloración 70

Actividades peroxidasas en los medios inducidos 71

Actividad fenol oxidasa en los medios inducidos 73

4. CONCLUSIONES PARCIALES 74

Capítulo 2

Secuenciación, Anotación y Caracterización del Genoma de *Trichosporon akiyoshidainum* HP-2023 ..... **75**

1. INTRODUCCIÓN 76

1.1. Análisis Genómico 76

1.1.2. Tecnologías de Secuenciación 77

1.1.3. Ensamblaje del genoma 78

1.1.4. Anotación del Genoma 79

2. MATERIALES Y MÉTODOS 83

2.1.1 Extracción del ADN genómico de *T. akiyoshidainum* HP-2023 83

2.1.2. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa 83

2.2. Secuenciación y ensamblaje del ADN genómico de *T. akiyoshidainum* HP-2023 84

2.3. Anotación del genoma de *T. akiyoshidainum* HP-2023 84

2.4. Caracterización funcional del genoma de *T. akiyoshidainum* HP-2023 85

2.4.1. Predicción de las funciones biológicas de las proteínas predichas en base a anotaciones GO 85

2.4.2. Caracterización de los genes y/o familia de genes potencialmente involucrados en la decoloración de colorantes en *T. akiyoshidainum* HP 2023 en base a los resultados de Blast2GO 86

2.4.3. Función biológica de las proteínas predichas: Anotación con BLAST KOALA (*KEEG ANNOTATION*) 87

2.4.4. Identificación de proteínas extracelulares SignalP 4.0 87

2.4.5. Identificación de proteínas activas sobre material lignocelolósico 88

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 89

3.1. Secuenciación, anotación y caracterización del genoma de *T. akiyoshidainum* HP-2023 89

3.2.1. Anotación funcional con Blast2GO 90

3.2.1.1. Análisis cuantitativo de las anotaciones funcionales 91

3.2.1.2. Caracterización de los genes y/o familia de genes potencialmente involucrados en la decoloración de colorantes en *T. akiyoshidainum* HP 2023 94

I. Genes involucrados en las vías altas de degradación 95

Oxidorreductasas involucradas en la oxidación de los enlaces azoicos 95

Genes involucrados en los mecanismos reductivos del enlace azoico y mecanismos no-enzimáticos 97

II. Genes involucrados en las vías bajas de degradación 98

Degradación de xenobiótico y detoxificación celular 98

Proteínas de estrés oxidativo y detoxificación celular 98

3.2.2. Anotación funcional con KEGG 107

3.3. Identificación de proteínas extracelulares SignalP 4.0 110

3.4. Identificación de proteínas activas sobre material lignocelolósico 113

dbCAN 113

MycoCLAP 118

3.5. Resumen del análisis genómico 120

4. CONCLUSIONES PARCIALES 123

Capítulo 3

Estudio Proteómico de la degradación del colorante textil Negro Reactivo 5 por *T. akiyoshidainum* HP-2023 ..... **124**

1. INTRODUCCIÓN 125

1.1. Proteómica 125

1.1.2. “Shotgun Proteomics” 125

1.1.3. Proteómica cuantitativa 126

2. MATERIALES Y MÉTODOS 127

2.1. Microorganismo y medio de cultivo 127

2.2. Obtención de extractos proteicos extracelulares para la determinación del tiempo de muestreo para estudios proteómicos. 127

2.2.1. Electroforesis monodimensional en geles de poliacrilamida: SDS PAGE 128

2.3. Obtención de extractos proteicos extracelulares para el análisis proteómico cuantitativo por espectrometría de masas 128

2.4. Obtención de extractos proteicos intracelulares para el análisis proteómico cuantitativo por espectrometría de masas 129

2.5. Cuantificación de proteínas 129

2.6. Identificación de proteínas por espectrometría de masas. 129

2.6.1. Preparación de los extractos peptídicos para cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (nanoLC-MS/MS) 129

2.6.1.1. Extractos proteicos extracelulares: Digestión de proteínas en solución 129

2.6.1.2. Extractos proteicos intracelulares: Digestión de proteínas en gel 130

2.6.2. Análisis por LC-MS/MS 130

2.6.3. Identificación y cuantificación de proteínas 131

2.7. Categorización funcional de las proteínas 132

2.8. Identificación y análisis de expresión de las proteínas involucradas en la degradación del colorante textil Negro Reactivo 5 132

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 134

3.1. Determinación del tiempo de muestreo para el estudio proteómico 134

3.2. Análisis proteómico de la decoloración de Negro Reactivo 5 por *Trichosporon akiyoshidainum* HP-2023 135

3.2.1. Proteínas identificadas en los extractos extracelulares 135

3.2.2. Proteínas identificadas en los extractos intracelulares 137

3.3. Categorización funcional de las proteínas: análisis de las proteínas expresadas diferencialmente con BlastKOALA y KEEG *Pathway* 138

3.4. Identificación y análisis de expresión de las proteínas involucradas en la degradación del colorante textil Negro Reactivo 5 141

3.4.1. Vías altas de degradación 141

I. Oxidorreductasas involucradas en la oxidación de los enlaces azoicos 141

II. Oxidasas productoras de H_2O_2 142

III. Reducción de hierro y homeostasis celular 143

Sistema reductivo 145

Sistema no reductivo 146

3.4.2. Vías bajas de degradación 147

I. Proteínas involucradas en el catabolismo de los productos de degradación de Negro Reactivo 5 147

II. Proteínas de respuesta a estrés oxidativo y detoxificación celular 150

3.5. Resumen del análisis proteómico 151

4. CONCLUSIONES PARCIALES 153

Capítulo 4

Validación de la hipótesis derivada del estudio proteómico 155

1. Introducción 156

1.2. Degradación no enzimática de compuestos aromáticos 156

2. MATERIALES Y MÉTODOS 158

2.1. Ensayos Biomiméticos: decoloración no enzimática mediada por reacciones Fenton 158

2.2. Identificación de ácidos orgánicos y metabolitos de bajo peso molecular en los sobrenadantes de cultivo por espectrometría de masas 159

3. Resultados y discusión 161

3.1. Ensayos Biomiméticos 161

3.1.1. Decoloración no enzimática mediada por reacciones Fenton 161

3.1.2. Análisis de los espectros de absorción 162

3.2. Identificación de ácidos orgánicos y otros metabolitos de bajo peso molecular por espectrometría de masas 164

3.2.1. Identificación de ácidos orgánicos 164

3.2.2. Identificación de otros metabolitos de bajo peso molecular 166

4. CONCLUSIONES PARCIALES 168

Conclusiones Finales..... **169**

Bibliografía..... **172**

Introducción General

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. El color en la historia

El hombre ha usado colorantes desde tiempos prehistóricos, como lo reflejan el arte rupestre en cuevas encontradas en Europa (*Altamira*, España; *Groto Chauvet*, Francia), África (Zimbabwe), en el antiguo Egipto y China (*Terracotta Army*, Xian). Egipto y China son especialmente importantes porque allí se encontraron los pigmentos sintéticos más antiguos que se conocen, llamados Azul Egipcio (Figura 1), Azul Han y Púrpura Han (Figura 2).



Figura 1. *Pyxis* hecho de "Azul Egipcio": fue producido 750-700 antes de Cristo (Está en el museo Altes de Berlín).



Figura 2. Detalle de un mural de una tumba del este de Han cerca de Luoyang, Henan muestra a un par de jugadores Liubo, que contienen pigmentos de color azul Han y púrpura Han.

Estos pigmentos se utilizaban para elaborar las pinturas que decoraban las obras sagradas (templos, tumbas, sarcófagos), las obras suntuarias (palacios, estatuas, casas, estelas) y numerosos objetos de la vida cotidiana.

Miles de años después, en 1856 el descubrimiento de la mauveína por William Henry Perkins marcó el inicio de la industria moderna de los colorantes sintéticos, la que fue creciendo y adaptándose a las necesidades de la población mundial hasta la actualidad.

Esto muestra claramente que los colorantes tuvieron y aún tienen un profundo impacto antropológico, psicológico, estético, funcional y económico en la sociedad.

1.2. Colorantes

1.2.1. Característica de los colorantes

Desde un punto de vista práctico, un colorante es un compuesto orgánico o inorgánico que, al aplicarse a un sustrato, generalmente una fibra textil pero también a cuero, papel, plástico o alimento, le confiere color de manera estable ante factores físicos o químicos como la luz y agentes oxidantes. Los colorantes, a diferencia de los pigmentos, en general son solubles en el medio en el que se aplican o en el producto final, presentando este último cierta afinidad para absorberlo (Zollinger, 2003).

Desde un punto de vista físico, los colorantes son sustancias que absorben luz en la región visible del espectro (380 a 750 nm) adquiriendo el color complementario del que absorbe, ya que este se resta de la luz reflejada o transmitida. Las sustancias que no absorben luz visible son blancas o incoloras y las que absorben todas las longitudes de onda son negras. (Lafuente *et al*. 1997).

Desde un punto de vista estructural, la presencia de color en una sustancia orgánica está asociada con la presencia de ciertos grupos denominados **cromóforos**. El grupo cromóforo (del griego portador de color) es un grupo funcional como -C=C-,-N=N- (grupo azo) o anillos aromáticos con electrones deslocalizados en orbitales n y/o π que dan origen al color que observamos. El cromóforo es, por si solo, el responsable del color. Los sistemas cromóforos más importantes son:

- Cromóforos etilénicos: Ar-(CH=CH)n-Ar; (n≥4)
- Cromóforos azoicos: -R-N=N-R
- Cromóforos aromáticos: derivados del trifenilmetano: (Ar3CH); derivados de la antraquinona ftalocianinas; derivados heteroaromáticos.

La presencia en la molécula de grupos con pares de electrones no compartidos (NH_2; -OH; $-NO_2$; -COOR, entre otros) modifica el color y la intensidad de la absorción características de un grupo cromóforo. Estos grupos, que por sí mismos no confieren color, reciben el nombre de **auxocromos**. Los grupos auxocromos cuando son donadores de electrones (-OH, -OMe, $-NH_2$, NHR; NR_2) intensifican la absorción de luz y desplazan el máximo del espectro a mayores longitudes de onda (fotones de menor energía), cambiando el color a tonos azulados y verdes. Estos grupos reciben el nombre de batocrómicos. Los grupos que atraen electrones ($-NO_2$; -COOR) desplazan la absorción a longitudes de onda más cortas y el color a tonos amarillos y anaranjados, se llaman hipsocrómicos.

1.2.2 Colorantes industriales

La industria moderna de los colorantes sintéticos se inició a mediados del siglo XIX, cuando Perkins descubrió la mauveína, mientras intentaba sintetizar quinina. En ese entonces, Henrry Perkins, construyó una fábrica cerca de Londres para suministrar el primer colorante sintético al mundo. A finales de la década de 1870, se produjo otro desarrollo importante cuando Otto Witt sintetizó un colorante azoico, que se comercializó como *London Yellow* (Morris & Travis 1992).

Actualmente los colorantes azoicos se encuentran entre los colorantes industriales más importantes y ampliamente usados.

1.2.2.1 Colorantes Azoicos

Los colorantes azoicos son el grupo más grande de colorantes con respecto al número de estructuras y al volumen de producción, constituyendo el 70% de todos los colorantes orgánicos producidos en el mundo (Bafana *et al*., 2011). El éxito de los colorantes azoicos se debe a los procedimientos sintéticos simples involucrados en su producción, su gran diversidad estructural, su alto coeficiente de extinción molar y su estabilidad media/elevada con respecto a la luz y la humedad. Estos colorantes se utilizan en varias aplicaciones industriales, como en la tinción de materiales naturales y sintéticos, en medicina, imprenta, cosméticos, alimentos y pinturas.

Los colorantes azoicos se caracterizan por la presencia de un grupo azo (R-N=N-R') en la molécula que une, al menos, dos anillos aromáticos (Figura 3). El grupo azo tiene 6 electrones "móviles" (deslocalizados) que a su vez están deslocalizados con los

anillos aromáticos adyacentes. Es importante destacar que, todos los compuestos azoicos son coloreados, pero no todos son útiles como colorantes.

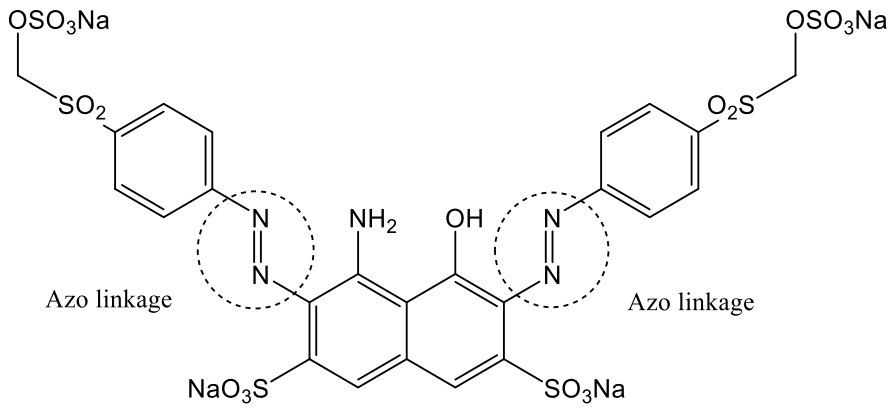
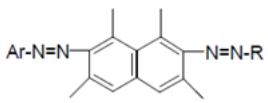
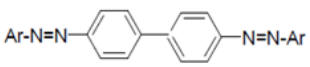


Figura 3. Estructura del colorante azoico Negro Reactivo 5.

Cromóforos de los colorantes azoicos

Los grupos cromóforos, la extensión del sistema conjugado y los grupos auxocrómicos determinan el color de un compuesto. Los cromóforos azoicos de mayor importancia comercial se muestran en la Tabla 1, donde se observa como un aumento en el número de grupos azo desplaza el color a tonos oscuros, verdes, azules y negros.

Tabla 1. Cromóforos azoicos de mayor importancia comercial

Grupo Azo		**Color**
Monoazo	Alquilo-N=N-alquilo	Anaranjado claro
	Alquilo-N=N-arilo	Amarillo
	Arilo-N=N-arilo	Rojo anaranjado
Bisazo		Marrón oscuro Azul Negro
		Amarillo Anaranjado Rojo
Trisazo	Ar-N=N-Ar-N=N-Ar-N=N-Ar (Ar=arilo)	Marrón-azul verdoso

1.3. Contaminación ambiental por efluentes textiles

La industria textil es uno de los mayores consumidores de agua por Kg de material a producir. Debido a la naturaleza del proceso que lleva a cabo contribuye significativamente a la contaminación ambiental.

Las industrias textiles utilizan dos tercios del mercado total de colorantes sintéticos a nivel mundial. Durante el procesamiento en estas plantas, entre el 2 y el 50% del colorante aplicado puede perderse, terminando en las aguas residuales que se liberan finalmente al medio ambiente (Le Marechal *et al*., 2012; McMullan *et al*., 2001).



Figura 4. Piletón de descarga de efluente textil. Planta textil RITEX, La Rioja, Argentina.

Muchos colorantes son visibles en el agua en concentraciones cercanas a 5mg L^{-1} (O'Neill *et al*., 1999). Los efluentes industriales, con concentraciones residuales entre 10 y 200 mg L^{-1} (Pandey *et al*., 2007), resultan muy coloreados y estéticamente desagradables.

Los colorantes están diseñados para ser estables frente a la luz, agentes químicos y condiciones de lavado, por lo tanto, si no son adecuadamente tratados pueden permanecer en el medio ambiente por largos períodos, con el consiguiente riesgo de bioacumularse o biomagnificarse en la cadena trófica (Weisburger, 2002). Como ejemplo, puede citarse el colorante Azul Reactivo 19, cuya vida media es de 46 años, a pH 7 y 25°C (Hao *et al*., 2000).

Los colorantes azoicos también inhiben varios procesos biológicos, que son ecológicamente muy importantes. Por ejemplo, pueden inhibir la fotosíntesis de algas al reducir la penetración de la luz (Stolz, 2001). De manera similar, se ha informado que los

colorantes inhiben la reducción de la DQO (demanda química de oxígeno) y las actividades respiratorias de las poblaciones microbianas. Esto resulta en la inhibición de procesos microbianos, como los involucrados en los ciclos biogeoquímicos naturales (Chung & Stevens, 1993).

La toxicidad de los colorantes sobre organismos acuáticos ha sido muy estudiada. Se encontró que los colorantes azoicos son tóxicos para algas, peces y crustáceos. Sin embargo, su toxicidad aguda es generalmente baja (Clarke & Anliker, 1980). Se ha demostrado también que los colorantes azoicos reducen la viabilidad, reproducción, velocidad de la alimentación por filtración y consumo de oxígeno de cultivos del crustáceo *Moina macrocopa* (Wong *et al*., 2006). Birhanli y Ozmen (2005) revelaron que muchos colorantes azoicos pueden resultar teratogénicos para *Xenopus leais*.

De modo que la contaminación con colorantes textiles no solo afecta la calidad estética y la transparencia del agua, sino también la concentración de oxígeno disuelto en lagos, ríos y otros cuerpos de agua, como así también a los organismos que viven en ellos, lo que conduce al deterioro del medio ambiente (Wijetunga *et al*., 2010).

1.4 Efectos nocivos de los colorantes azoicos en la salud

Los colorantes azoicos son nocivos para la salud humana por a su naturaleza tóxica. Esta toxicidad está determinada por su estructura química. Por ejemplo, colorantes azoicos que tienen un grupo nitro tienen naturaleza mutagénica (Chung & Cerniglia, 1992) y después de la descomposición pueden generar productos tóxicos como 1,4-fenilendiamina, *o*-tolidina, etc. (Rosenkranz & Kolpman, 1990). Los colorantes azoicos sulfonados presentan menor efecto mutagénico que aquellos no sulfonados (Jung *et al*., 1992). Sin embargo, la recalcitrancia de los colorantes azoicos se atribuyó, precisamente, a la presencia de grupos sulfonatos, además de los enlaces azoicos, dos grupos generalmente considerados como xenóforos (que confieren carácter xenobiótico).

El colorante textil comercial azoico Violeta Ácido 7 puede inducir peroxidación lipídica y aberraciones cromosómicas e inhibe a la enzima acetilcolinesterasa impidiendo que se destruya la acetilcolina después de haber cumplido su función. Esto produce un aumento en la concentración y en la duración de los efectos del neurotransmisor. La toxicidad de este colorante aumenta durante el proceso de biodegradación anaeróbica por *Pseudomonas putida* debido a los metabolitos resultantes: ácido 4-aminoacetanilida y 5-acetamido-2-amino-1-hidroxi-3,6-naftaleno disulfónico (Mansour *et al*., 2009). El Rojo

de Metilo también es un colorante mutagénico y su producto de degradación, la N, N-dimetilfenilendiamina (DMPD) es una amina aromática tóxica y mutagénica (Wong & Yu, 1999; Ayed *et al*., 2011). Tsuboy y colaboradores (2007) comprobaron que el colorante azoico Azul Disperso 291 tiene efectos genotóxicos, mutagénicos, citotóxicos y también conduce a la formación de micronúcleos y a la fragmentación de ADN en células de hepatoma humano. Otros colorantes azoicos, como *Sunset Yellow*, *Carmoisine*, *Quinoline Yellow*, *Allura Red*, *Tartrazine* y *Ponceau 4R* también demostraron ser perjudiciales para los niños cuando se usan como aditivos en alimentos y bebidas (Parlamento, Estados Unidos y Unión Europea, 2008). Sin embargo, tanto *Sunset Yellow* (amarillo ocaso o crepúsculo, aditivo alimentario E110 en la UE) como *Tartrazine* (conocida como tartrazina, Amarillo ácido 23 aditivo alimentario E102 en la UE), están permitidos en todo el mundo para su uso en alimentos, cosméticos y medicamentos (Poul *et al*., 2009). Existen colorantes azoicos que inducen cáncer de vejiga en humanos y sarcomas esplénicos, hepatocarcinomas y anomalías nucleares en animales experimentales (Rafii *et al*., 1997; Puvaneswari *et al*., 2006). El Amarillo de metanilo, un tinte azoico, es hepatotóxico en ratas albinas (Singh *et al*., 1987, 1988; Singh & Singh, 2017).

La carcinogenicidad de muchos de los colorantes azoicos se demostró experimentalmente. En un estudio de alimentación subcrónica de 13 semanas, el colorante Negro Directo 38 indujo nódulos neoplásicos hepáticos y carcinomas hepatocelulares en ratas Fischer 344 macho y hembra dentro de las 5 semanas (NCI 1978). Es el período de latencia más corto medido hasta ese momento por el programa de bioensayos del Instituto Nacional del Cáncer (NCI) para el desarrollo de tumores. En el Tercer informe anual sobre carcinógenos en 1983 el Negro Directo 38 se incluyó como "carcinógeno humano razonablemente anticipado". Luego se cambió a "carcinógeno humano conocido" en la edición de 2000 (NTP 2000). Muchos colorantes azoicos también son mutagénicos, según la prueba de Ames en *S. typhimurium*. Cabe destacar que, mientras algunos colorantes, como Azul Directo 15 son directamente mutagénicos, otros requieren una activación metabólica previa para causar tales efectos (Reid *et al*. 1984). Esta activación se da por la descomposición del colorante en condiciones reductivas o parcialmente reductivas, que generar aminas aromáticas cancerígenas.

Debido a los efectos nocivos de los colorantes azoicos en la salud humana y en el medio ambiente, existe la necesidad imperiosa de restringir su entrada al mismo. Esto en

la práctica no es factible, por lo tanto, una solución a este problema es adoptar métodos de tratamiento que reduzcan o eliminen los colorantes de las aguas residuales.

1.5. Mecanismos de remoción del color

Existe una gran variedad de procesos físicos, químicos y biológicos usados, con mayor o menor éxito, en la remoción de colorantes de los efluentes textiles (Forgacs *et al.*, 2004).

Se conocen varios factores que determinan la aplicación de estas técnicas. Entre estos, los más importantes son:

- El tipo de colorante
- La composición del efluente
- La concentración y el costo de los reactivos químicos utilizados
- Los costos operativos (de energía y material)
- La disposición final de los desechos generados

Cada técnica tiene sus limitaciones y por lo general, suele ser necesaria la implementación de más de una para la decoloración completa de un efluente debido a la complejidad y a la naturaleza variable de los efluentes textiles reales.

1.5.1. Mecanismos físico-químicos de remoción del color

Los métodos físicos/químicos son frecuentemente muy costos. Están afectados por otros componentes presentes en los efluentes residuales y crean serios problemas relacionados con la disposición de los lodos resultantes, generando contaminación secundaria. Esto limita su aplicación a una remoción *in situ* de pequeña escala. Cabe destacar que uno de los principales problemas de estos métodos, la toxicidad residual de los colorantes, permanece muchas veces sin resolver (Bafana *et al*., 2011).

Los procesos físico-químicos empleados incluyen adsorción, filtración, coagulación/floculación, electrocoagulación, intercambio iónico, oxidación avanzada (cloración, ozonización, reacciones de Fenton, de Fenton mediada, oxidación fotolítica, etc.) y reducción química. En la Tabla 2, se explican brevemente algunas de estas técnicas, el principio por el cual actúan, la eficacia y también sus desventajas.

Tabla 2. Mecanismo físico-químicos de remoción del color.

Método	Técnica	Principio	Eficiencia	Desventaja	Referencia
Físico	Adsorción	Los contaminantes del efluente son adsorbidos en la superficie de un material poroso o un filtro	Remueve efectivamente los colorantes presentes en el agua, como ser los reactivos, básicos y azoicos	No puede adsorber sólidos en suspensión y colorantes insolubles. Se usa en concentraciones bajas de colorantes. Elevado costo de regeneración. Elevados costos de mantenimiento	Wang *et al*., 2011
	Filtración por membrana	Por presión los colorantes presentes en un efluente son retenidos en una Membrana	Remueve todo tipo de colorantes. Se puede recuperar y reciclar químicos no retenidos y agua	Se obtiene un lodo secundario. Los sólidos solubles no se separan	Zaharia & Suteu, 2012
	Coagulación-floculación	Adición de un coagulante que se asocia al contaminante	Elimina colorantes insolubles	Elevado costo para tratar el lodo secundario	Adinew, 2012
	Electro-coagulación	Se basa en las variaciones de densidad de corriente, pH y tiempo de residencia	Amplio rango de contaminantes, incluyendo sólidos suspendidos, metales pesados, colorantes, materia orgánica, grasas, aceites, iones y radionúclidos	Elevado costo para tratar el lodo secundario, sumado a un alto costo de electrodos y energía	Garay & Gomez, 2016
	Intercambio iónico	Utiliza resinas de intercambio iónico sintéticas o naturales para la adsorción de colorantes	Elimina los colorantes azoicos y las aminas aromáticas en un amplio rango de pH	Los intercambiadores de iones no pueden emplearse para una amplia gama de colorantes. Elevado costo involucrado	Akceylan *et al*., 2009; Royer *et al*., 2010
	Ultrasonido	Cuando las soluciones acuosas se exponen a ultrasonido, se forman cavidades transitorias por compresión y rarefacción del agua a granel. El colapso de las cavidades produce picos locales de alta presión y temperatura, que pueden dividir el agua en radicales hidroxilo y átomos de hidrógeno	Compuestos refractarios que no pueden ser tratados por métodos biológicos	Ineficiencia energética de la cavitación que necesita de grandes cantidades de energía a la entrada del sistema	Gonzalez-Labrada *et al*., 2010

Método	Técnica	Principio	Eficiencia	Desventaja	Referencia
Químico	Irradiación	Utiliza haz de electrones de alta energía en una solución supersaturada con O2.	Oxidación efectiva en laboratorio	Requiere mucho O_2 disuelto	Hosono *et al.*, 1993 Hao *et al.*, 2000
	Oxidaciones de Fenton	El proceso se basa en la formación de especies reactivas oxidantes capaces de degradar eficientemente los contaminantes del efluente	Decolora un amplio rango de colorantes y produce una disminución marcada de la DQO	Producción de lodos secundarios. Requiere valores de pH bajos	Adinew, 2012
	Ozonización	Ataca al contaminante mediante dos procesos: 1) ozonización directa por la molécula de O_3 y 2) ozonización radical por los radicales oxidativos libres	Ozonización no produce lodos secundarios	Corto tiempo de vida (20 min)	Neamtu *et al.*, 2004
	Procesos de Oxidación avanzados	Se basa en la generación de especies oxidantes altamente reactivas con habilidad para atacar y degradar sustancias orgánicas	Altas velocidades de reacción. Reduce potencialmente la toxicidad y puede producir una mineralización total. No genera lodos	Elevado costo. Depende del compuesto a tratar	Sharma *et al.*, 2011
	Destrucción electro-química	Se basa en la adición de agentes oxidantes para estimular la degradación	Los productos obtenidos no son tóxicos	Elevado costo	Muthukumar *et al.*, 2005
	Hipoclorito de sodio	Este método ataca al grupo amino de los colorantes e inicia y acelera la escisión del enlace azo.	Efectivo para la degradación de colorantes azoicos	El uso de cloro para la eliminación de colorantes se está volviendo menos frecuente debido a sus efectos negativos sobre la liberación en vías fluviales y la liberación de aminas aromáticas toxicas y cancerígenas	Oliveira *et al.*, 2007; Li *et al*., 2009
	Tratamiento fotoquímico	Este método utiliza la luz UV para activar químicos como el H_2O_2, lo que resulta en la producción de radicales hidroxilos que degradan las moléculas de colorante a CO_2 y H_2O.	Se puede utilizar para degradar moléculas orgánicas en CO2 y agua, ya sea en lote o en un sistema continuo con cortos tiempos de exposición. No se generan lodos	Las desventajas de este método incluyen la formación potencial de subproductos, que pueden ser más tóxicos y una pobre eliminación de color para algunos colorantes	Bafana *et al*., 2011; Cortazar-Martinez *et al*., 2012

1.5.2. Mecanismos biológicos de remoción del color

A pesar de la existencia de procesos físicos o químicos para la remoción de colorantes, la biorremediación es una técnica atractiva, tanto por su bajo costo, como por ser un proceso eco-amigable y socialmente aceptado (McMullan *et al*., 2001).

La biodecoloración de colorantes puede llevarse a cabo de dos maneras diferentes; adsorción del colorante a la biomasa microbiana, o bien biodegradación de los colorantes por las células (Khan *et al*., 2013).

1.5.2.1. Bioadsorción

La bioadsorción de colorantes empleando biomasa, es un proceso que ocurre por intercambio iónico (Robinson *et al*., 2001; Srinivasan & Viraraghavan, 2010). La adsorción de colorantes puede ocurrir en células microbianas vivas o muertas. Se han reportado procesos de bioadsorción de colorantes sobre bacterias, microalgas, levaduras y hongos filamentosos, donde los grupos funcionales, como hidroxilos y carboxilos de los polisacáridos, lípidos y proteínas constituyentes de la pared celular proporciona sitios de unión a los colorantes. El uso de este método de decoloración tiene sus ventajas, especialmente si los efluentes coloreados son muy tóxicos y no son favorables para el crecimiento y mantenimiento de una población microbiana. Sin embargo, se debe destacar que en estos procesos la estructura original del colorante permanece intacta, por lo que la bioadsorción no erradica el problema de la potencial toxicidad, ya que el contaminante queda intacto, pero atrapado en la matriz del adsorbente (la biomasa microbiana). La bioadsorción puede no ser un enfoque práctico para tratar grandes volúmenes de efluentes industriales contaminados con colorantes, por el problema asociado con la eliminación de biomasa después de la bioadsorción (Kuhad *et al*., 2004, Chander & Arora, 2007).

1.5.2.2. Biodegradación

A diferencia de lo que ocurre en la bioadsorción, en la biodegradación, la estructura original del colorante se destruye. El compuesto se divide en fragmentos por acción directa o indirecta de las células microbianas. Esto conduce en algunos casos a una completa mineralización del colorante, es decir, la conversión del compuesto xenobiótico en CO_2, biomasa y compuestos inorgánicos.

Los microorganismos pueden llevar a cabo una degradación enzimática o no enzimática de los colorantes. En el primer caso, las enzimas actúan directamente o indirectamente a través de mediadores redox sobre las moléculas de colorantes mediante reacciones oxidativas o reductivas. En el segundo caso radicales hidroxilos, especies químicas altamente reactivas, generados por una reacción puramente química, atacan las moléculas de colorantes. Las enzimas producidas por los microorganismos aportan los sustratos necesarios para el desarrollo de estas reacciones químicas de tipo Fenton, productoras de radicales.

Aunque en ambos procesos intervienen enzimas microbianas, la utilización de microorganismos completos presenta ciertas ventajas frente al uso de enzimas purificadas. Entre estas ventajas se encuentran la disminución de costos (al no tener que purificar las enzimas), la mayor estabilidad de las enzimas involucradas y la posibilidad de emplear vías enzimáticas de difícil reconstrucción con enzimas purificadas (Pearce *et al*., 2003).

I. Biodegradación enzimática

Los microorganismos más ampliamente estudiados en biodecoloración enzimática de colorantes son los hongos de pudrición blanca (*White Rot Fungi*) como *Phanerochaete chrysosporium*, que se caracterizan por su capacidad para degradar la lignina (Khan *et al*., 2013). Además de su sustrato natural, los hongos de la pudrición blanca mineralizan una amplia gama de contaminantes orgánicos persistentes, como los colorantes azoicos. Esto se debe a la naturaleza relativamente inespecífica de sus enzimas ligninolíticas: lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP), peroxidasa versátil (VP) y lacasa (Guo *et al*., 2018).

Las enzimas ligninolíticas degradan colorantes azoicos directa o indirectamente a través de ciertos mediadores redox. Se demostró que la acción de estas enzimas sobre los colorantes azoicos cataliza la ruptura oxidativa de los enlaces azoicos y la apertura del anillo aromático (Svobodová *et al*. 2007).

El estudio de bacterias que actúan en procesos de decoloración data de los años 70. *Bacillus subtilis* fue la primer bacteria reportada en esta temática por Horitsu y colaboradores (1977). En comparación con la decoloración por hongos filamentosos (mayormente aerobios estrictos), la biodecoloración por bacterias es más rápida (Kalyani *et al*., 2009) y puede llevarse a cabo tanto por bacterias anaeróbicas, como por anaeróbicas

facultativas o aeróbicas. El mecanismo de degradación bacteriana de colorantes azoicos es generalmente reductivo e implica la reducción del enlace -N=N- por enzimas del tipo azo-reductasas o reductasas inespecíficas como NADH-DCIP reductasas. Estos procesos en condiciones anaeróbicas forman aminas aromáticas, con la consiguiente problemática que eso significa (Van der Zee & Villaverde, 2005).

En los últimos años el uso de algas en decoloración de efluentes tomó relativa importancia. Omar (2008), sugirió que las algas son capaces de degradar los colorantes a través de una azo-reductasa inducida. Sin embargo, hasta ahora solo se reportó la decoloración de un número muy limitado de colorantes (Khataee & Dehghan, 2011).

Si bien las enzimas ligninolíticas y las azo-reductasas son las más estudiadas, existen otras enzimas potencialmente involucradas en procesos de decoloración, como, DCIP-reductasas, DyP peroxidasas, citocromos P450 y proteínas de la familia de hemo-tiolato peroxidasas.

Es importante destacar que, ya sea en mecanismos mediados por peroxidasas ligninolíticas o en procesos de oxidación mediados por radicales hidroxilos, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) necesario es producido por oxidasas extracelulares que juegan un rol fundamental durante el tratamiento de colorantes.

A continuación, se describen las características más importantes y algunos de los mecanismos de acción descriptos para estas enzimas.

Azo-reductasa

Estas enzimas catalizan la ruptura del enlace azoico (-N=N-) por reducción, produciendo aminas aromáticas incoloras y potencialmente tóxicas (Pandey *et al*., 2007; Chang *et al*., 2001).

Son el principal grupo de enzimas expresadas en bacterias para la decoloración de colorantes azoicos (Joshi *et al*., 2018). Se localizan generalmente en el citoplasma bacteriano (Maier *et al*., 200). También se ha reportado que levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* presentan azo-reductasas asociadas a un sistema redox de la membrana plasmática, cuyo componente principal es una proteína hierro reductasa (Ramalho *et al*., 2004).

Según su mecanismo de acción las azo-reductasas se categorizan como azo-reductasas dependientes (Nakanishi *et al*., 2001; Chen *et al*., 2004; Chen *et al*., 2005) o independientes de flavina (Blümel *et al*., 2002; Blümel & Stolz, 2003). Las dependientes

de flavina se agrupan en tres categorías según la naturaleza de los dadores de electrones, los que proporcionan el poder reductor para la reducción de los colorantes azoicos: las enzimas que usan únicamente NADH como cofactor (Nakanishi *et al*., 2001; Chen *et al*., 2004), las que emplean solo NADPH (Chen *et al*., 2005) y las que usan ambos cofactores (Ghosh *et al*., 1992; Wang *et al*., 2007).

Estas enzimas con actividad azo-reductasa han sido identificadas y caracterizadas a partir de un gran número de bacterias, como *Xenophilus azovorans* KF46F, *Pigmentiphaga kullae* K24, *Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Bacillus sp*. OY1-2 y *Rhodobacter sphaeroides* (Nakanishi *et al*., 2001; Suzuki *et al.*, 2001; Blümel *et al*., 2002; Blümel & Stolz, 2003; Bin *et al*., 2004; Chen *et al*., 2004; Chen *et al*., 2005). Sin embargo, la participación de azo-reductasas intracelulares en la decoloración bacteriana se ha puesto en duda en los últimos años, ya que, debido a la elevada polaridad y elevado peso molecular de la mayoría de los colorantes azoicos, estos no pueden pasar a través de las membranas celulares al ambiente intracelular del microorganismo. Por lo tanto, la reducción del colorante no dependería de su captación intracelular (Robinson *et al*., 2001).

Stolz (2001) demostró que la adición de mediadores redox a los cultivos bacterianos estrictamente anaeróbicos con supuesta actividad azo-reductasa intracelular, produce un aumento considerable de la velocidad de degradación de los colorantes. Diversos autores revelaron que compuestos de bajo peso molecular (por ejemplo, flavinas y quinonas) pueden actuar como transportadores de electrones entre el colorante azoico y las azo-reductasas que se encuentra en la membrana plasmática de las bacterias (Gingell & Walker, 1971; Kudlich *et al*., 1997; Liu *et al*., 2009). Sin embargo, si el ambiente extracelular es aeróbico, el oxígeno evita la reducción del colorante azoico debido a la oxidación preferencial por el oxígeno del mediador redox reducido.

Kudlich y colaboradores (1997) sugirieron que la actividad de la azo-reductasa unida a la membrana que interactúa con los mediadores redox extracelulares, es diferente de la azo-reductasa citoplásmica soluble. Esta última sólo es responsable de la reducción de los colorantes azoicos no sulfonados que sí pueden penetrar la membrana celular. Por esa razón, las azo-reductasas unidas a la membrana y las citoplasmáticas son dos sistemas enzimáticos separados.

La Figura 5 muestra el mecanismo propuesto para la reducción dependiente de mediadores redox de los colorantes azoicos utilizando células bacterianas completas, en condiciones anaeróbicas.

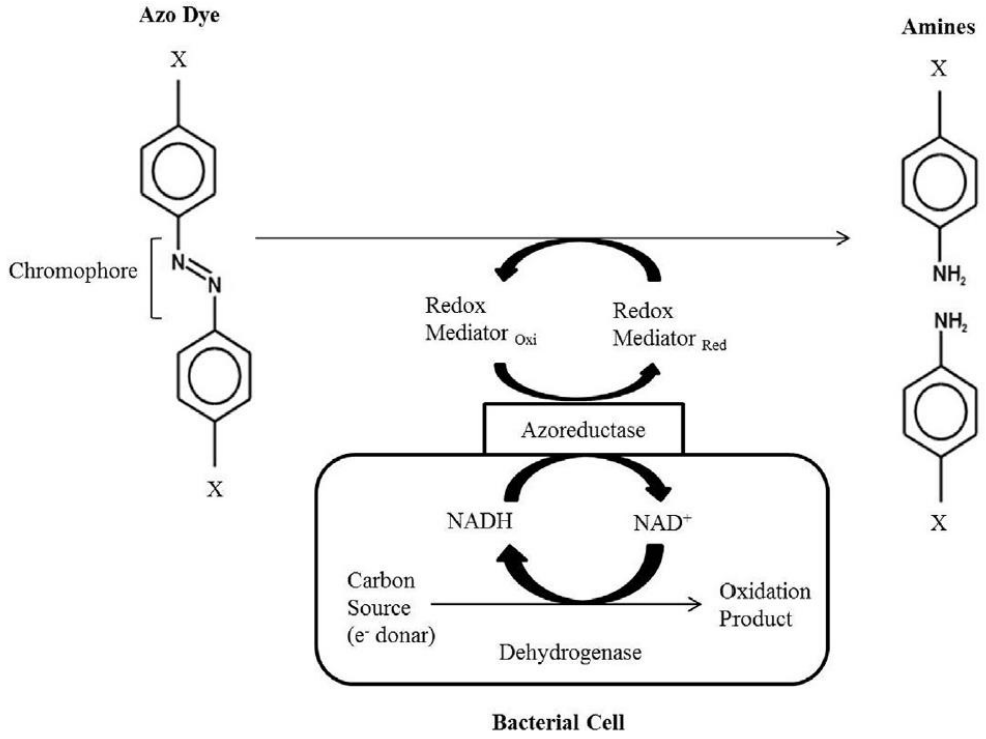


Figura 5. Mecanismo propuesto para la reducción de colorantes azoicos por azo-reductasas (Keck *et al*., 1997).

DCIP-reductasa

Las DCIP-reductasas (dicloroindofenol reductasas), también llamadas reductasas no específicas, son responsables de la reducción de los enlaces azoicos y la detoxificación de compuestos xenobióticos en bacterias y hongos, usan NADH como donante de electrones (Vipin *et al*., 2017; Salokhe & Govindwar, 1999).

La significativa inducción de reductasas no específicas, como la NADH-DCIP reductasa durante la decoloración de los colorantes azoicos sugiere su posible participación en la decoloración (Kalyani *et al*., 2008; Telke *et al*., 2008; Chen *et al*., 2015). Sin embargo, la identidad y la función de estas enzimas aún no está totalmente establecida.

Lacasa

Las lacasas son glicoproteínas pertenecientes a la familia de las multicobre oxidasas, que catalizan la oxidación de compuestos aromáticos (particularmente fenoles) con la reducción de oxígeno a agua (Majcherczyk *et al*., 1998). Estas oxidorreductasas tienen una amplia especificidad de sustrato, utilizan oxígeno como aceptador de electrones y no necesitan otros cofactores (Telke *et al*., 2011; Kalyani *et al*., 2012). Por su aparente estabilidad y resistencia a la inhibición estas enzimas son atractivas para aplicaciones en biotecnología industrial y en procesos de biorremediación.

La Figura 6 presenta un modelo del mecanismo de acción de lacasas sobre colorantes azoicos. Según este modelo, la enzima oxida el grupo fenólico del colorante formando un radical fenoxi, que luego es oxidado para dar un anión carbonio. Luego, un ataque nucleofílico por agua en el anillo aromático produce la ruptura del enlace azoico, con lo que se obtiene una quinona y un fenildiazeno (Zille *et al*., 2005). Es importante destacar que el mecanismo de decoloración mediado por lacasas evita la formación de aminas aromáticas (Kalme *et al*., 2009).

La mayoría de las lacasas conocidas tienen origen fúngico (principalmente de hongos de pudrición blanca). También se identificaron y aislaron un pequeño número de lacasas de bacterias (Gianfreda *et al*., 1999; Claus, 2003; Sondhi *et al*., 2014; Rezaei *et al.*, 2017). Estas enzimas fueron utilizadas en el tratamiento de efluentes de industrias papeleras, textiles, curtiembres y otros efluentes que contienen ligninas o residuos fenólicos. La toxicidad de estos es reducida por degradación, polimerización o por reacción con compuestos fenólicos naturales (Abadulla *et al*., 2000; Chauhan *et al*., 2017; Javed *et al*., 2017).

Compuestos de bajo peso molecular como el ácido 3-hidroxiantranílico (3-HAA, primer mediador natural descripto para la lacasa) y el ácido 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS, mediador sintético), actúan como mediadores redox en las etapas de transferencia de electrones de lacasas (Wong & Yu, 1999). Se reportó que en presencia de mediadores redox, los procesos de decoloración de colorantes azoicos son significativamente más eficiente (Reyes *et al*., 1999; Abadulla *et al*., 2000; Soares *et al*., 2001).

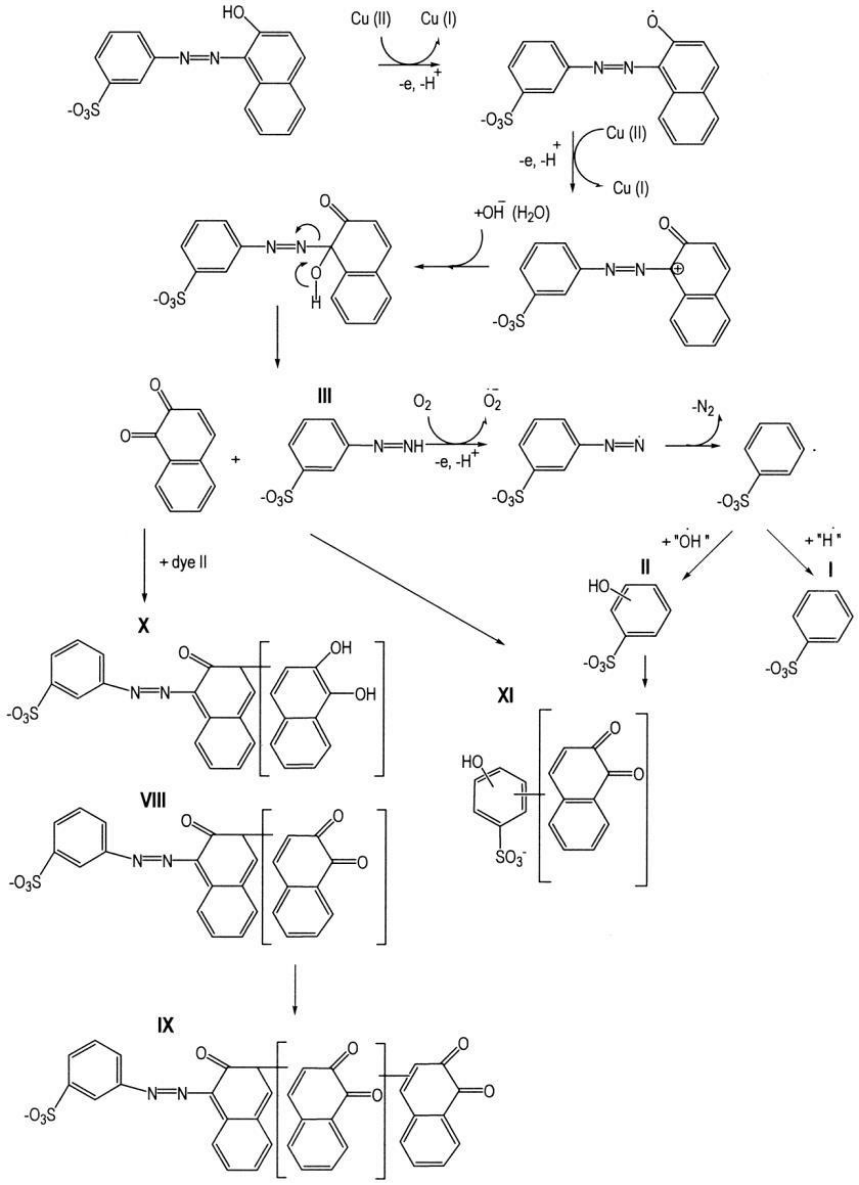


Figura 6. Mecanismo propuesto para degradación del colorante Ácido 3-(2-hidroxi-1-naftilazo) bencenosulfónico por lacasas de *T. villosa* (Zille *et al*., 2005).

Lignina peroxidasa

Son glicoproteínas que contienen un grupo prostético hemo hierro protoporfirina IX. Tienen un peso molecular promedio de 44 KDa y son secretadas en varias isoformas.

También conocida como ligninasa, la lignina peroxidasa (LiP) fue descripta por primera vez en 1984, en cultivos de *Phanerochaete chrysosporium* (Tien *et al*., 1987). Es una enzima extracelular que cataliza la oxidación de compuestos aromáticos fenólicos y no-fenólicos.

La LiP es inicialmente oxidada por H_2O_2. En este estado oxida núcleos aromáticos, tanto fenólicos como no fenólicos, generando radicales catiónicos que reaccionan con sustancias nucleofílicas (principalmente H_2O) y oxígeno molecular. Como resultado, se rompen enlaces C-C y C-O que causan la apertura de los anillos aromáticos (Figura 7). Debido a su mecanismo enzimático, el exceso de H_2O_2 causa la inactivación permanente de la enzima, a menos que haya un compuesto reductor (como el alcohol veratrílico u otros sustratos) en el medio de reacción.

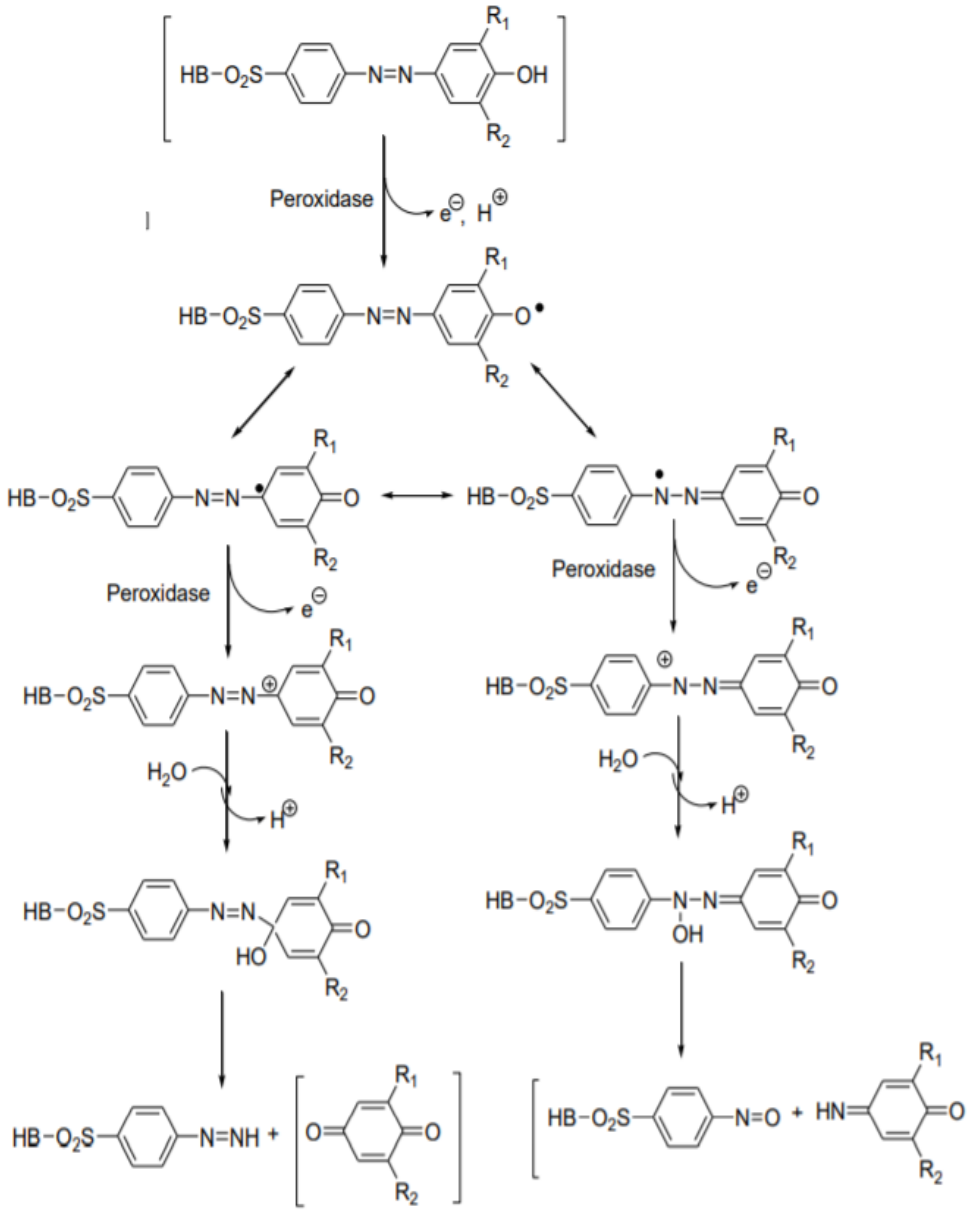


Figura 7. Mecanismo propuesto para ruptura simétrica o asimétrica de colorantes azoicos sulfonados por peroxidasas (LiP) (Chacko & Subramaniam, *et al.*, 2011).

La LiP participa en la mineralización de diferentes compuestos aromáticos recalcitrantes como bifenilos policlorados y colorantes entre los que se encuentran: Azul rápido Ranocid, Rojo ácido 119, Negro rápido Navidol MSRL y Azul brillante Proción HGR (Gottlieb *et al*., 2003; Krčmář & Ulrich, 1998; Husain 2006, 2010). La presencia de residuos ligninocelulósicos en los medios de cultivo aumenta la decoloración, al inducir la síntesis de la enzima y aportar productos de degradación que pueden actuar como intermediarios redox (Jadhav *et al*., 2009).

Sobre los colorantes azoicos realiza una oxidación de grupos fenólicos produciendo un radical en el carbono más cercano al enlace azoico. El carbono fenólico es atacado por una molécula de agua, produciendo un fenildiazeno que es rápidamente oxidado para liberar nitrógeno.

Manganeso Peroxidasa

La MnP es la enzima ligninolítica más frecuente entre los hongos ligninolíticos, aunque solo fue descripta en algunas levaduras. Igual que la LiP es una glicoproteína que contiene un grupo prostético hemo protoporfirina IX, presente en múltiples isoformas. Su peso molecular varía entre 32 y 63 KDa (Wasenberg *et al*., 2003).

El ciclo catalítico de MnP comienza con la oxidación de Mn^{2+} a Mn^{3+} por H_2O_2 (Gold *et al*., 2000). El Mn^{3+} es estabilizado por quelación con ácidos orgánicos como oxálico, malónico o láctico, los que son producidos y secretados por numerosos hongos en condiciones naturales. Así el complejo Mn^{3+}-ácido orgánico actúa como el oxidante y ataca inespecíficamente una variedad de sustratos mediante la captación de un electrón (Schlosser & Hofer, 2002). De esta manera, la enzima MnP oxida su sustrato natural, lignina, pero también otros compuestos entre los que se encuentran los colorantes. El ataque de la MnP a los colorantes azoicos, no solo se limita al doble enlace -N=N-, sino que también puede producir la ruptura de la molécula de colorante en otros sectores. La actividad decolorante por MnP fue detallada originalmente en *P. chrysosporium* (Chagas & Durrant, 2001) y *Lentinula edodes* (Grabski *et al*., 1998). Actualmente se describió su participación en procesos de decoloración mediados por diferentes hongos, principalmente basidiomicetes.

Peroxidasa Versátil

Las peroxidasas versátiles (VP) constituyen el tercer grupo de hemo-peroxidasas ligninolíticas de alto potencial redox más abundante en hongos. Por su actividad sobre colorantes azoicos también son conocidas como Negro Reactivo 5:H_2O_2 oxidorreductasas).

Camarero y colaboradores (1999) descubrieron una VP de *Pleurotus eryngii* que presenta dos sitios activos, uno de ellos característico de MnP y el otro similar a los de LiP. Se describe a esta enzima como un híbrido entre la lignina peroxidasa y la manganeso peroxidasa, que puede oxidar Mn^{2+} a Mn^{3+} (como MnP) y en ausencia de Mn^{+2}, puede también oxidar alcohol veratrílico y un amplio espectro de compuestos aromáticos fenólicos y no fenólicos, comúnmente asociados a la actividad de lignina peroxidasas.

Dyp Peroxidasa

Hace más de 15 años se describió la primer peroxidasa decolorante (DyP) como una enzima extracelular de un hongo basidiomicete (Kim *et al*., 1999; Sugano *et al*., 1999). Posteriormente se descubrieron DyP en numerosos hongos, bacterias, e incluso en arqueas. Sin embargo, su función fisiológica no está muy clara (Colpa *et al*., 2014). La habilidad de las DyPs para oxidar y decolorar parcialmente algunos colorantes industrialmente importantes es la característica que le dio el nombre (Linde *et al*., 2015).

Las DyP forman parte de una nueva familia de hemo-peroxidasas que se caracterizan por ser enzimas bifuncionales. Presentan no solo actividad oxidativa sino también actividad hidrolítica. Estas enzimas son capaces de oxidar varios compuestos orgánicos, algunos de los cuales son escasamente transformados por peroxidasas clásicas, incluyendo colorantes antraquinónicos, β-caroteno y sulfuros aromáticos (Colpa *et al*., 2014).

El ciclo catalítico de las hemo peroxidasas clásicas procede de la siguiente manera:

(1) Peroxidasa en reposo + H_2O_2 ⟶ Compuesto I + H_2O

(2) Compuesto I + AH2 ⟶ Compuesto II + AH*

(3) Compuesto II + AH2 ⟶ Peroxidasa en reposo + AH* + H_2O

La reacción global es:

(4) $\mathbf{2\ AH_2 + H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + 2\ AH^*}$

El compuesto AH* resultante se convierte en diversos productos mediante reacciones no enzimáticas (por ejemplo, reacciones de acoplamiento de radicales).

Las enzimas que catalizan la reacción (4) se definen como peroxidasas, incluso si el ciclo catalítico o los intermedios obtenidos difieren de los observados en el ciclo estándar de las hemo peroxidasas clásicas.

En el caso particular de las DyP, la enzima en estado de reposo y en presencia de un equivalente de H_2O_2 es similar a una peroxidasa clásica en estado de reposo y al compuesto I, respectivamente. Esto sugiere que el estado de reacción primario (1) es similar al de las peroxidasas clásicas. Sin embargo, las DyP no alcanzan un estado típico similar al compuesto II. De todos modos, cumple con la reacción global que define a una peroxidasa (es decir, 2AH2 + H_2O_2 ---------- 2 H_2O + 2 AH*).

Esta característica explica la función única de las DyP, donde el compuesto I y una molécula de H_2O forman un complejo (llamado, Wet-I). Durante la degradación de colorantes antraquinónicos mediada por DyP, la molécula de H_2O ataca al carbonilo de la molécula de antraquinona antes de ser liberada del intermedio Wet-I. Por este motivo es probable que la molécula de agua esté involucrada en el proceso de hidrólisis. Por lo tanto, una DyP realiza simultáneamente las actividades de peroxidasa e hidrolasa. En la Figura 8 se muestra un potencial ciclo catalítico de DyP sugerido para colorantes antraquinonicos (Sugano, 2009).

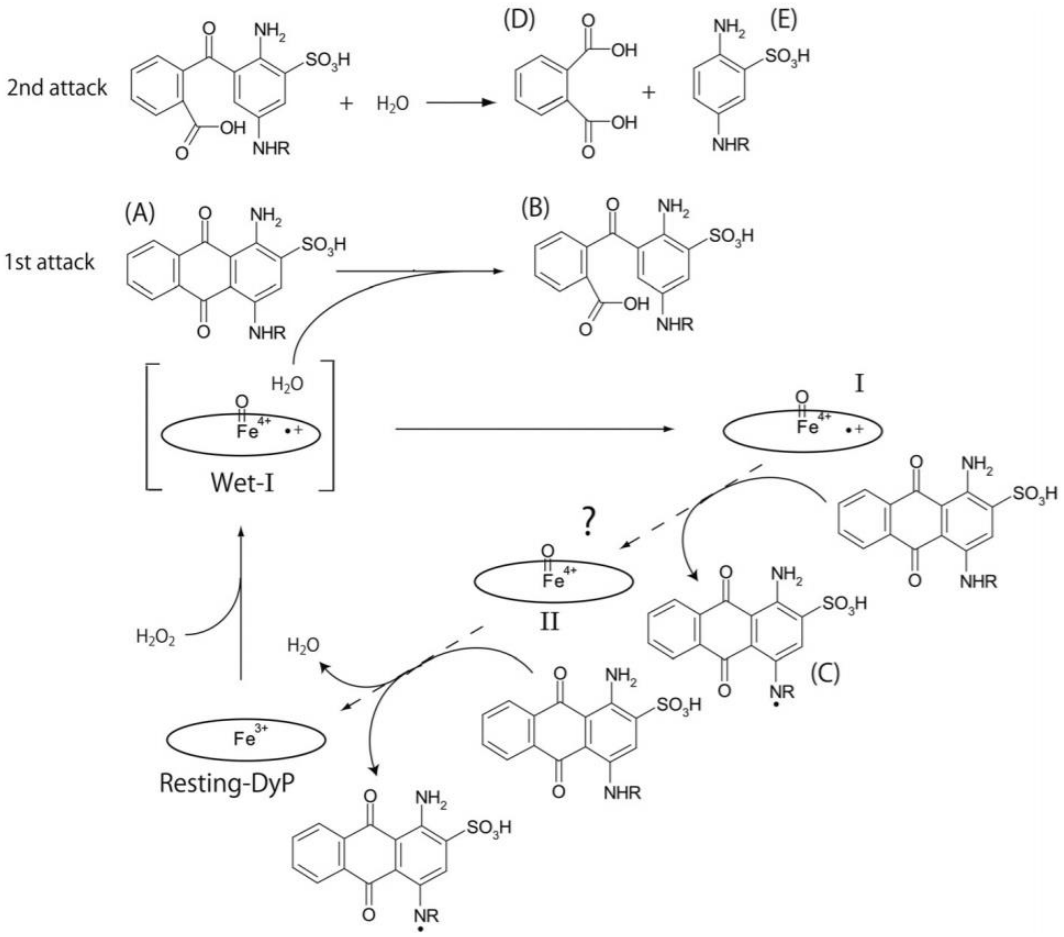


Figura 8. Ciclo catalítico propuesto para DyP con un compuesto atraquinónico modelo (Sugano, 2009).

Hemo-tiolato Peroxidasas

Las hemo-tiolato peroxidasas (HTP) se dividen en enzimas extracelulares, como las cloroperoxidasas (CPO, EC 1.11.1.10) y peroxigenasas aromáticas, actualmente conocidas también como peroxigenasas inespecíficas (APO, EC 1.11.x y UPO EC 1.11.2.1), las cuales fueron descriptas tanto en hongos ascomicetes como en basidiomicetes, y enzimas intracelulares como los citocromos P450 ampliamente descriptos en todos los dominios y que trataremos un inciso aparte.

Las CPOs y UPOs tienen amplia especificidad de sustrato, catalizan reacciones de halogenación y comparten propiedades catalíticas con peroxidasas, catalasas y citocromo P450 monooxigenasas. Además, las UPOs tienen actividad peroxigenasa, siendo capaces de catalizar la transferencia de oxígeno desde peróxidos a diversos sustratos orgánicos

(Hofrichter *et al*., 2010). Estas propiedades hacen a estas enzimas muy interesantes desde un punto de vista biotecnológico.

Los genes de HTP están representados en la mayoría de los genomas de hongos secuenciados hasta la actualidad. A pesar de la amplia presencia genómica y la relevancia biotecnológica de las reacciones de mono (per) oxigenación que han dado como resultado patentes recientes sobre secuencias UPO (Landvick *et al*., 2016a; Landvick *et al*. 2016b), solo unas pocas UPO se purificaron y caracterizaron hasta el presente. Los aspectos centrales del mecanismo catalítico de la UPO se describieron recientemente (Wang *et al*., 2015).

A diferencia de las peroxidasas ligninolíticas (y otras), las UPO utilizan un glutamato como catalizador ácido-base para la activación con peróxido y comparten con los citocromos P450 monooxigenasas una cisteína proximal que actúa como ligando de hierro del grupo hemo, como también la química de reacción. Esto da como resultado reacciones de oxigenación y oxidación altamente versátiles, que se pueden clasificar de la siguiente manera: a) oxidaciones de dos electrones con transferencia de oxígeno (O); b) oxidaciones de dos electrones con transferencia de O y escisión subsiguiente del enlace; c) oxidaciones de dos electrones con transferencia de O a heteroátomos (N o S); y d) oxidaciones de un electrón, como hacen las peroxidasas típicas (Figura 9A) (Hofrichter *et al*., 2015). El ciclo catalítico de estas enzimas difiere del de otras peroxidasas en dos aspectos fundamentales. El primero es la abstracción casi simultánea de los dos electrones del sustrato, y el segundo está asociado a la transferencia del átomo de oxígeno del complejo de hierro (actividad de monooxigenación). Sin embargo, en comparación con los citocromos P450 que necesitan un socio donador de electrones (proteína o dominio que contiene flavina) y una fuente de poder reductor, las UPO pueden considerarse monooxigenasas "autosuficientes" que solo requieren una fuente de H_2O_2 para activarse (Figura 9B). Las UPO son enzimas secretadas y, por lo tanto, *per se* más estables que los citocromos P450 y otras monooxigenasas, que generalmente son proteínas unidas a la membrana intracelular o proteínas citosólicas. Desafortunadamente, las UPO exhiben cierta actividad catalasa junto con una marcada inestabilidad oxidativa frente a elevadas concentraciones de H_2O_2, lo que limita su aplicación (Karich *et al*., 2016).

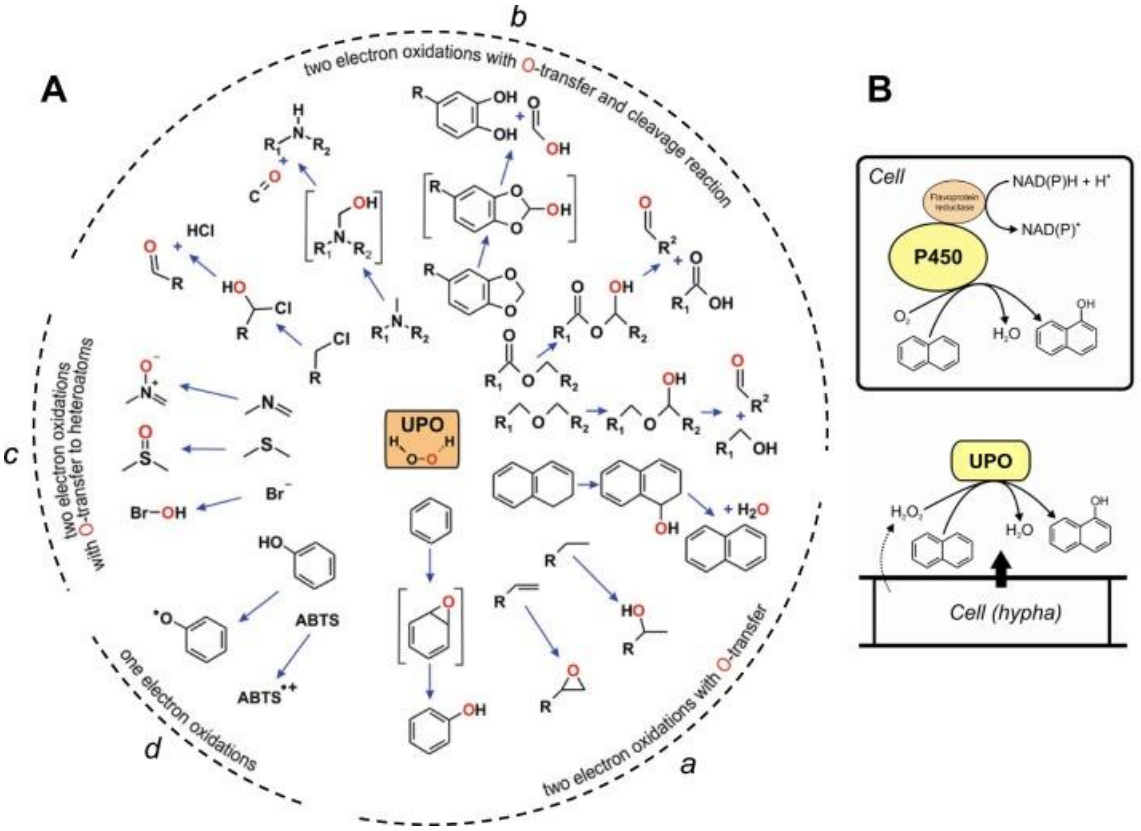


Figura 9. Las UPO de Basidiomicetes catalizan una variedad de reacciones de monooxigenación entre otras reacciones, presentando ciertas ventajas sobre los P450. **A.** Las reacciones de UPO incluyen: a) oxidaciones de dos electrones con transferencia de oxígeno (O); b) oxidaciones de dos electrones con transferencia de O y escisión subsiguiente del enlace; c) oxidaciones de dos electrones con transferencia de O a heteroátomos (N o S); y d) oxidaciones de un electrón. Modificado de acuerdo con Hofrichter *et al.* (2015). **B.** Mientras que los P450 intracelulares requieren una fuente de poder reductor (NAD [P] H) y un dominio de proteína o reductasa que contiene flavina adyuvante (y a menudo desperdician una parte significativa del poder reductor en la formación improductiva de H_2O_2), la UPO secretada solo necesita una fuente de H_2O_2 para activarse (también es más robusto debido a su naturaleza extracelular) (Martínez *et al.*, 2017).

Citocromo P450 monooxigensasa

Los citocromos P450 (CYP) son una superfamilia ubicua de monooxigenasas con gran versatilidad catalítica y diversidad de sustratos. Estas proteínas hemo-tiolato monooxigenasas se encuentran en todos los dominios, desde procariotas (arqueas, bacterias), hasta eucariotas inferiores (hongos e insectos) y superiores (plantas y animales, incluidos los humanos). Los CYP monooxigenasas catalizan la reacción de monooxigenación **($RH + O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow ROH + H_2O$)** mediante la inserción de uno de los átomos del oxígeno molecular al sustrato (RH), mientras el segundo átomo de

oxígeno es reducido a agua, convirtiendo una amplia variedad de sustratos lipofílicos en derivados más hidrofílicos (Črešnar & Petrič, 2011).

Diversos hongos pueden detoxificar y degradar compuestos xenobióticos como hidrocraburos policíclicos aromáticos (PAHs), compuestos fenólicos y otros contaminantes ambientales tóxicos, mediante reacciones mediadas por enzimas P450 inducibles (Cerniglia *et al*., 1978; Sutherland *et al*., 1992; Bezalel *et al*., 1997; Sietmann *et al*., 2000; Lisowska *et al*., 2006; Teramoto *et al*., 2004; da Silva *et al*., 2004). Por ejemplo, en los hongos ascomicetos, *A. niger* y *A. nidulans*, como también en el hongo basidiomicetos *P. crysosporium*, un miembro de la subfamilia CYP53A, cataliza la hidroxilación de ácido benzoico y otros benzoatos monosustituídos formando productos p-hidroxilados que son degradados posteriormente, por la vía metabólica del β-ketoadipato (Harwood & Parales, 1996).

Oxidasas productoras de peróxido

Se acepta que los miembros de las superfamilias de glucosa-metanol-colina oxidasa/deshidrogenasa (GMC) y oxidasas radicales de cobre (CRO) constituyen las fuentes más comunes de H_2O_2 extracelular para: a) peroxidasas ligninolíticas y otras peroxidasas o b) generación de radicales hidroxilos generados vía química Fenton (Martinez, *et al*., 2017) (Figura 10).

Oxidasas/deshidrogenasas que contienen flavina

La superfamilia de GMC oxidorreductasas incluye flovoproteínas: a) oxidasas, como aril alcohol oxidasas (AAO, EC 1.1.3.7), metanol oxidasa (MOX, también conocidas como alcohol oxidasas, EC 1.1.3.13), piranosa-2-oxidasa (P2O, EC 1.1.3.10) y glucosa oxidasa (GOX, 1.11.3.13), y b) también incluyen deshidrogenasas, como celobiosa deshidrogenasa (CDH, EC 1.1.99.18) que contienen dominios flavina y hemo separados, y glucosa deshidrogenasa (GDH, 1.1.99.35). Todas estas proteínas sustraen dos electrones desde sus sustratos que, posteriormente, son transferidos al O_2 por el grupo flavina reducido. El producto final de esta reducción es H_2O_2 (en el caso de las oxidasas) o bien otro sustrato reducido (en el caso de las deshidrogenasas).

AAO y P2O son proteínas secretadas que están involucradas en procesos de degradación extracelular. Sin embargo, GOX y MOX suelen carecer de péptidos señal

involucrados en los mecanismos típicos de secreción y son secretadas al medio extracelular gracias a procesos alternativos (vía vesículas) o simplemente mediante lisis de la hifa fúngica (Ferreira *et al*., 2015). La AAO es la GMC oxidasa más frecuente en hongos basidiomicetos degradadores de lignina, donde aporta el H_2O_2 requerido por las peroxidasas ligninolíticas. Mientras que las MOX son más abundantes en hongos basidiomicetos de la pudrición parda, donde el H_20_2 es reducido por Fe^{2+}, generando Fe^{3+} y radicales hidroxilos (HO°), involucrados en el ataque y degradación de la celulosa por estos hongos.

Las AAO se consideran como GMC oxidasas modelo en estudios de degradación de lignina, aplicaciones en biorefinerías, biopulpado, decoloración, oxidación de furfural, etc. (Carro *et al*., 2016). Esta enzima oxida diversos alcoholes aromáticos no fenólicos a los aldehídos correspondientes, mediante la sustracción de dos electrones con la consecuente reducción de O_2 a H_2O_2 (Bourbonnais & Paice 1992).

Entre las GMC deshidrogenasas, la celobiosa deshidrogenasa (CDH) es una proteína monomérica extracelular, que fue identificada en hongos, tanto basidiomicetos como ascomicetos. Esta enzima es capaz de oxidar celobiosa, celodextrinas y otros disacáridos u oligosacáridos con enlaces β-1,4, como la lactosa. Actualmente, se sabe que la CDH puede degradar y modificar los principales componentes de los materiales lignocelulósicos (celulosa, hemicelulosa y lignina) mediante la producción de radicales libres hidroxilos generados en reacciones tipo Fenton (Dashtban *et al*., 2010; Baldrin & Valaskova, 2008).

Copper Radical Oxidases (CRO)

Las CRO son una familia de metaloenzimas cúpricas. Incluyen la glioxal oxidasa (EC 1.2.3.15) y la galactosa oxidasa (EC 1.1.3.9).

La glioxal oxidasa es una enzima extracelular. Fue la primera enzima productora de H_2O_2 descripta en el hongo de pudrición blanca *Phanaerchaete chrysosporium*. Esta oxidasa oxida glioxal, metil glioxal y otros compuestos a hidroxi carbonilos y dicarbonilos acoplándolos a la reducción de O_2 para producir H_2O_2 (Kirk & Cullen, 1998).

La galactosa oxidasa, además de oxidar monosacáridos y galactosa terminal en polímeros, tiene actividad sobre el alcohol bencílico, produce la conversión de 5-hidroximetilfurfural en 2,5-diformilfurano, un químico muy valioso a nivel industrial (Kalum *et al*., 2014; Parikka *et al*., 2015).

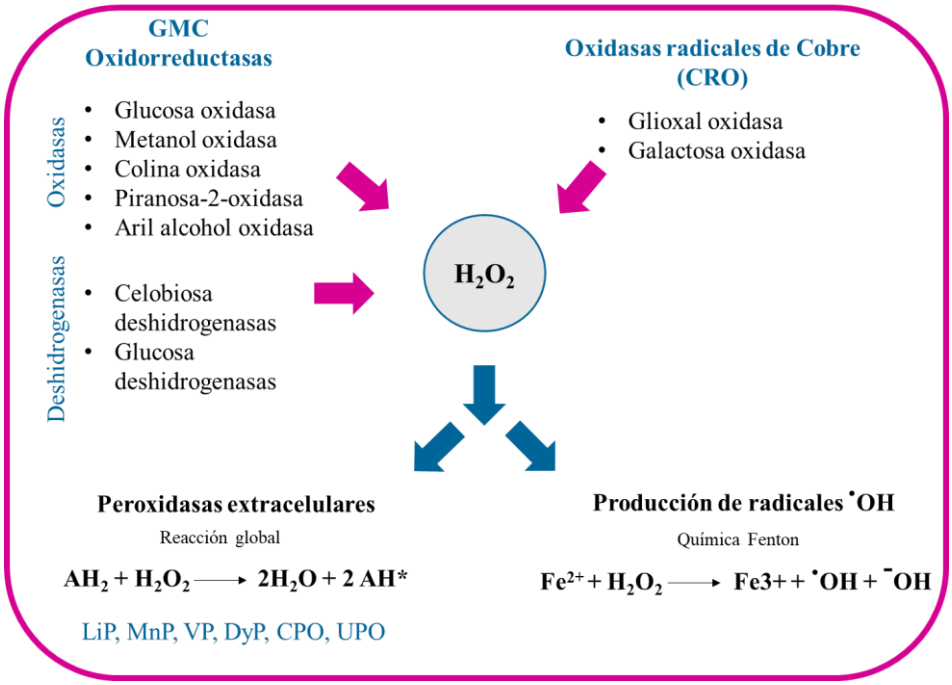


Figura 10. Principales enzimas productoras de H_2O_2 en hongos basidiomicetos. El H_2O_2 producido es empleado por peroxidasas ligninolíticas y otras peroxidasas, o bien participa en la generación de radicales hidroxilos vía Química Fenton.

II. Biodegradación no-enzimática

Como las enzimas ligninolíticas no pueden penetrar en la estructura de la madera se supone que el radical hidroxilo ($OH^{\cdot}$) junto con el Mn^{3+} y con mediadores naturales, son los responsables de las primeras etapas de degradación de los sustratos lignocelulósicos, participando también en la degradación de contaminantes orgánicos (Cohen *et al*., 2002; Xu & Goodell, 2001).

El radical hidroxilo está entre las especies químicas más reactivas, por su alta reactividad (EO= 2,06 v). No es selectivo y reacciona con una variedad de compuestos, promoviendo su mineralización total (Arantes & Milagres, 2007; Neamtu *et al*., 2004).

Se demostró que muchos hongos producen peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que participa de reacciones de Fenton, donde reacciona con el hierro ferroso (u otro metal de transición), dando como resultado la liberación de $OH^{\cdot}$ **(1)**.

(1) $Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + OH^{\cdot} + OH^{-}$

(2) $Fe^{3+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{2+} + OOH^{\cdot} + OH^{+}$

La reducción de hierro férrico a ferroso **(2)** también tiene lugar, aunque a una velocidad mucho más baja.

La principal vía de producción de radicales hidroxilos son las reacciones de Tipo Fenton. Los mecanismos que controlan estas reacciones extracelulares son tema de debate (Baldrian & Valaskova 2008; Goodell, 2003). Sin embargo, estudios previos determinaron que las reacciones Fenton, causadas por hongos basidiomicetes degradadores de madera, se llevan a cabo por tres mecanismos diferentes: a) reacciones catalizadas por celobiosa deshidrogenasa (CDH), b) péptidos de bajo peso molecular/ciclo redox de las quinonas, c) reacciones catalizadas por glucopéptidos (Grinhut *et al*., 2011).

Las reacciones Fenton son principalmente dependientes de: a) generación extracelular de peróxido de hidrógeno (tratado en este capítulo), b) reducción de hierro, de Fe^{3+} a Fe^{2+}, ya sea por metabolitos reducidos, como hidroquinonas, por ejemplo, la 2,5-dimetoxihidroquinona (2,5DMHQ), o por enzimas como la celobiosa deshidrogenasa (Sista Kameshwa & Qin, 2018). Estas además de producir peróxido, tiene capacidad de reducir hierro. Es una enzima, que participa en la generación y regeneración de los sustratos claves para que las reacciones de Fenton tengan lugar (Hyde & Wood, 1997; Kremer & Wood, 1992; Harreither *et al*., 2011) (Figura 11).

La oxido-reducción cíclica de quinonas produce radicales hidroxilos mediada por microorganismos. Por ejemplo, la 2,5DMHQ (quinona reducida) reduce el Fe^{3+} a Fe^{2+} y genera simultáneamente un radical semiquinona, que reduce el oxígeno a radical anión superóxido. Este luego de la reacción de dismutación, genera H_2O_2 o reduce al Fe^{3+} a Fe^{2+}, mientras que la semiquinona queda oxidada nuevamente como quinona (Karem *et al*., 1999; Newcombe *et al*., 2002; Korripally *et al*.,2013). Guillén y colaboradores (2000) describen la producción de radicales hidroxilos en una mezcla con Lacasa de *Pleurotus eryngii*, hidroquinonas derivadas de lignina e iones férricos. En este sistema las hidroquinonas son convertidas en semiquinonas por la Lacasa. La autooxidación de estas semiquinonas causa la activación del oxígeno, produciendo radicales aniones superóxido, como en el caso anterior. El radical anión superóxido no reacciona directamente con la lignina, sino que reacciona con otros radicales producidos por las enzimas, provocando las aperturas de anillos aromáticos o la desmetilación de la lignina, actuando como agente reductor u oxidante. Como oxidante produce Mn^{3+} a partir de Mn^{2+}. El radical anión superóxido también participa de la reacción de Fenton, generando radicales hidroxilos mediante la reducción de Fe^{2+}. También, el radical anión superóxido reacciona con H_2O_2

para formar radicales hidroxilos (Arantes & Milagres, 2007; Neamtu *et al.*, 2004), mediante la reacción de Haber-Weiss **(3)**:

(3) $O_2^{\cdot -} + H_2O_2 \longrightarrow HO^- + OH^{\cdot} + O_2$ **Reacción de Haber-Weiss**

Se encontraron glucopéptidos de pesos moleculares variables (que oscilan entre 1,5 y 12 kDa) capaces de catalizar reacciones redox y, por lo tanto, producen radicales hidroxilos libres en muchos hongos de la putrefacción parda, como *Gloeophyllum trabeum* y *Postia placenta* (Wang *et al.*, 2003; Arantes & Goodell, 2014; Wymelenberg *et al.*, 2010) (Figura 11).

Finalmente, es importante destacar que las enzimas involucradas en la homeostasis celular y en la reducción de hierro, como ferroxidasas, fenilalanina amonio liasa, catalasas, permeasas de hierro, flavinas monooxigenasas, dioxigenasas transportadoras y reductoras de quinonas son también de gran importancia para el funcionamiento de los sistemas Fenton mediados por microorganismos (Sista Kameshwa & Qin, 2018).

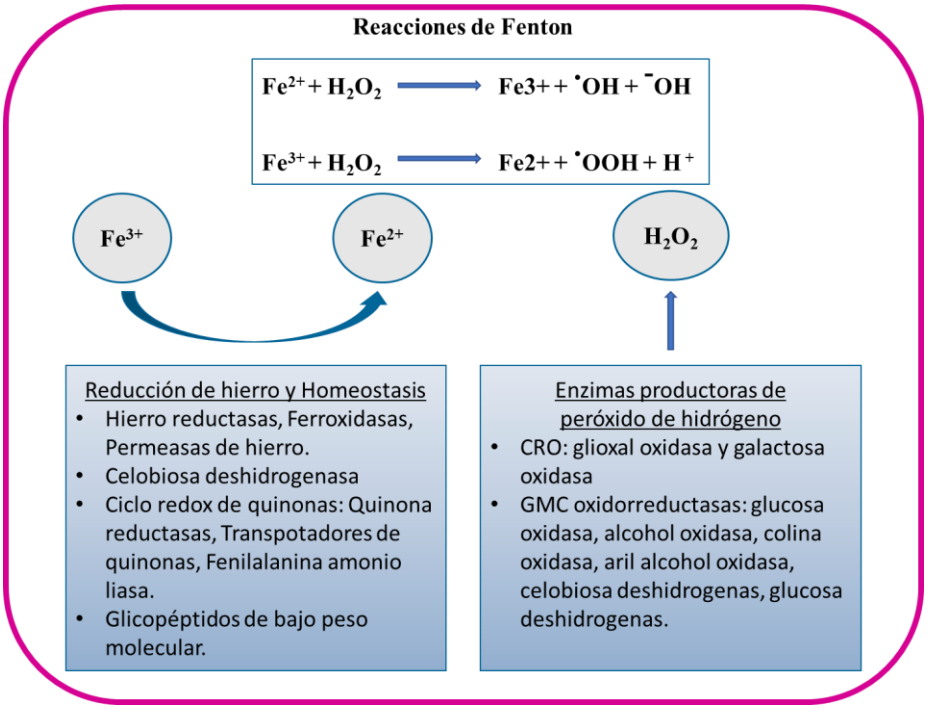


Figura 11. Producción de radicales hidroxilos por reacciones Fenton. Principales componentes de los sistemas involucrados en su mantenimiento.

1.6. *Trichosporon akiyoshidainum* HP-2023 y su capacidad decolorante

1.6.1. *Trichosporon akiyoshidainum* HP-2023

Trichosporon akiyoshidainum HP-2023 es una levadura basidiomicetácea aislada de la selva de Las Yungas, ubicada en sectores montañosos vinculados a los Andes. Se extiende discontinuamente desde Venezuela, a través de Ecuador, cruzando Perú y Bolivia, llegando al noroeste de Argentina con remanentes extremos en las provincias de Salta, Jujuy, Tucumán y Catamarca. (Pajot *et al*., 2007). Esta ecorregión representa uno de los reservorios de biodiversidad más valiosos de Argentina.

Esta levadura fue caracterizada morfológica y fisiológicamente en nuestro laboratorio (Pajot *et al*., 2011) y seleccionada por su capacidad decolorante.

1.6.2. Remoción de colorantes azoicos textiles por *T. akiyoshidainum* HP-2023

El proceso de remoción de colorantes llevado a cabo por *T. akiyoshidainum* HP-2023 tiene lugar durante la fase de crecimiento exponencial. Elimina completamente hasta 700 mg/L de colorante en menos de 24 horas. La reducción del color en el medio de cultivo va acompañada con una disminución en la concentración de aminas aromáticas y de la aromaticidad total del medio.

Los mecanismos de remoción de colorantes por *T. akiyoshidainum* HP-2023 involucran procesos de adsorción y/o degradación oxidativa dependiendo de las condiciones de cultivo y de la estructura de los colorantes.

La adsorción del colorante a la biomasa queda en evidencia por la coloración de la biomasa. Se describió que a pH ácido (2,0 – 5,0) *T. akiyoshidainum* fue capaz de adsorber Azul Reactivo 221 y Rojo Reactivo 141, colorantes azoicos empleados ampliamente en la industria textil (Pajot *et al*., 2007).

También, diversos colorantes indujeron actividades manganeso peroxidasa, peroxidasa independiente de manganeso y fenol oxidasa en diversos medios de cultivo, por lo que se supone la participación de un mecanismo de degradación oxidativa en los procesos de la decoloración.

Diversas técnicas analíticas (HPLC, FTIR, GC–MS) se aplicaron para elucidar el mecanismo de degradación de colorantes textiles por *T. akiyoshidainum* HP-2023. En estos ensayos, se utilizó el colorante azoico Negro Reactivo 5 como modelo para el estudio del proceso de decoloración, lo que facilitó la comparación de los resultados

obtenidos con los de la literatura y el análisis de los metabolitos producidos durante la degradación del colorante (Martorell *et al*., 2017).

Teniendo en cuenta que el HPLC-GPC se basa en la separación de partículas por su tamaño, con el análisis de los resultados obtenidos mediante la aplicación de esta técnica a los sobrenadantes de cultivo de *T. akiyoshidainum* HP-2023 en presencia del colorante Negro Reactivo 5 a diferentes tiempos (0, 24 y 48 h), se concluyó que durante el proceso de decoloración la molécula de colorante sufrió alteraciones en su estructura, probablemente una ruptura a nivel de los enlaces azoicos, que dio lugar a la formación de compuestos de menor peso molecular, que no pudieron ser analizados por esta metodología. El colorante Negro Reactivo 5 posee tres bandas de absorción características, una a 595 nm correspondiente al doble enlace -N=N-, otra a 311 nm que corresponde al naftaleno y la última a 254 nm que corresponde al benceno (Song *et al*., 2007). La desaparición de los picos correspondientes al colorante, observada en los cromatogramas obtenidos de cultivos de la levadura con Negro reactivo 5, incubados por 24 y 48 horas permitió arribar a la conclusión antes mencionada.

Para comprender los resultados obtenidos por FT-IR, es importante recordar que un espectro IR consiste de dos regiones principales, una por encima de los 1500 cm^{-1}, que corresponde a bandas de absorción que se asignan a grupos funcionales individuales y la región por debajo de los 1500 cm-1 (región de la huella dactilar o "*fingerprint*") que contiene muchas bandas y que caracteriza a la molécula en general. En la región *fingerprint* se encontran picos correspondientes a grupos funcionales individuales, pero la presencia de esos picos solo puede considerarse de ayuda para la identificación y no una prueba concluyente (Yuen *et al*., 2005). Con el análisis por FT-IR de los sobrenadantes de cultivo, correspondientes a diferentes tiempos del proceso de decoloración del colorante Negro Reactivo 5, se concluyó que los enlaces correspondientes al grupo N=N (responsable del color), $-NH_2$ de aminas aromáticas y $-RSO_3$ sufrieron rupturas durante las primeras horas del cultivo. Estos resultados concuerdan con lo que se observó en el análisis de HPLC-GPC, anteriormente mencionado.

Finalmente, con el estudio de los sobrenadantes de cultivo con GC-MS, se identificó un compuesto, 4-((clorodifluorometil)sulfonil)anilina, con bajo porcentaje de identidad, que no es parte de la estructura del colorante, por lo que no se pudo proponer un mecanismo plausible para su obtención a partir de la composición y condiciones utilizadas en los cultivos.

Por esa razón, a partir de la estructura química del colorante y conociendo las enzimas que participan en su degradación y sus mecanismos de acción, se procedió a comparar el espectro de masas obtenido con las masas teóricas de posibles metabolitos de degradación de Negro Reactivo 5.

El análisis se realizó con el programa ChemBioDraw® y se basó en la ionización del diazeno generado por ruptura asimétrica de los enlaces azoicos, que se denomina 4-((diazenilfenil)sulfonil)metil hidrógeno sulfato (Figura 12). Se obtuvieron las estructuras de los iones que este compuesto produce, sus masas exactas y su relación m/z. La relación m/z es una magnitud adimensional, donde m se refiere al número de masa atómica o molecular del ión y z a la carga del mismo.

El análisis teórico indicó que el espectro de masa obtenido es compatible con la presencia de 4-((diazenilfenil)sulfonil)metil hidrógeno sulfato. Además, se identificó una naftoquinona que forma parte de la estructura del Negro Reactivo 5, posiblemente 5-amino-4-hidroxi-3,6-dioxo-2,3,5,6-tetrahidronaftaleno-2,7-disulfonato de sodio (Figura 12). En el extracto de las 24 h de cultivo no se detectaron los compuestos relacionados estructuralmente a 4-((diazenilfenil)sulfonil)metil hidrógeno sulfato, ni aquellos emparentados con 5-amino-4-hidroxi-3,6-dioxo-2,3,5,6-tetrahidronaftaleno-2,7-disulfonato de sodio, por lo que se concluyó que fueron degradados luego de las 10 h de cultivo intra o extracelularmente.

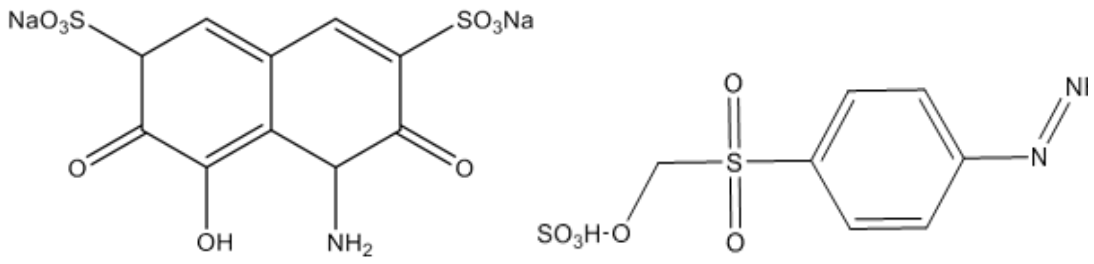


Figura 12. Estructuras moleculares desarrolladas de 5-amino-4-hidroxi-3,6-dioxo-2,3,5,6-tetrahidronaftaleno-2,7-disulfonato de sodio (arriba) y 4-((diazenilfenil)sulfonil)metil hidrógeno sulfato (abajo)

De acuerdo a todos los resultados obtenidos anteriormente por el grupo de trabajo y a la bibliografía existente, se propuso que la degradación de Negro Reactivo 5 por *T.akiyoshidainum* HP-2023 ocurre por un mecanismo oxidativo, el cual involucra la

participación de enzimas peroxidasas y/o fenol oxidasas. Sin embargo, debido a la presencia de ácidos orgánicos en los sobrenadantes de cultivo (ácido oxálico, ácido málico, etc.), no pudo descartarse la participación de otros mecanismos oxidativos como las reacciones de tipo Fenton-mediadas.

En cualquier caso, la ruptura del colorante se habría producido en dos etapas, con la formación inicial de una quinona de color púrpura con un enlace azoico que sería degradada posteriormente, lo que a su vez produciría la decoloración total de los medios de cultivo. Este proceso no llevaría a la formación de aminas aromáticas potencialmente tóxicas, mientras que los metabolitos producidos en la degradación del colorante serían metabolizados por las células. (Figura 12).

A pesar de que el mecanismo propuesto es coherente con lo descripto en la literatura y los antecedentes recopilados por años en el grupo de trabajo, aún es necesario un estudio más detallado y preciso de los mecanismos involucrados.

1.7. Estudio bioquímico/enzimático de los mecanismos de decoloración

La degradación oxidativa de colorantes se produce por uno de dos mecanismos generales: Uno netamente enzimático donde intervienen enzimas ligninolíticas y peroxidasas de baja especificidad y otro mediado por reacciones de tipo Fenton, donde intervienen, indirectamente, enzimas encargadas de la producción de peróxidos, la reducción de hierro y el ciclado redox de quinonas.

Las publicaciones recientes que describen mecanismos de decoloración en términos de las actividades enzimáticas involucradas indican que para comprender en detalle el mecanismo de decoloración de *T. akiyoshidainum* HP-2023, es suficiente determinar bioquímicamente las actividades enzimáticas implicadas y combinar los resultados con los obtenidos de técnicas como HPLC, FTIR y GC–MS. Sin embargo, esta idea es errónea por diversos motivos, entre los que conviene destacar los siguientes:

1) Además de los procesos de degradación del colorante, puede darse la adsorción del mismo a la biomasa de la levadura, lo que obliga a desarrollar medios de cultivo en los que la adsorción sea mínima y la degradación máxima (Martorell *et al*., 2012).
2) La degradación oxidativa de colorantes azoicos, ya sea enzimática o mediada por reacciones Fenton, produce los mismos intermediarios estables incluyendo

quinonas y diazenos, por lo que ambos mecanismos no pueden ser diferenciados por los metabolitos producidos (Guivarch *et al*., 2003).

3) Las determinaciones enzimáticas de oxidorreductasas se basan en la oxidación o reducción de compuestos seleccionados por características como su estabilidad y coeficiente de absortividad molar, no en su especificidad, por lo que los falsos positivos son extremadamente comunes. Por ejemplo, una de las técnicas más común para medir actividad manganeso peroxidasa emplea como reactivos DMAB y MBTH (Castillo *et al*., 1994). A su vez el MBTH se aplica en la evaluación de diferentes actividades enzimáticas, como tirosinasas, tolueno-4-monooxigenasa y catecolasa. El 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH) es una molécula que se utiliza como reactivo en química analítica para la detección y determinación de diferentes compuestos químicos, incluidos aldehídos, aminas aromáticas, indoles, compuestos iminohetero-aromáticos, carbazoles, arilalquilaminas y fenoles (Ribeiro *et al*., 2009; Setti *et al*., 1998), principalmente el MBTH se usa para capturar quinonas, formando un aducto estable MBTH-Q (Siah *et al*., 2017).
4) Muchas de estas oxidorreductasas, son poco específicas, pueden atacar diversos sustratos, lo que dificulta la interpretación de los resultados (Kües, 2015).
5) La capacidad de detectar una oxidoreductasa en un medio complejo, depende de la presencia de compuestos oxidantes o reductores en los medios de cultivo (ácidos orgánicos, NADH, peróxidos, etc) y que no existan enzimas que catalicen reacciones inversas a las que se quiere medir. Por ejemplo, la determinación más común de celobiosa deshidrogenasa se basa en la reducción de diclorofenol-indofenol (DCIP), la presencia conjunta de una lacasa en el medio, lo cual es frecuente en hongos, interfiere con esta determinación debido a la rápida reoxidación de la forma reducida de DCIP y puede enmascarar completamente la actividad CDH (Baminger *et al*, 1999). También es importante el efecto de la ausencia de mediadores redox que extienden aún más el rango de sustratos a ser oxidados o reducidos por las enzimas (Gangwar *et al*., 2016, Kües, 2015).
6) El hidroxilo producido por las reacciones Fenton, en ciertas condiciones causa la oxidación de los sustratos usados para las determinaciones enzimáticas, llevando también a la generación de falsos positivos.

7) La producción de enzimas extracelulares por *T. akiyoshidainum* es notablemente baja, lo que dificulta la purificación de enzimas a partir de los medios de cultivo.
8) La inhibición de algunas peroxidasas por excesos de H_2O_2, la labilidad de otras oxidorreductasas, la participación de complejos enzimáticos y la necesidad de cofactores dificultan la purificación de las enzimas con actividad decolorante.
9) La capacidad de una peroxidasa purificada para causar la decoloración de colorantes textiles in vitro, no necesariamente implica una participación de esta enzima en el proceso de decoloración en condiciones reales.

En este sentido, la secuenciación y anotación del genoma de *Trichosporon akiyoshisdainum* HP-2023, nos permitió tener una idea global del potencial genético de degradación y a su vez compararlo con la de otros microorganismos relacionados cuyos genomas se encuentran secuenciados. Disponer de esta información es fundamental para un uso más eficiente de técnicas como la transcriptómica y proteómica.

En particular la identificación masiva de proteínas permitió conocer la identidad de las proteínas que intervienen en el proceso de decoloración de colorantes textiles. Se pudo reconstruir las rutas metabólicas activas durante la decoloración como así también entender el proceso global. De esta manera será más fácil el planteo de estrategias eficientes de decoloración de efluentes a nivel industrial.

OBJETIVOS

Objetivo general

Contribuir al conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la biodecoloración de efluentes textiles industriales, haciendo hincapié en el estudio comparativo de genomas de levaduras del género *Trichosporon*.

Objetivos específicos

- Comparar la actividad decolorante de *Trichosporon akiyoshidainum* HP-2023 con la de otras especies del mismo género cuyos genomas ya se encuentren disponibles.

- Identificar el efecto de diferentes metales o intermediarios redox sobre el proceso de biodecoloración.

- Secuenciar y anotar el genoma de *Trichosporon akiyoshidainum* HP-2023.

- Medir y caracterizar diferentes actividades enzimáticas asociadas al tratamiento de efluentes coloreados, tales como lacasas, tirosinasas o manganeso-peroxidasas.

Capítulo 1

Comparación de la habilidad decolorante de levaduras del género *Trichosporon*

(*Determinaciones enzimáticas. Efecto de inductores*)

CAPÍTULO 1

Comparación de la habilidad decolorante de levaduras del género *Trichosporon*

(*Determinaciones enzimáticas. Efecto de inductores*)

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Decoloración de colorantes azoico por levaduras

La decoloración de colorantes azoicos por levaduras ha sido poco estudiada en comparación con la decoloración por especies bacterianas o fúngicas.

Sin embargo, las levaduras tienen muchas ventajas para su aplicación en procesos de biorremediación, como la alta capacidad para acumular colorantes y metales pesados, como Pb (II) y Cd (II) (Ertugrul *et al*., 2008; Fairhead & Thony-Meyer, 2012), crecimiento rápido, decoloración más rápida que los hongos filamentosos y la capacidad de sobrevivir en ambientes desfavorables (Martorell *et al*., 2012).

1.1.2. Mecanismos de decoloración

La decoloración por levaduras puede ocurrir por dos mecanismos: bioadsorción o biodegradación. Estos pueden darse individualmente o en conjunto, dependiendo de las condiciones de cultivo.

1.1.2.1. Bioadsorción

La bioadsorción se define como la unión de un soluto a la biomasa celular en un proceso que no involucra consumo de energía. Este proceso puede darse tanto en células muertas como en células vivas. La unión del colorante a la biomasa involucra, principalmente, la unión del compuesto a los grupos nitrogenados de peptidomananos, peptidoglucanos o proteínas de pared. También puede darse la unión a grupos activos de la superficie celular, como los presentes en polisacáridos ácidos, lípidos, aminoácidos y otros componentes celulares. La bioadsorción depende principalmente de factores ambientales como el pH, la concentración inicial del colorante, la temperatura, etc. (Aksu, 2005).

El pH de la solución afecta tanto la adsorción como el color y la solubilidad de algunos colorantes. La carga neta del bioadsorbente depende también del pH, debido a que en la superficie del mismo hay polímeros con diferentes grupos funcionales como los carboxilos, hidroxilos, aminas o fosfatos. A pH ácido, la superficie del adsorbente se protona y adquiere una carga neta positiva lo que aumenta la unión de colorantes aniónicos. Por el contrario, con pH alcalino, la superficie queda con carga neta negativa y por ende conduce a la adsorción de colorantes catiónicos.

La concentración inicial del colorante provee al sistema de la fuerza motriz necesaria para superar la resistencia de la transferencia de masa entre la fase líquida y la fase sólida, así a mayores concentraciones iniciales de colorante, mayor adsorción a la superficie del adsorbente (Aksu, 2005).

Por otra parte, un aumento de la temperatura disminuye la viscosidad de la solución, aumentando la difusión de las moléculas del colorante desde la fase líquida a la fase sólida.

Muchas levaduras son capaces de adsorber colorantes. Por ejemplo, la bioadsorción de colorantes textiles azoicos, reactivos y ftalocianinas, se produce con biomasa de *Kluyveromyces marxianus* IMB3 (Bustard *et al*., 1998; Meehan *et al*., 2000). Diferentes colorantes azoicos son adsorbidos por *C. tropicalis* (Donmez, 2002), mientras que Pajot y colaboradores (2007) reportaron que *Trichosporon akiyoshidainum* adsorbe Azul Reactivo 221 y Rojo Reactivo 141, colorantes azoicos empleados ampliamente en la industria textil.

1.1.2.2. Biodegradación

En el proceso de biodegradación se producen cambios en la estructura molecular de un compuesto. En casos ideales se obtiene la mineralización del compuesto, es decir su transformación en sustancias como CO_2, H_2O o CH_4. Cuando el compuesto no es mineralizado completamente el proceso se denomina biotransformación.

En la década de 1990 surgió un gran interés en la degradación de colorantes azoicos por levaduras y se reportó que varias especies podían llevar a cabo la decoloración por mecanismos enzimáticos. Por ejemplo, *Candida curvata* fue empleada para el tratamiento de aguas residuales coloreadas (Kakuta *et al*., 1992). Se describió la capacidad *Geotrichum candidum* de decolorar diferentes tipos de colorantes textiles sintéticos tanto azoicos como antraquinónicos (Kim *et al*., 1995) mientras que tanto

Candida zeylanoides, como *Debaryomyces polymorphus*, *Candida tropicalis* y *Issatchenkia occidentalis* decoloraron, principalmente, colorantes azoicos (Martins *et al*., 1999; Yang *et al*., 2003; Ramalho *et al*., 2004).

Posteriormente, se describieron otras especies de levadura ascomicetáceas; como *Pseudozyma rugulosa* (Yu *et al*., 2005), *Candida oleophila* (Lucas *et al*., 2006), *Saccharomyces cerevisiae* (Jadhav *et al*., 2007), *Galactomyces geotrichum* (Jadhav *et al*., 2008), *Candida albicans* (Vitor & Corso, 2008), *Yarrowia lipolytica* (Aracagök & Cihangir, 2013) y *Issatchenkia orientalis* (Jafari *et al*., 2014b), que pueden decolorar colorantes azoicos complejos, como Negro Reactivo 5 (Aracagök & Cihangir, 2013; Yang *et al*., 2003; Lucas *et al*., 2006; Jafari *et al*., 2014b), Violeta Directo 51 (Vitor & Corso 2008), Rojo Reactivo Brillante K–2BP (Yang *et al*., 2003, Yu *et al*., 2005), Amarillo Reactivo 84, Rojo Reactivo 141 (Martorell *et al*., 2012) y Azul Reactivo 171 (Saratale *et al*., 2009).

La degradación de colorantes azoicos por levaduras basidiomicetáceas ha sido mucho menos estudiada, aunque se reportó que *Trichosporon multisporum y Trichosporon akiyoshidainum* fueron capaces de degradar Rojo Reactivo 141, Azul Reactivo 221 y Negro Reactivo 5 (Pajot *et al*., 2007, 2008, 2011). Azul Marino H-ER y otros colorantes industriales incluyendo Rojo HE7B, Amarillo Dorado 4BD, Verde HE4BD, Naranja HE2R, Verde Malaquita, Cristal Violeta y Metil Violeta fueron degradados por *T beigelli NCIM-3326* (Saratale *et al*., 2010). Martorell y colaboradores, (2012) informaron la decoloración de Rojo Reactivo 141, Negro Reactivo 5, Amarillo Reactivo 84 y Azul Reactivo 221 por *Trichosporon porosum*.

Tanto en levaduras ascomicetes como en basidiomicetes, los mecanismos de decoloración sólo están descriptos parcialmente. En general, los trabajos describen la participación en estos mecanismos de las enzimas clásicas asociadas, o bien a la reducción de los enlaces azoicos (azo reductasas y reductasas inespecíficas), o a la degradación de lignina (lacasas y peroxidasas ligninolíticas MnP, LiP y VP).

1.1.3. Decoloración de colorantes por levaduras del género *Trichosporon*

La mayoría de los trabajos sobre levaduras basidiomicetes capaces de decolorar colorantes azoicos incluyen levaduras del género *Trichosporon.*

Son levaduras basidiomecetes que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. Fueron aisladas de diferentes fuentes, incluyendo suelo, sedimentos, aguas

residuales, lodos y pulpa de madera. El interés industrial en este género se ha centrado en la capacidad de utilizar una variedad de sustratos, en particular compuestos aromáticos, como única fuente de carbono y energía (Kurtzman *et al*., 2011).

Entre estas levaduras los mecanismos de biodegradación de colorantes reportados hasta el momento, involucran tanto reacciones de degradación reductivas como oxidativas.

1.1.3.1. Enzimas involucradas en la degradación reductiva de colorantes azoicos por levaduras del género *Trichosporon*.

Aunque las especies del género *Trichosporon* son estrictamente aeróbicas, Saratale y colaboradores (2010) observaron un aumento significativo en las actividades de la NADH-DCIP reductasa y azo-reductasa en las células de *Trichosporon begelii* NICM-3326 obtenidas después de la decoloración completa de Azul Marino H-ER (C.I. azul reactivo 171). Esto presumiblemente indica la participación de estas enzimas en un proceso de decoloración reductiva. La actividad de estas enzimas conduce a la ruptura del enlace azoico (–N=N–) del colorante con la consiguiente formación de aminas aromáticas que son metabolizadas posteriormente por la levadura mediante reacciones oxidativas

1.1.3.2. Enzimas involucradas en la degradación oxidativa de colorantes azoicos por levaduras del género *Trichosporon*.

Enzimas como lacasas (Lac) y otras oxidasas, manganeso peroxidasas (MnP), lignina peroxidasas (LiP), peroxidasas versátiles (VP), fueron ampliamente relacionadas con la biodecoloración y mineralización de colorantes por hongos ligninolíticos. La contribución de cada una de estas enzimas al proceso global de biodegradación es diferente para cada microorganismo. Todas estas enzimas catalizan reacciones de oxidación del enlace azoico que conduce a la formación de un ión carbonio que, al ser atacado nucleofílicamente por una molécula de agua, produce una benzoquinona y un derivado diazénico. Posteriormente, el diazeno es oxidado, pierde N_2 y produce finalmente un derivado peroxidado.

Algunas de estas actividades enzimáticas se detectaron en cultivos de levaduras del género *Trichosporon,* en presencia de colorantes azoicos. Por ejemplo, manganeso peroxidasa y fenol oxidasa fueron detectadas durante la degradación de Negro Reactivo

5 por *T. akiyoshidainum* (Pajot *et al*., 2011; Martorell *et al*., 2017). Martorell y colaboradores (2012), demostraron actividad manganeso peroxidasa y tirosinasa en *T.porosum*. En ambos casos, la presencia de colorantes azoicos como el Negro Reactivo 5 en los medios de cultivo, fueron una condición necesaria para la, inducción de estas actividades.

Yang y colaboradores (2013) determinaron la producción de manganeso peroxidasa en diversos aislamientos de levaduras del género *Trichosporon*: *Trichosporon montevideense* MA-Y 8, *Trichosporon cutaneum* AA-M6, *Trichosporon sp*. AA-Y25, AA-Y2, AA-Y22 y *Trichosporon coremiiforme* DA-Y1 y también producción de lignina peroxidasa en *Trichosporon montevideense* MO-M 16.

La detección en levaduras de estas actividades, relacionadas a la degradación de lignina, es desconcertante ya que se acepta que las levaduras no son organismos ligninolíticos. Aunque en la mayoría de los casos puede tratarse de falsos positivos causados por la oxidación inespecífica de los sustratos utilizados en las determinaciones, Sláviková y colaboradores (2002) revelaron la producción de manganeso peroxidasa (MnP) y lignina peroxidasa (LiP) durante la biotransformación de subproductos de la fabricación de pasta de madera derivados de la lignina por *Trichosporon pullulans*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Microorganismos

Trichosporon akiyoshidainum HP-2023 es una levadura basidiomicete aislada de Las Yungas. Fue seleccionada por su potencial decolorante e identificada molecular y fisiológicamente (Pajot *et al*., 2008). *T. akiyoshidainum* HP-2023 está depositada en *American Type Culture Collection* con el número de acceso ATCC MYA-4129.

Trichosporon chiarellii es una levadura basidiomicete aislada de un nido hormigas atinas (*attini*) en Botucatu, estado de Sao Paulo, Brasil (Pagnocca *et al*., 2010). Recientemente fue reclasificada y se encuentra depositada como *Haglerozyma chiarellii* en *American Type Culture Collection* bajo el número de acceso ATCC MYA-4694.

Trichosporon porosum 4029 es una levadura aislada de Las Yungas. Fue seleccionada por su capacidad decolorante y conservada en el cepario de PROIMI.

Las levaduras se conservaron en glicerol 30% a -80°C. Los cultivos de trabajo se realizaron en placas de Petri con medio NDM agarizado, conservadas a 4°C y repicadas periódicamente.

2.2. Crecimiento y decoloración en diferentes medios de cultivo. Comparación entre *T. akiyoshidainum* HP-2023, *T. chiarellii* MYA-4694 y *Trichosporon porosum* 4029.

Se midió la habilidad decolorante de *Trichosporon akiyoshidainum* HP-2023, *T.chiarelli* MYA-4694 y *Trichosporon porosum* 4029 en dos medios de cultivo diferentes. El primer medio, llamado NDM_1 (en g/L: glucosa, 20; extracto de levadura, 2,5; $(NH_4)_2SO_4$, 2,5; KH_2PO_4, 5; $MgSO_4.7H_20$, 0,5; CaCl, 0,13), es un medio optimizado para la decoloración de levaduras ascomicetáceas (Ramalho *et al*., 2004). Fue utilizado por el grupo de trabajo en las experiencias de decoloración previas, donde se detectaron actividades fenol oxidasa y manganeso peroxidasa en cultivos de *T. akiyoshidainum* (Pajot *et al*., 2007; Martorell *et al*., 2012). El segundo medio llamado NDM_2 (composición en g/L: Lactosa, 10; extracto de levadura, 1; KH_2PO_4, 1; $MgSO_4.7H_20$, 1; urea 0,5) fue optimizado para la decoloración oxidativa por *T. akiyoshidainum* HP-2023 (Martorell, 2015). Estos medios se diferencian principalmente en la fuente de carbono y nitrógeno: glucosa y $(NH_4)_2SO_4$ en el medio NDM_1 y lactosa y urea en el medio NDM_2.

Los ensayos de decoloración se realizaron en Erlenmeyers de 500 mL con 100 mL de medio, adicionados con Negro Reactivo 5 (Vilmafix® B-V) en una concentración final

de 200 mg L^{-1}. Para inocular, se utilizaron 10 mL de una suspensión de levaduras (DO_{550}=0,8) obtenida luego de 24 h de cultivo en medio NDM_1 o NDM_2, sin colorante, según correspondiese.

Los cultivos se incubaron a 25ºC y 250 rpm durante 24 h. Las muestras se tomaron asépticamente cada 3 h y se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 min. Para determinar la biomasa por peso seco, las células se lavaron dos veces con agua destilada estéril y se secaron a 80ºC hasta peso constante.

Los sobrenadantes del medio de cultivo se conservaron para determinar remoción de colorante, pH, remoción de aminas aromáticas y actividades enzimáticas. Para los cultivos con colorantes se realizó un espectro de absorción UV-visible a fin de analizar la disminución de la absorbancia y relacionarla con la desaparición del color en función del tiempo.

2.2.1. Decoloración

La remoción del color fue calculada como porcentaje de decoloración a la longitud de onda de máxima absorbancia del colorante Negro Reactivo 5 (λ_{opt} = 595), según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Decoloración} = ((A_0 - A_t)/A_0) \cdot 100$$

Donde, A_0: absorbancia inicial a $\lambda_{opt=595nm}$ y A_t: absorbancia a $\lambda_{opt=595nm}$ a diferentes tiempos.

2.2.2. Determinación de pH

Se midió el pH de los sobrenadantes de cultivo con un microelectrodo de pH *Sartorius PB 16.*

2.2.3. Determinación de Aminas Aromáticas Totales (ATT)

Las AAT se determinaron en los sobrenadantes de cultivo por el método de Oren y colaboradores (1991). La cuantificación de AAT se realizó a partir de una curva de calibración con ácido sulfanílico debido al carácter altamente sulfonado del colorante usado.

2.2.4. Registro de los espectros de absorbancia en la región UV-visible

Se registró el espectro de absorbancia de todos los sobrenadantes en el rango 360-800 nm. Se utilizó un lector de microplacas *Multiskan GO* (*Thermo Fisher).*

Los sobrenadantes fueron previamente filtrados para evitar interferencias causadas por la presencia de células.

2.2.5. Determinaciones enzimáticas

Se determinaron las siguientes actividades enzimáticas relacionadas a los mecanismos de decoloración de los colorantes azoicos reportados.

Lacasa

La actividad lacasa se midió a 25ºC. Se usó como sustrato ABTS (Heinzkill *et al*., 1998). La mezcla se reacción contenía ABTS 1,8 mM en buffer acetato 50 mM, pH 4,0. Se utilizaron 100 µl de sobrenadante en 200 µL de volumen final. El incremento en la absorbancia fue controlado a 420 nm ($\varepsilon 420 = 36.000\ M^{-1}\ cm^{-1}$). Se definió una unidad como la cantidad de enzima capaz de oxidar 1 µmol de sustrato por minuto.

Evaluación del efecto de la capacidad antioxidante del medio en la determinación de la actividad enzimática lacasa

Para evaluar el efecto de la capacidad antioxidante de los sobrenadantes de cultivo sobre la determinación de actividad lacasa, se utilizaron muestras de sobrenadante de cultivo de *T. akiyoshidainum* HP-2023, a las que se agregaron diferentes cantidades conocidas de lacasa de *Trametes versicolor* (Sigma-Aldrich). Luego se determinó la actividad enzimática en estas mezclas, siguiendo la oxidación de ABTS a 420 nm como se mencionó anteriormente.

Fenol oxidasa

La actividad se midió a 25ºC con el método descripto por Rodríguez-Lopez *et al*. (1994). Se usó una mezcla de reacción con MBTH (3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone), 0,07 mM y catecol como sustrato en una concentración final de 10 mM en buffer fosfato 50 mM, pH 6,0. Se utilizaron 100 µL de sobrenadante de cultivo en 200

µL de volumen final de mezcla de reacción. La reacción se siguió a 420 nm. Se definió una unidad como la cantidad de enzima capaz de producir en la mezcla un cambio de 0,01 unidades ópticas por minuto.

Manganeso Peroxidasa

La actividad se midió a 25 °C con el método propuesto por Castillo *et al.* (1994). La mezcla de reacción consistió en MBTH (3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone), 0,07 mM, DMAB (3,3-dimethylaminobenzoic acid), 1 mM, $MnSO_4.7H_2O$ 0,3 mM, H_2O_2 0,05 mM; buffer succinato-lactato 100 mM, pH 4,5. Se emplearon 100 µL de sobrenadante en 300 µL de volumen final. Se siguió el curso de la reacción a 610 nm ($\varepsilon 610 = 53.000\ M^{-1}\ cm^{-1}$). Se definió una unidad como la cantidad de enzima capaz de oxidar 1 µmol de sustrato por minuto. Se realizaron controles sin sobrenadante, sin Mn con H_2O_2, sin H_2O_2 con Mn y sin H_2O_2 ni Mn, lo que permitió calcular la actividad dependiente de manganeso, la actividad independiente de manganeso y la actividad peroxidasa total

Azo Reductasa

La actividad se midió a 25ºC con el método descripto por Ramalho y col (2005). Ya que algunas reductasas de la pared celular pueden tener actividad decolorante, se realizó el ensayo en sobrenadantes de cultivo y en suspensiones celulares. Se tomaron alícuotas de 1,5 mL de cultivos. Las muestras fueron centrifugadas 15 min a 10.000 x g. El pellet fue lavado 2 veces con agua destilada estéril y las células fueron resuspendidas en un volumen de 1,5 mL de buffer acetato 50 mM, pH 4,0 (adicionado con glucosa al 5%) 200 mM, pH 7,5. Esto se hizo para obtener la misma concentración de células que en los cultivos originales. Se midió la DO a 550 nm y se realizó una curva de crecimiento con los valores obtenidos, los cuales se correlacionaron posteriormente con la actividad cuantificada.

La mezcla de reacción consistía en buffer acetato 50 mM, pH 4,0, con 5% de glucosa, NADH 3,5 mM, Negro Reactivo 5 20 mg L^{-1} y 100 µl de la suspensión de células o sobrenadante de cultivo, en un volumen final de 500 µl.

Se dejó que las mezclas reaccionen a temperatura ambiente (20 ± 2 °C) durante 20 minutos. Dentro de este período, la disminución de la absorbancia fue lineal con el

tiempo. En ambos casos se controló la desaparición del colorante a 595 nm. Se definió una unidad como la cantidad de enzima capaz de producir un cambio de una unidad de absorbancia por min (Ramalho *et al*., 2005).

Hierro Reductasa

La actividad hierro reductasa fue evaluada en las células enteras registrando el incremento en la absorbancia a 540 nm debido a la formación de complejos de Fe (II) con disulfonato de batofenantrolina.

Se tomaron alícuotas de 1,5 mL de cultivos. Las muestras fueron centrifugadas 15 min a 10.000 x g. El pellet fue lavado 2 veces con agua destilada estéril y las células fueron resuspendidas en un volumen de 1,5 mL de buffer citrato (adicionado con glucosa) 200 mM, pH 7,5. Esto se hizo para obtener la misma concentración de células que en los cultivos originales. Se midió la DO a 550 nm y se realizó una curva de crecimiento con los valores obtenidos, los cuales se correlacionaron posteriormente con la actividad cuantificada. La mezcla de reacción consistió en buffer citrato 200 mM, pH 7,5, con 5% de glucosa, $FeCl_3$ 0,02 mM, NADH 0,1 mM, Batofenantrolina disulfonato 0,1mM y 100 µl de la suspensión de células, en un volumen final de 500 µl.

Las reacciones se llevaron a cabo en Eppendorf a temperatura ambiente (20 ± 2 °C) durante 10 minutos.

Las células fueron removidas, cuando fue necesario, por centrifugación, y la absorbancia se midió a 540 nm frente a un blanco preparado de manera similar, pero sin células.

La concentración de hierro ferroso (Fe^{2+}) se estimó usando un coeficiente de absorción molar de 22,14 $mM^{-1}.cm^{-1}$ para el complejo hierro (II)-Batofenantrolina disulfonato (Rapisarda *et al*., 1999).

Oxidasas productoras de peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

La actividad de oxidasas productoras de peróxido, por ejemplo, glucosa oxidasa, se determinó por el método de Bergmeyer y Bernt (1974).

La mezcla de reacción consistió en 2,2´-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) 5 mM en buffer fosfato de sodio 0,1 M, pH 7, peroxidasa comercial 0,15 U (*Horseradish peroxidase Type II, Sigma-Aldrich*), hexacianoferrato (III) de potasio ($K_3[Fe(CN)_6]$) 1 Mm y el sobrenadante de cultivo, en un volumen final de 1 mL.

La oxidación del ABTS fue seguida a 725 nm (ε = 19 $mM^{-1}cm^{-1}$).

$K_3[Fe(CN)_6]$ fue empleado para oxidar los agentes reductores del medio, como cisteína, los cuales decoloran el color verde del ABTS oxidado ($ABTS^{\circ+}$).

2.3. Efecto de diferentes metales e intermediarios redox sobre las actividades enzimáticas y la decoloración de Negro Reactivo 5.

2.3.1. Inducción enzimática

Se seleccionaron, en base a la literatura, iones y compuestos capaces de inducir diferentes enzimas involucradas en los procesos de decoloración. Se estudió el efecto de estos compuestos tanto sobre la actividad enzimática, como sobre la decoloración de Negro Reactivo 5 por *T. akiyoshidainum* HP-2023. Cada uno de estos compuestos se ensayó en dos concentraciones diferentes Fe^{2+} (0,5 mM y 0,15 mM), Cu^{2+} (0,5 mM y 0,15 mM), Mn^{2+} (0,3 mM y 0,15 mM), ABTS (500 mM y 50 mM), alcohol veratrílico (500 mM y 50 mM), vainillin (1mM y 0,5 mM), ácido caféico (0,3 mM y 0,1 mM), lignina (1 y 0,3 $g.L^{-1}$) y etanol (35 y 10%).

Para ello, se realizaron pre-cultivos en medio NMD_1, en las condiciones previamente descriptas. A las 16 h de cultivo, se tomaron muestras de los cultivos, se las centrifugó a 10.000 x g por 10 min, se las lavó dos veces con agua destilada estéril y se las resuspendió en medio NMD_1 fresco, de modo de alcanzar una DO_{550} nm = 1,6. Con estas suspensiones, se inocularon frascos de 30 mL que contenían, el inóculo (1/10 v/v), medio NDM_1, colorante Negro Reactivo 5 en concentración final 200 mg/L y los inductores en las concentraciones finales antes mencionadas, alcanzando un volumen final de reacción de 5 mL. Estos cultivos se incubaron a 25 °C y 250 rpm durante 6 horas.

Posteriormente, se tomaron muestras del sobrenadante para determinar actividad lacasa, fenol oxidasa y manganeso peroxidasa, de acuerdo a las metodologías previamente mencionadas.

Se evaluó el efecto sobre la remoción del colorante mediante la determinación del porcentaje de decoloración según la siguiente fórmula:

$$\%\text{Decoloración} = [(A_0 - A_t)/A0]*100.$$

Donde, A_0: absorbancia inicial a λ_{opt} (595 nm) y A_t: absorbancia a λ_{opt} (595 nm) a diferentes tiempos.

2.3.2. Efecto de los inductores más efectivos sobre el proceso de decoloración

En una segunda instancia, seleccionados los inductores e intermediarios más efectivos, se evaluó el efecto de los mismos en la decoloración de Negro Reactivo 5, en cultivos de 24 horas.

Los cultivos se prepararon en Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de volumen final bajo las mismas condiciones que el ensayo anterior. Se tomaron muestras a las 3, 6, 9,12 y 24 horas de cultivo y se determinó para cada punto actividad fenol oxidasa y manganeso peroxidasa, así como el porcentaje de decoloración de Negro Reactivo 5, lo que permitió obtener los perfiles enzimáticos y de decoloración a lo largo del tiempo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Decoloración y crecimiento en NDM_1 y NDM_2

Crecimiento

No se percibió inhibición en el crecimiento de *T. akiyoshidainum* HP-2023 en presencia del colorante Negro Reactivo 5 en el medio NDM_1 ni en el medio NDM_2. Los perfiles de crecimiento fueron muy similares a los del cultivo control sin colorantes en ambos casos (Figura 13).

En el caso de *T. chiarellii*, no se advirtió inhibición en el crecimiento en presencia del colorante Negro Reactivo 5 en el medio NDM_1. El peso seco en fase estacionaria y los perfiles de las curvas de crecimiento fueron similares al control sin colorantes. Pero, en el medio NDM_2 se observó una moderada inhibición del crecimiento tanto en presencia del colorante como en ausencia del mismo. (Figura 14). Cabe destacar que, según Pagnocca y colaboradores (2010), *T chiarellii* es incapaz de asimilar lactosa como fuente de carbono, sin embargo, durante este trabajo de tesis se comprobó, mediante ensayos auxonográficos, que la cepa es capaz de asimilar este azúcar, aunque lentamente. Este comportamiento, explicaría el menor crecimiento observado en medio NDM_2.

El crecimiento de *T. porosum* 4029, al igual que el de *T. akiyoshidainum* HP-2023, no se vió afectado por el colorante (Figura 15).

Decoloración

Trichosporon akiyoshidainum HP-2023, fue capaz de remover el colorante Negro Reactivo 5 (NR5) en ambos medios de cultivo, alcanzando un porcentaje de decoloración del 95% en el medio NDM_1 y del 98% en el medio NDM_2. Si bien la diferencia en los porcentajes finales de decoloración no fue significativa, se observó una mayor velocidad de decoloración en las primeras horas en el medio NDM_2, registrándose más de un 50% de decoloración a las 3 horas de cultivo (Figura 13).

En los cultivos de *T. chiarellii* en el medio NDM_1, se alcanzó un porcentaje de remoción de NR5 de 94%, valor similar a los descriptos para cultivos de *T. akiyoshidainum* HP-2023. Sin embargo, la levadura no fue capaz de remover el colorante en el medio NDM_2, posiblemente debido al pobre crecimiento de *T. chiarellii* en este medio (Figura 14).

Por su parte, en los cultivos de *T. porosum* 4029 en el medio NDM_1 se logró un 97% de remoción del colorante Negro Reactivo 5 a las 16 h de cultivo, mientras que en el medio NDM_2 sólo se alcanzó un 89% de remoción al final del ensayo (Figura 15).

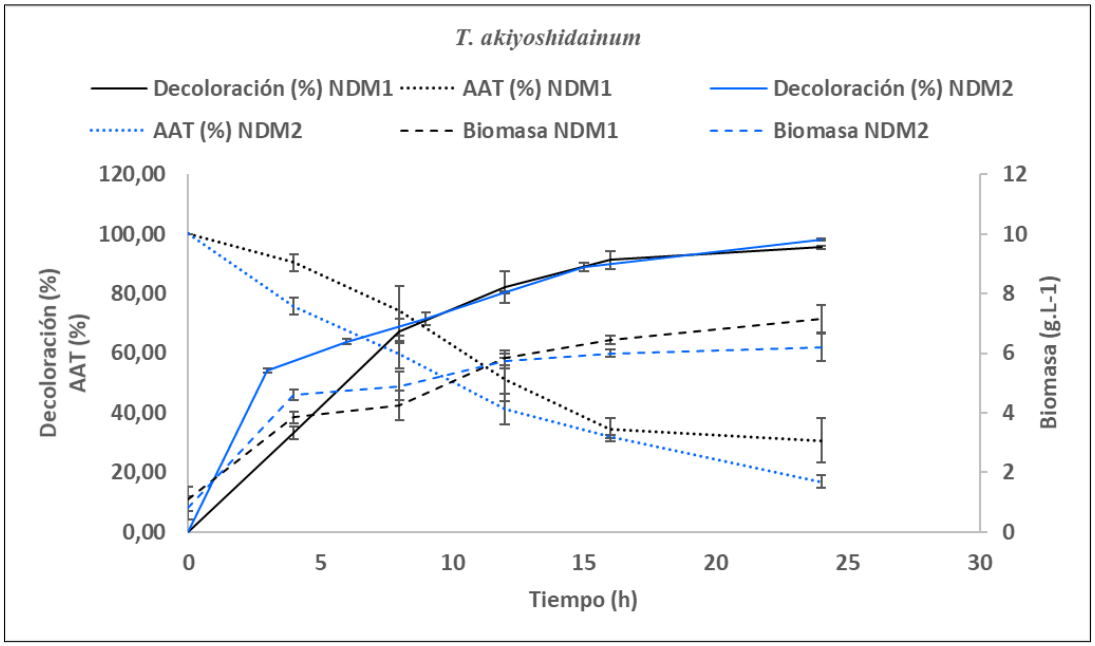


Figura 13. Cinéticas de crecimiento, decoloración y remoción de aminas aromáticas de *T. akiyoshidainum* en medio NDM_1 y NDM_2 con 200 mg L^{-1} de colorante Negro Reactivo 5 a diferentes tiempos de cultivo.

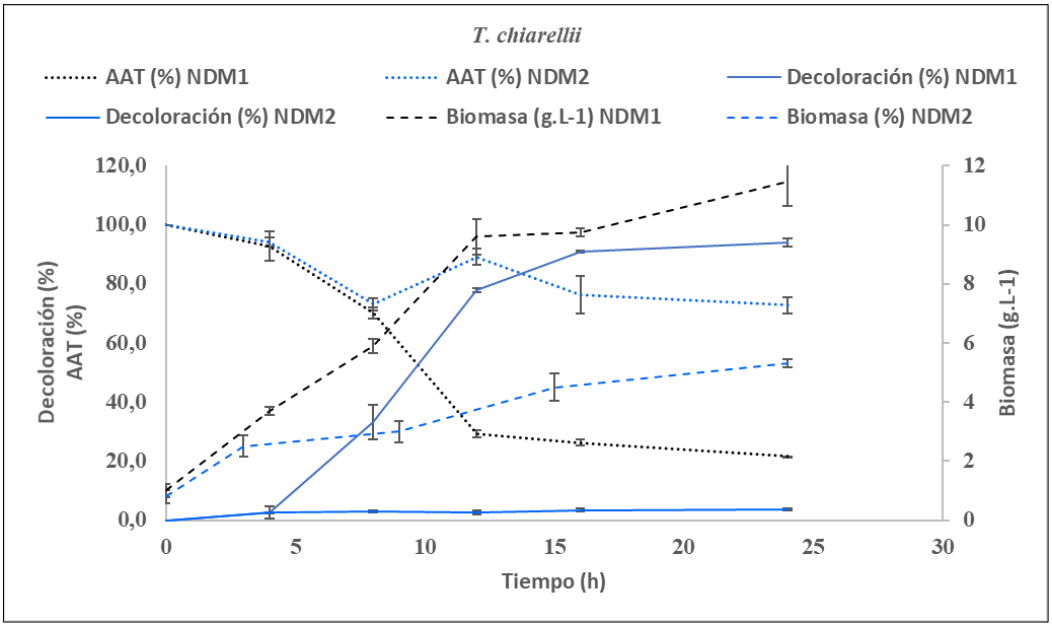


Figura 14. Cinéticas de crecimiento, decoloración y remoción de aminas aromáticas de *T. chiarellii* en medio NDM_1 y NDM_2 con 200 mg L^{-1} de colorante Negro Reactivo 5 a diferentes tiempos de cultivo.

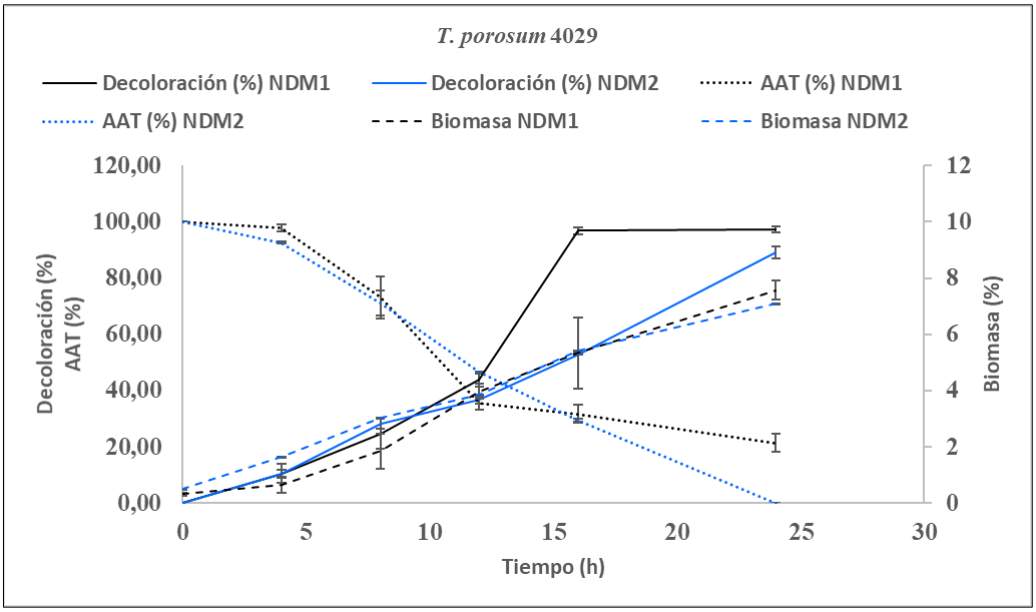


Figura 15. Cinéticas de crecimiento, decoloración y remoción de aminas aromáticas de *T. porsum 4029* en medio NDM_1 y NDM_2 con 200 mg L^{-1} de colorante Negro Reactivo 5 a diferentes tiempos de cultivo.

Estos resultados indicaron que, la decoloración de Negro Reactivo 5 por las tres especies es un proceso co-metabólico y asociado al crecimiento, donde es necesaria una fuente de carbono asimilable adicional. Hallazgos similares se reporon previamente para *T. akiyoshidainum* HP-2023 (Martorell, 2015), y para otras levaduras tanto ascomicetes como basidiomicetes incluyendo *C. oleophila*, *C. tropicalis*, *D. polymorphus*, *C. zeylanoides*, *I. occidentalis*, *I. orientalis* y *Y. liplytica*, (Martins *et al*., 1999; Ramalho *et al*., 2002; Yang *et al*., 2003; Ramalho *et al*., 2004; Yang *et al*., 2005; Lucas *et al*., 2006; Pajot *et al*., 2008;Waghmode *et al*., 2011; Aracagok *et al*., 2013; Jafari *et al*., 2014; Jafari *et al*., 2014).

Lucas y colaboradores, (2006) y Jafari y colaboradores, (2014a), encontraron una asociación evidente entre el agotamiento de glucosa en el medio y la eliminación del color con el tiempo. Es decir que, la utilización de la fuente de carbono adicional corresponde a la etapa de decoloración rápida durante la biodegradación.

Las peroxidasas extracelulares, como lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa, requiere H_2O_2 como cosustrato. Enzimas como glucosa-1-oxidasa y glucosa-2-oxidasa son responsables de la generación de H_2O_2 en diversos hongos filamentosos (Swamy *et al*., 1999), por lo que es posible que la glucosa sea el sustrato para la generación de H_2O_2 durante la decoloración por las tres especies del género *Trichosporon* estudiadas. En el caso del medio NDM_2, con lactosa como fuente de carbono, el disacárido puede ser

sustrato de enzimas como celobiosa deshidrogenasa o lactosa deshidrogenasa, lo que lleva también a la producción de H_20_2.

A su vez, la generación de H_20_2 se relaciona con la decoloración de Negro Reactivo 5 a través de reacciones de tipo Fenton. En este sentido, es importante remarcar que se describió que la celobiosa deshidrogenasa participa no solamente en la producción de H_20_2, sino también de la reducción de hierro, de manera que la utilización de lactosa como sustrato acompaña una degradación oxidativa del colorante, por un mecanismo indirecto de formación de radicales hidroxilos. (Hyde & Wood, 1997; Kremer & Wood, 1992; Harreither *et al*., 2011).

Cabe mencionar, que algunas observaciones indican que los mecanismos implicados en la remoción del colorante Negro Reactivo 5 son diferentes en ambos medios. En el medio NDM_1 se observó que, al finalizar el proceso de decoloración, la biomasa de las tres levaduras se encontraba coloreada, indicando la participación de un mecanismo de adsorción. En cambio, en el medio NDM_2 solamente está involucrado un mecanismo de degradación enzimático, ya que ni la biomasa de *T akiyoshidainum* HP-2023 ni la de *T. porosum* quedaron teñidas al final de los ensayos. En este sentido, el descenso de pH registrado en los cultivos en NDM_1, a medida que progresa la decoloración, explica la adsorción del colorante a la biomasa.

En cultivos *de T. akiyoshidainum* HP-2023 en NDM_2, la urea usada como fuente de nitrógeno permite tamponar los cultivos, impidiendo la adsorción del colorante a la biomasa (Martorell *et al*., 2017). Sin embargo, en los cultivos de *T. porosum* en NDM_2 se registró una fuerte caída del pH, similar a la notada en NDM_1. A pesar de ello, la biomasa de la levadura no resultó coloreada al final del ensayo, sugiriendo la participación de un mecanismo de degradación en la decoloración del medio.

3.2. Aminas Aromáticas Totales (AAT)

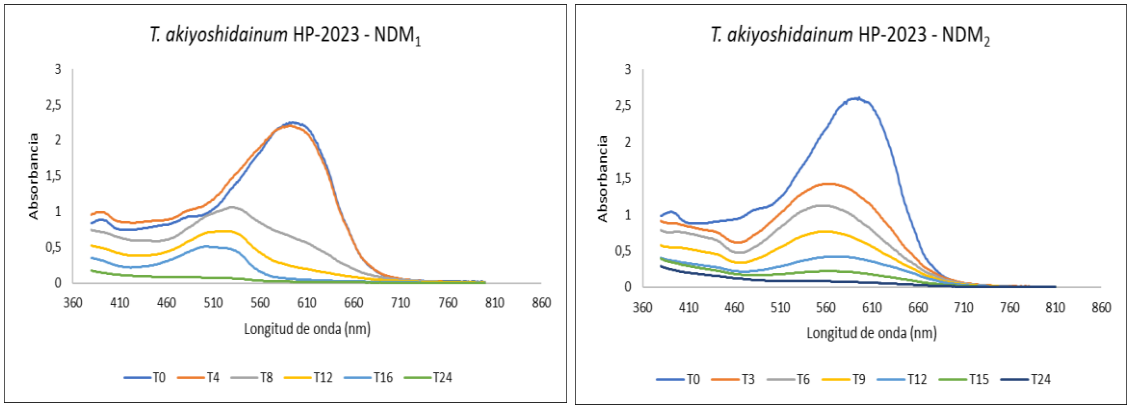
En las Figuras 13, 14 y 15, se pueden ver los perfiles de aminas aromáticas totales (AAT), obtenidos para las tres especies en los distintos medios y tiempos de cultivo. En todos los casos, se observa que la disminución de AAT está relacionada directamente con la remoción del colorante del medio de cultivo.

Los procesos de degradación reductiva de colorantes aromáticos azoicos, como los reportados en bacterias y en muchas levaduras ascomicetáceas, conducen a la acumulación de aminas aromáticas en el medio de cultivo, por lo que los resultados

obtenidos, apoyan la teoría de una degradación oxidativa, proceso generalmente relacionado a hongos basidiomicetos.

3.3. Espectros de absorbancia en la región UV-visible

En la Figura 16 se aprecian los espectros de absorbancia en el rango 360-800 nm de los sobrenadantes de los cultivos de *T. akiyoshidainum HP*- 2023 en los medios NDM_1 y NDM_2 con Negro Reactivo 5, a tiempo inicial y a las 4, 8, 12, 16 y 24 h de incubación.

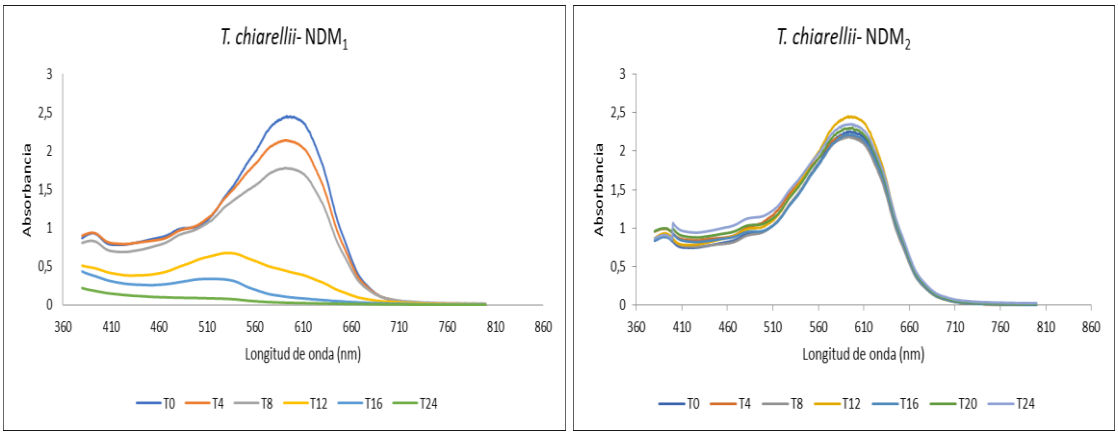


A) B)

Figura 16. Espectro de absorción entre 360 y 800 nm de los sobrenadantes de cultivo a tiempo inicial, 4, 8, 12, 16 y 24 h de cultivo de *T. akiyoshidainum* HP 2023 en medio A) NDM_1 con 200 mg L-1 de Negro Reactivo 5 y B) NDM_2 con 200 mg L^{-1} de Negro Reactivo 5.

Se percibió que a las 4 h de cultivo en el medio NDM_2 y a las 8 h de cultivo en el medio NDM_1 los valores de absorbancia en el rango analizado disminuyeron considerablemente en la zona de 595 nm, responsable del color. Además, se notó un corrimiento del máximo del pico de 595 a 560 nm indicando la participación de un mecanismo degradativo.

En la Figura 17 se pueden ver los espectros correspondientes a los cultivos de *T. chiarellii*, tanto en medio NDM_1 como en NDM_2 con Negro Reactivo 5, a las 0, 4, 8, 12, 16 y 24 h de incubación.

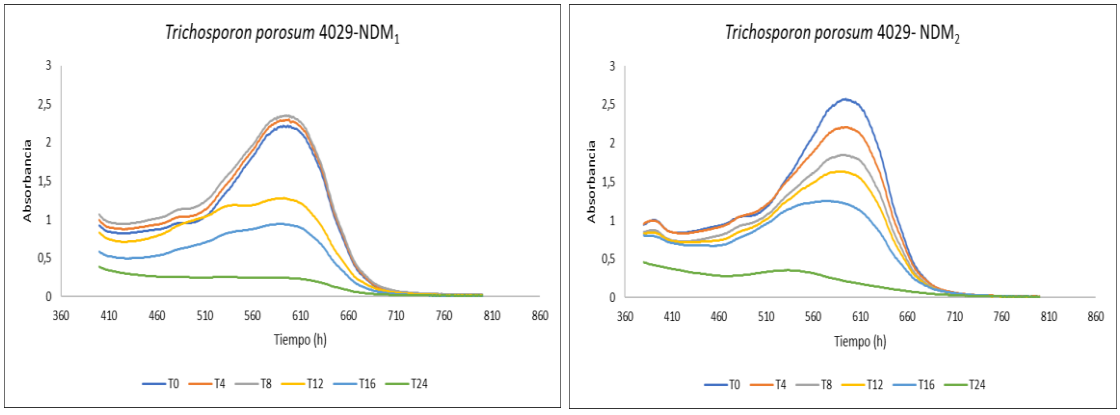


A) B)

Figura 17. Espectro de absorción entre 360 y 800 nm de los sobrenadantes de cultivo a tiempo inicial, 4, 8, 12, 16 y 24 h de cultivo de *T. chiarellii* en medio a) NDM_1 con 200 mg L-1 de Negro Reactivo 5 y b) NDM_2 con 200 mg L-1 de Negro Reactivo 5.

En el medio NDM_1 a las 12 h de cultivo los valores de absorbancia en el rango analizado experimentaron una disminución considerable en la zona de 595 nm. Al igual que en *T. akiyoshidainum* HP-2023 se observó un corrimiento del máximo del pico de 595 a 560 nm, indicando también la degradación parcial del colorante. En medio NDM_2 no se produjo ninguna decoloración, lo que se ve reflejado en los espectros obtenidos que se mantienen similares a los controles durante todo el ensayo.

En la Figura 18 se muestran los espectros correspondientes a *T. porosum* 4029.



A) B)

Figura 18. Espectro de absorción entre 360 y 800 nm de los sobrenadantes de cultivo a tiempo inicial, 4, 8, 12, 16 y 24 h de cultivo de *T. porosum* 4029 en medio a) NDM_1 con 200 mg L-1 de Negro Reactivo 5 y b) NDM_2 con 200 mg L-1 de Negro Reactivo 5.

En medio NDM_1, al igual que en los cultivos de *T. chiarellii*, recién a las 12 horas de cultivo se apreció una disminución considerable del pico de absorbancia máxima del colorante Negro Reactivo 5, observándose además un ensanchamiento del pico y la aparición de un segundo pico a menores longitudes de onda (alrededor de 530 nm). Por otro lado, en el medio NDM_2 se observó una disminución progresiva del pico de absorbancia máxima, y recién a las 16 horas de cultivo se notó claramente el corrimiento del pico a una menor longitud de onda.

En primer lugar, el análisis espectral confirma la remoción del colorante Negro Reactivo 5 por *T. akiyoshidainum* HP-2023 y *T. porosum* 4029 en el medio NDM_1 y NDM_2, y de *T. chiarellii* en el medio NDM_1, ya que la el pico de absorbancia asociado al colorante Negro Reactivo 5 (595 nm) desaparece completamente al finalizar el proceso.

Por otro lado, teniendo en cuenta que la decoloración del colorante se produce cuando el centro cromóforo del colorante se rompe (Kaushik & Malik, 2009), se infiere que el corrimiento observado del pico de absorbancia en los espectros de *T.akiyoshidainum*, *T. chiarellii* y *T. porosum* se debe a la ruptura de uno de los enlaces azoicos de la molécula de Negro Reactivo 5, lo que causa un cambio de color en los sobrenadantes de cultivo, que pasan de un color azul oscuro a violeta, antes de perder totalmente el color como consecuencia de la ruptura del segundo enlace azoico de la molécula de colorante. La decoloración en dos etapas se explica por diferencias en la reactividad de los dos enlaces azoicos de la molécula de colorante. Esta diferencia se atribuye a la presencia de los grupos aminos ($-NH_2$) e hidroxilos (-OH) en la posición orto con respecto a cada enlace azoico ya que estos sustituyentes participan en la sustitución electrofílica aromática en el doble anillo de naftaleno (Enayatizamir *et al*., 2011).

La decoloración, ya sea por un mecanismo oxidativo o reductivo, se realiza en dos etapas e implica en primer lugar la ruptura de un enlace azoico y la formación de un intermediario color púrpura, y en una segunda etapa la ruptura del segundo enlace azoico con la pérdida total del color (Martorell *et al*., 2017).

Este cambio o corrimiento del pico fue observado también por Enayatizamir y colaboradores (2011) en la decoloración de este colorante por *P. chrysosporium*, donde a las 10 h de cultivo se observó una coloración púrpura en el sobrenadante, la que fue disminuyendo hasta una decoloración total a las 48 h. Supaka y colaboradores (2004) percibieron lo mismo al trabajar con un consorcio bacteriano, al igual que Lucas y colaboradores (2006) en *C. oleophila*, Pearce y colaboradores (2006) en *Shewanella sp*.,

Chen (2002) en *P. luteola*, Mohorcic y colaboradores. (2004) en *Bjerkandera adusta*, Mazmanci y Ünyayar (2010) en *Funalia trogii* y Ramsay y Nguyen (2002) en *T. versicolor*.

La desaparición del color y la disminución de la absorbancia, junto con la ausencia de color en la biomasa permiten diferenciar los procesos de bioadsorción y biodegradación (Yang *et al*., 2003, 2005, 2013). De esta manera, el proceso de remoción del colorante azoico Negro Reactivo 5 por *T. akiyoshidainum* HP-2023 y *T. porosum* 4029 en el medio NDM_2, es un proceso degradativo; sin embargo, no se puede descartar una unión transitoria del colorante a la biomasa antes de ser degradado. En cambio, en el medio NDM_1, la coloración de la biomasa junto con el corrimiento del pico máximo de absorbancia observado en el espectro, tanto en el caso de *Trichosporon akiyoshidainum* HP-2023, como en los de *Trichosporon chiarelli* y *T. porosum* 4029 demuestran que ambos procesos (adsorción y degradación) ocurren simultáneamente en este medio.

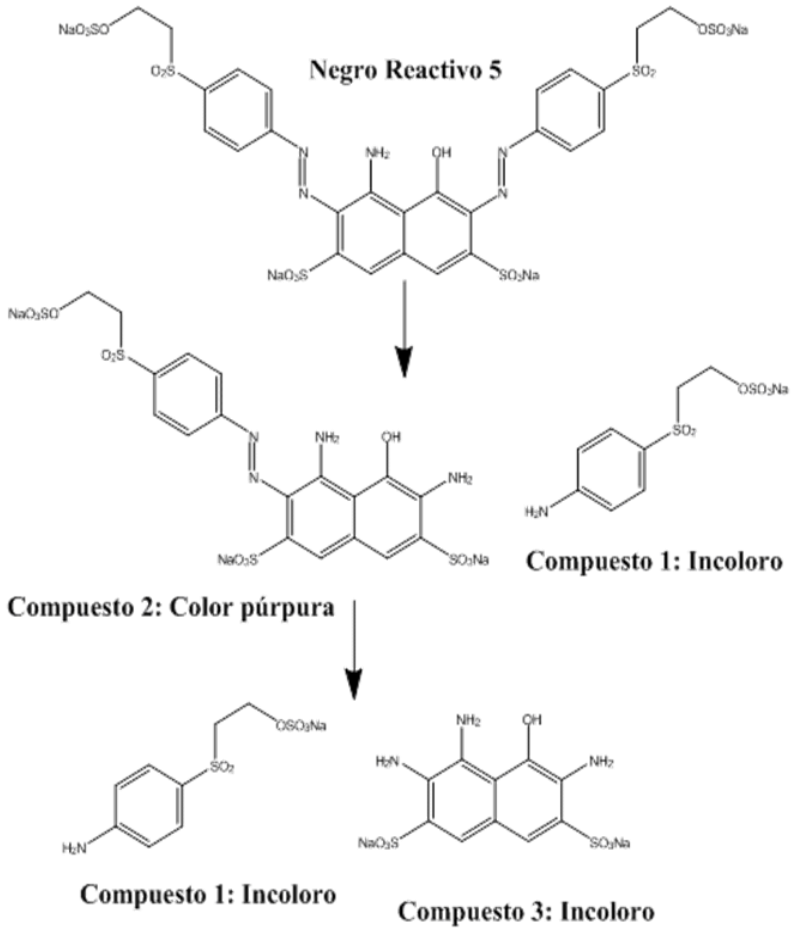


Figura 19. Mecanismo reductivo de decoloración en dos etapas para Negro Reactivo 5 propuesto por Chen y colaboradores (2002) en bacterias.

3.3. Actividades enzimáticas

Las actividades enzimáticas se controlaron durante el cultivo de las tres especies en medio NDM_1 y NDM_2 adicionados con 200 mg L^{-1} de Negro Reactivo 5, y en sus respectivos controles sin colorante.

Al igual que lo determinado previamente para *T. akiyoshidainum* HP-2023, se detectaron actividades peroxidasas y fenol oxidasa tanto en el medio NDM_1 (Pajot *et al.*, 2009) como en el medio NDM_2 (Martorell *et al.*, 2017), con títulos de actividad ligeramente superiores en el medio NDM_2. Resultados similares fueron obtenidos para *T. porosum* 4029, donde se detectaron actividades peroxidasa y fenol oxidasa en ambos medios, pero con títulos superiores en el medio NDM_2. Se detectaron también estas actividades enzimáticas en los sobrenadantes de cultivo del medio NDM_1 de *T. chiarelli*, mientras que no fue posible determinar ninguna actividad en el medio NDM_2.

Cabe destacar que estas actividades enzimáticas son inducibles, ya que solo pudieron medirse en los sobrenadantes de los cultivos con colorante.

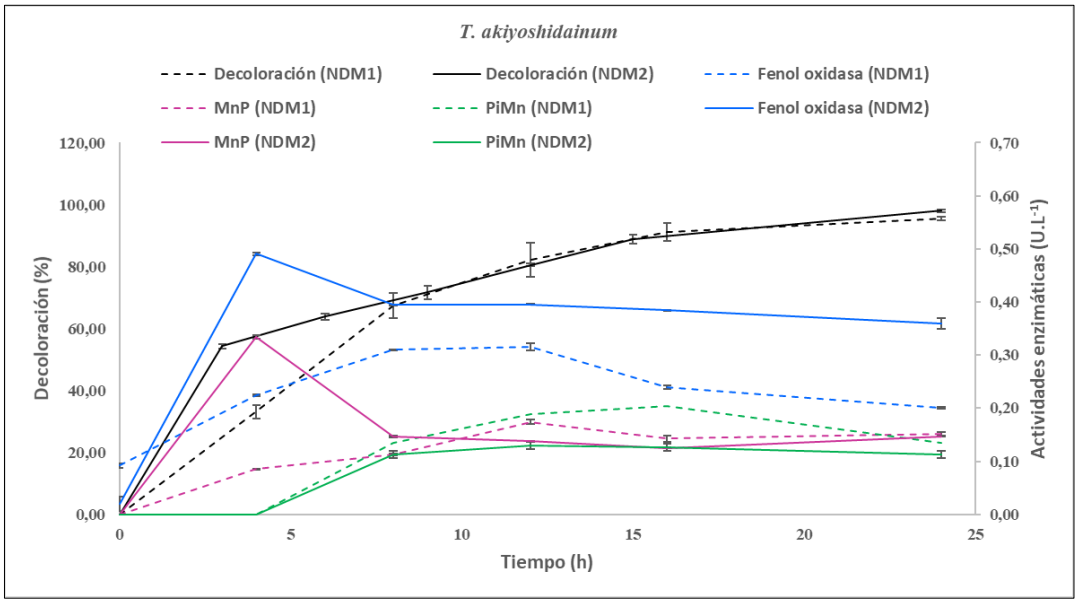


Figura 20. Perfiles de actividad enzimática: manganeso peroxidasa (MnP), peroxidasa independiente de manganeso (PiMn) y fenol oxidasa, y perfil de decoloración para *T. akiyoshidainum* HP-2023 en los medios NDM_1 y NDM_2.

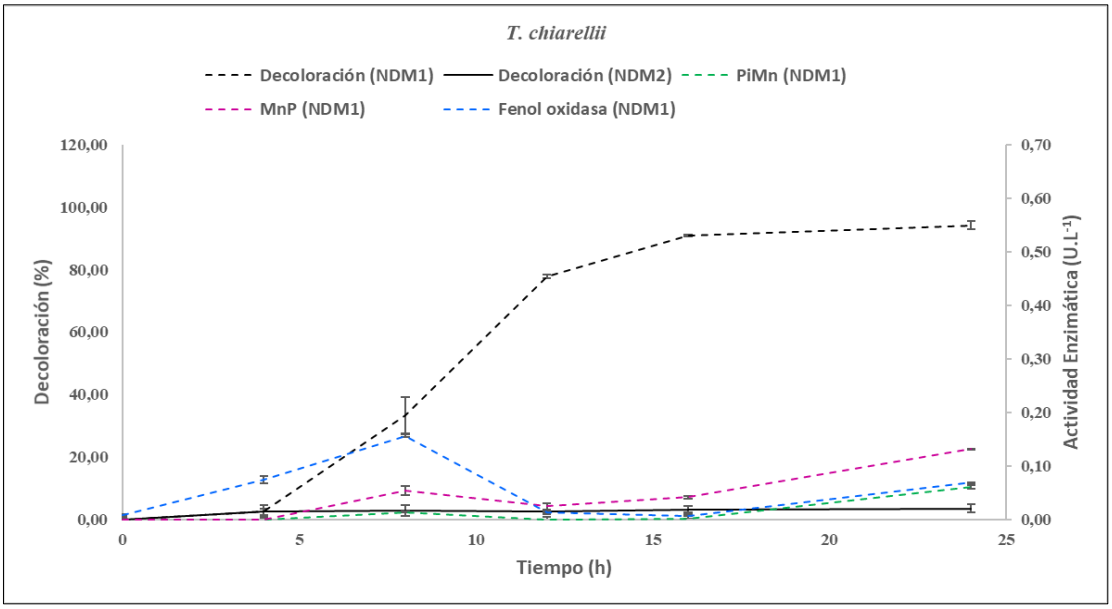


Figura 21. Perfiles de actividad enzimática: manganeso peroxidasa (MnP), peroxidasa independiente de manganeso (PiMn) y fenol oxidasa, y perfil de decoloración para *T. chiarellii* en el medio NMD_1.

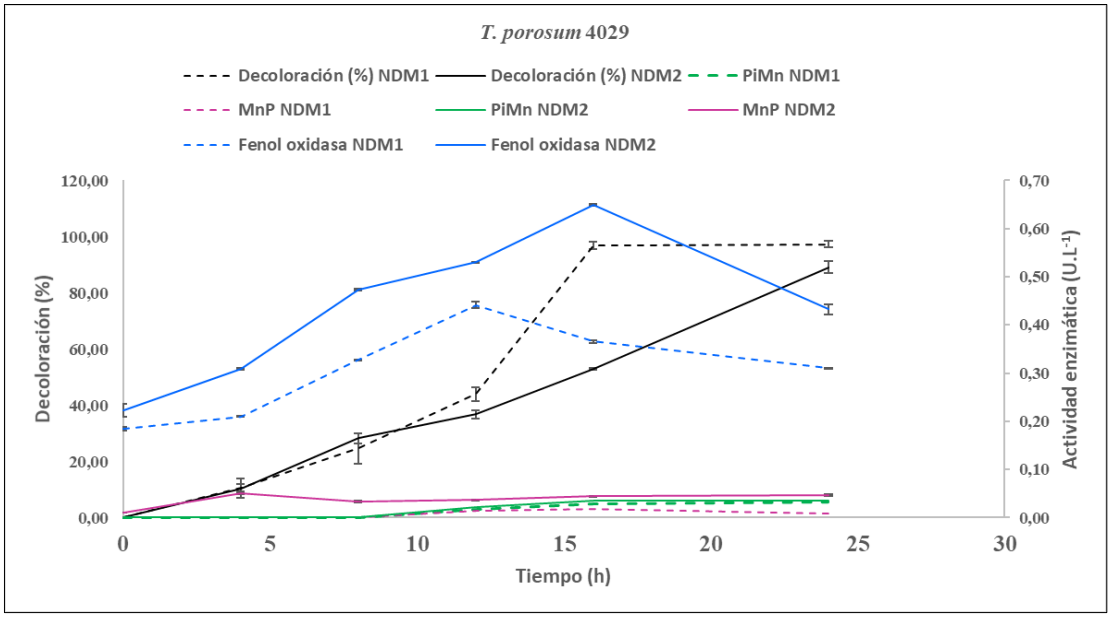


Figura 22. Perfiles de actividad enzimática: manganeso peroxidasa (MnP), peroxidasa independiente de manganeso (PiMn) y fenol oxidasa, y perfil de decoloración para *T. porosum* 4029 en el medio NMD_1.

Actividades peroxidasa

En *T. akiyoshidainum* HP-2023 se notó un aumento progresivo de la actividad manganeso peroxidasa (MnP) a lo largo del cultivo en el medio NDM_1, llegando a un

máximo de actividad de 0,17 UL^{-1} a las 12 h, que se mantuvo prácticamente constante hasta las 24 h. Se determinó un aumento progresivo a partir de las 4 h de cultivo de la actividad peroxidasa independiente de manganeso (PiMn), se obtuvo la máxima actividad de 0,20 UL^{-1} a las 16 h. En el medio NDM_2 se observó un perfil enzimático diferente, con un pico de actividad máxima de manganeso peroxidasa a las 4 h de cultivo de 0,33 UL^{-1}, el cual posteriormente disminuyó hasta las 6 horas para luego mantenerse constante, con valores similares a los encontrados para esos tiempos en el medio NDM_1. El aumento de la actividad manganeso peroxidasa hasta alcanzar el máximo de actividad coincide con la máxima velocidad de decoloración que se observó en el medio NDM_2, que corresponde a las primeras 3 horas de cultivo. En cuanto a la actividad peroxidasa independiente de manganeso, esta mostró un perfil enzimático similar al determinado en el medio NDM_1.

En los cultivos de *T. chiarellii* en el medio NDM_1 se reconoció un pico de actividad manganeso peroxidasa (MnP) a las 8 h de cultivo de 0,05 UL^{-1}, con una disminución gradual hasta las 12 h, para posteriormente aumentar progresivamente hasta el final de cultivo, período en el cual se convierte en la principal actividad enzimática determinada, alcanzando 0,13 UL^{-1}. También se determinó actividad peroxidasa independiente de manganeso (PiMn) con un perfil similar al descripto para la enzima manganeso peroxidasa, pero con títulos aún más pequeños. Los valores de actividad peroxidasa determinados en los cultivos de *T. chiarelli* fueron inferiores, en todos los casos, a los encontrados en los cultivos de *T. akiyoshidainum* HP-2023.

Por otra parte, en los cultivos de *T. porosum* 4029, en el medio NDM_1 recién a partir de las 10 horas se detectaron las actividades manganeso peroxidasa (MnP) y peroxidasa independiente de manganeso (PiMn), las que se mantuvieron prácticamente constantes, desde las 12 horas y hasta terminar el proceso de decoloración, entre 0,03 y 0,04 $U.L^{-1}$. En el medio NDM_2 se detectó un pequeño pico de actividad de manganeso peroxidasa durante las primeras de decoloración, alcanzando las 0,05 UL^{-1}, pero los títulos de actividad se mantuvieron constantes hasta finalizar el proceso. La actividad peroxidasa independiente de manganeso tuvo un perfil similar al encontrado en el medio NDM_1, siendo detectada después de las 8 horas de decoloración.

En ausencia de H_2O_2, independientemente de la presencia o ausencia de Mn, no se detectó actividad enzimática.

Estos resultados concuerdan con los reportados por Martorell y colaboradores (2017) quienes propusieron la hipótesis de una peroxidasa versátil en los sobrenadantes de cultivo de *T. akiyoshidainum* HP 2023. Aunque con títulos inferiores, los perfiles

similares determinados para *T. chiarellii* en el medio NDM_1 y para *T. porosum* 4029 en el medio NDM_2, nos animan a extender la hipótesis a estos microorganismos. A su vez, Rodriguez- Bustamante y colaboradores (2009) purificaron una peroxidasa extracelular de *Trichosporon asahii* que presentó homología con la peroxidasa versátil de *P. eryngii*, sugiriendo que esta peroxidasa puede ser una proteína conservada en el género *Trichosporon*. En apoyo a esta hipótesis, Camarero y colaboradores (1999) informaron que la peroxidasa versátil de *Pleurotus eryngii* presenta mayor actividad en presencia de Mn, característica consistente con los perfiles enzimáticos encontrados para *T. chiarelli* y *T. porosum* 4029. Lo mismo fue reportado para la peroxidasa versátil de *Pleurotus ostreatus*, cuya actividad es menor en ausencia de Mn^{2+} (Golan-Rozen *et al*., 2011).

Actividad Fenol Oxidasa

Los perfiles de actividad fenol oxidasa en los cultivos de *T. akiyoshidainum* HP-2023 en los medios NDM_1 y NDM_2 fueron diferentes entre sí. En el medio NDM_1 se determinó la máxima actividad fenol oxidasa entre las 8 y 12 horas de cultivo con títulos de hasta 0,32 UL^{-1}. En el medio NDM_2 se observó un marcado pico de actividad fenol oxidasa a las 4 horas de 0,50 UL^{-1}, disminuyendo ligeramente hasta las 8 horas. A partir de entonces los títulos se mantuvieron constantes (alrededor de 0,40 UL^{-1}), presentando en general, un perfil similar al observado de actividad manganeso peroxidasa, para esta levadura. En todos los casos, los títulos de actividad fenol oxidasa medidos en NDM_1 fueron inferiores a los medidos en NDM_2.

En el caso de los cultivos de *T. chiarellii*, (sólo en medio NDM_1) se observó un pico de actividad fenol oxidasa a las 8 horas de 0,16 UL^{-1}, coincidiendo con la etapa de mayor velocidad de decoloración, posteriormente los títulos de la actividad descendieron hasta las 12 horas, momento a partir del cual se mantuvieron constantes.

Para *T. porosum* 4029, también se observó que los títulos de actividad fenol oxidasa son mayores a los valores determinados para actividades peroxidasas. En el medio NDM_1 la actividad fenol oxidasa aumentó a partir de las 3 horas alcanzando un máximo de 0,44 UL^{-1} a las 12 horas, que disminuyó gradualmente hasta las 24 horas. Por otra parte, en NDM_2 la actividad aumentó progresivamente hasta las 16 horas de decoloración, alcanzando un máximo de 0,65 UL^{-1}, y luego decayó. Debe destacarse que en el medio NDM_2 los títulos de actividad fenol oxidasa fueron mayores que los obtenidos en NDM_1, a lo largo de todo el proceso de decoloración.

Independientemente de la especie considerada, la actividad lacasa, medida por oxidación de ABTS en ausencia de H_2O_2, no fue detectada en ninguna de las condiciones ensayadas.

Tirosinasas (EC 1.14.18.1), lacasas (EC 1.10.3.2) y catecolasas (EC 1.10.3.1) son fenol oxidasas con Cu en sus centros activos y con capacidad de reducir O_2 a H_2O. Estas enzimas comparten una gran variedad de sustratos, lo que hace prácticamente imposible distinguir entre ellas, a menos que se realice su purificación previa y un estudio de afinidad de la enzima por diferentes sustratos fenólicos (Rahouti *et al*., 1995, Burke & Cairney, 2002

La mayoría de los métodos para medir la actividad fenol oxidasa presentan serios inconvenientes, tales como la necesidad de emplear altas concentraciones de ácido ascórbico, poca sensibilidad o la existencia de períodos de latencia en las determinaciones. Por esto, Rodríguez-López *et al*., (1993) propusieron el método de medición empleado en este trabajo que consistió en la reacción entre 3-metil-2-benotiazolinona hidrazona (MBTH) y orto-quinonas producidas por la enzima a partir de diferentes sustratos fenólicos. Mediante el empleo de este mismo método, Martorell (2017), demostró que la actividad fenol oxidasa, determinada en los sobrenadantes de cultivo de *T. akiyoshidainum* HP-2023 en presencia del colorante Negro Reactivo 5, era baja en presencia de tirosina, por lo que se concluyó que no se trataba de una enzima tirosinasa, ya que la alta afinidad por este sustrato es uno de los rasgos bien establecidos que diferencian tirosinasas de lacasas y catecolasas (Dawley & Flurkey, 1993; Rahouti *et al*., 1995; Baldrian, 2006).

Efecto de la capacidad antioxidante del medio en la determinación de la actividad enzimática lacasa

Los ensayos de actividad antioxidante realizados con los sobrenadantes de medios de cultivo de *T. akiyoshidainum* HP-2023 y la lacasa purificada de *T. versicolor*, demostraron que el poder reductor de los sobrenadantes, interfiere en la detección de lacasas por el método del ABTS. Este efecto impidió cuantificar la enzima por debajo de las 0,70 UL^{-1}, títulos que pueden detectarse sencillamente en reacciones sin sobrenadantes. Estos resultados corroboraron los resultados de Collins y colaboradores (1998). La falta de actividad sobre ABTS, no fue suficiente para concluir que la actividad fenol oxidasa detectada en los cultivos de las tres especies de levadura no corresponde a

una enzima de tipo lacasa. Es posible que la presencia de ciertos ácidos orgánicos como oxálico, malónico y glioxálico, reduzcan el radical ABTS ($ABTS^{\bullet+}$) a su forma original (ABTS) impidiendo así determinar la actividad lacasa utilizando este reactivo.

Actividad Azo-reductasa

A diferencia de lo reportado por Saratale y colaboradores (2009) para *T. beigellii* en la degradación del colorante azoico Azul Marino HER, donde se informó un significativo incremento de actividad azo-reductasa (706%) durante el proceso de decoloración, en este trabajo, no se determinó actividad azo-reductasa en ninguna de las condiciones ensayadas.

Actividad Hierro Reductasa

Se observó un aumento marcado en la actividad hierro reductasa en los cultivos de *T. akiyoshidainum* HP-2023 en presencia del colorante Negro Reactivo 5 tanto en el medio NDM_1 como en el medio NDM_2. En la Figura 23.A, se observa que en el medio NDM_1 comienza a registrarse actividad a partir de las 3 horas de cultivo, aumentando hasta las 15 horas. A partir de ese momento, los títulos se mantuvieron prácticamente constantes y con títulos en promedio 80% superiores a los medidos en los medios correspondientes sin colorantes. En el medio NDM_2 (Figura 23. B), también comenzó a registrarse un aumento de actividad hierro reductasa a partir de las 3 horas de cultivo y hasta finalizar el proceso en el medio con colorante. Se alcanzó un título seis veces superior al medio sin colorante a las 12 horas de cultivo y finalizó con una actividad tres veces superior a la condición control.

También se determinó esta actividad enzimática en los sobrenadantes de cultivo del medio NDM_1 de *T. chiarellii*. La actividad hierro reductasa medida a las 15 horas de cultivo en medios con colorante fue doble de la medida en los medios control, sin colorantes; y se mantuvo en valores similares hasta el fin de los cultivos.

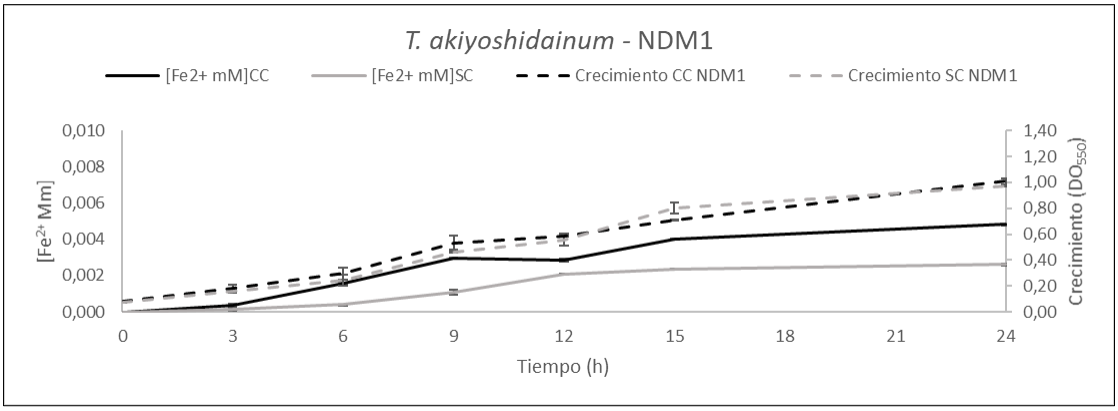
No fue posible determinar actividad hierro reductasa en las otras condiciones en estudio.

Se reportó que en la levadura ascomicetacea *S. cerevisiae* el sistema hierro reductasa de membrana plasmática, es el componente principal del sistema catalítico azo-redutasa y participa en la degradación extracelular del colorante azoico ácido m-[(4-

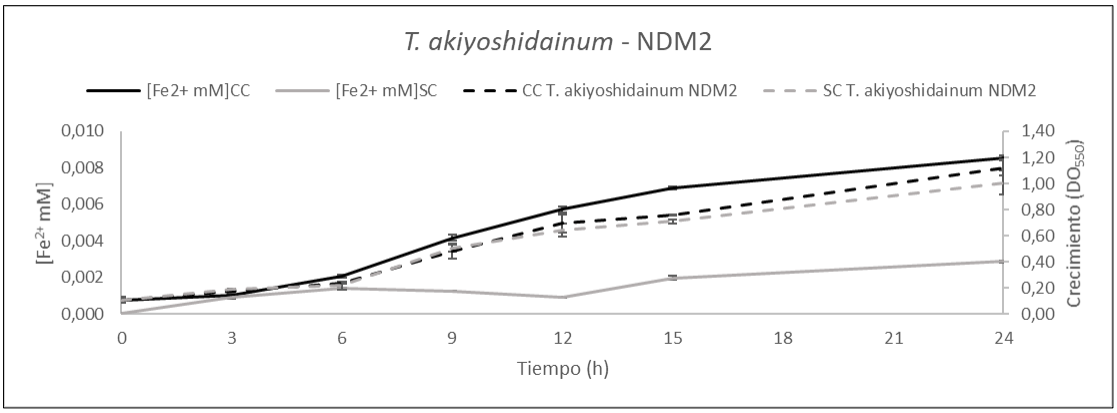
dimetilamino)fenilazo] bencenosulfónico, (Ramalho *et al*., 2005). Tanto en *T.akiyoshidainum* HP-2023 como en *T. chiarelli*, se puede descartar este papel, debido a que durante el proceso de decoloración del colorante Negro Reactivo 5, se evidenció una disminución de las aminas aromáticas en los medios de cultivo y no hubo evidencia de actividad azo-reductasa en las condiciones ensayadas.

Por otro lado, la actividad hierro reductasa, además de participar en la homeostasis celular, ha sido asociada a la degradación oxidativa de compuestos aromáticos, proporcionando Fe^{2+}, involucrado en la generación de radicales hidroxilos por reacciones Fenton (Martinez *et al*., 2009; Marco-Urrea *et al.*, 2009a, 2009b). Este rol adjudicado a enzimas hierro reductasas, puede explicar su participación en la decoloración del colorante Negro Reactivo 5 en los microorganismos en estudio.

A.



B.



C.

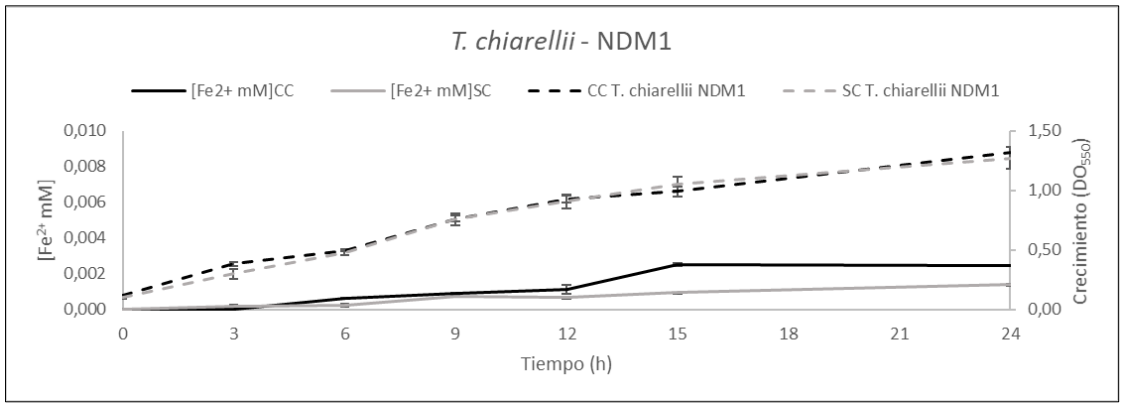


Figura 23. Perfil de actividad hierro reductasa y crecimiento en presencia (CC) y ausencia (SC) del colorante azoico Negro Reactivo 5. **A**. *T. akiyoshidainum* HP-2023, en el medio NDM_1. **B**. *T. akiyoshidainum*, en el medio NDM_2. **C**. *T. chiarelli*, en el medio NDM_1

Actividad de oxidasas productoras de peróxido

Las enzimas productoras de H_2O_2 desempeñan un rol esencial en la decoloración de colorantes a través de una eficiente red de reacciones redox. Estas enzimas proporcionan el H_2O_2, indispensable tanto para diversas peroxidasas implicadas en la degradación de colorantes azoicos y otros compuestos aromáticos, como para la química Fenton.

La participación, tanto de peroxidasas como de reacciones no enzimáticas de tipo Fenton, en la degradación del colorante azoico Negro Reactivo 5, estarían sustentadas por una mayor actividad de oxidasas productoras de peróxido en el medio con colorante. Sin embargo, no fue posible determinar la producción de peróxido de hidrógeno en ninguna de las condiciones ensayadas mediante la técnica empleada.

A pesar de los resultados obtenidos, no se descarta la posible participación de este tipo de enzimas en el proceso de decoloración, ya que la detección de actividades peroxidasas nos indica la necesidad indefectible de producción de este compuesto en el medio extracelular. Es evidente la necesidad del empleo de otras técnicas más adecuadas para su cuantificación y mejor análisis.

3.4. Efecto de diferentes metales e intermediarios redox sobre la decoloración de Negro Reactivo 5 y actividades enzimáticas

Ciertos iones metálicos, mediadores de bajo peso molecular y algunos compuestos aromáticos relacionados con la lignina y/o derivados de su degradación actúan como inductores de enzimas ligninolíticas relacionadas con la degradación enzimática oxidativa de colorantes azoicos (Ulmer *et al*., 1984; Faison *et al*., 1985; Leisola *et al*.,1984; Bollag & Leonowicz 1984, Galhaup *et al*.,2003; Ikehata *et al*., 2004; Shah *et al*., 2010; Fonseca *et al*., 2014; Vrsanska *et al.,* 2016).

En un proceso de decoloración mediado por enzimas, una mayor actividad enzimática garantiza una mayor y más rápida transformación del sustrato diana, mejorando la aplicabilidad y la eficacia de los procesos de decoloración (Rao *et al*., 2014; Vrsanska *et al*., 2016).

Teniendo esto en mente, se evaluó el efecto de la adición de Cu^{2+} y etanol, (inductores de Cu oxidasas como las lacasas, tirosinasas y catecolasas), Fe^{2+} (inductor de hierro reductasas y enzimas involucradas en la homeostasis del hierro), Mn^{2+} (inductor de Mn Peroxidasas), alcohol veratrílico, lignina y ácido cafeico (inductores de MnP, LiP y VP) y ABTS y vainillin, (mediadores redox de lacasa y LiP, respectivamente), durante el proceso de decoloración de Negro Reactivo 5 llevado a cabo con *T. akiyoshidainum* HP-2023.

Se observó que Mn^{2+}, Fe^{2+}, Cu^{2+}, lignina, alcohol veratrílico y vainillin indujeron efectivamente algunas de las actividades enzimáticas medidas. Además, se comprobó que el efecto fue dependiente de la concentración del compuesto ensayado. Sin embargo, a pesar de las inducciones registradas de las actividades enzimáticas el porcentaje de decoloración de Negro Reactivo 5, a las 6 horas de inducción, no fue superior al medido en los medios control, sin inductores ni mediadores. Se registraron incluso porcentajes menores de decoloración en algunos casos como en los medios con Cu^{+2}, lignina y etanol (Figura 24). Se puede observar una disminución con respecto al control del 25%, 22% y 56% en los porcentajes de decoloración alcanzados con las concentraciones ensayadas más elevadas de estos compuestos, 0,5 mM de Cu^{2+}, 0,1% de lignina y 35% de etanol respectivamente.

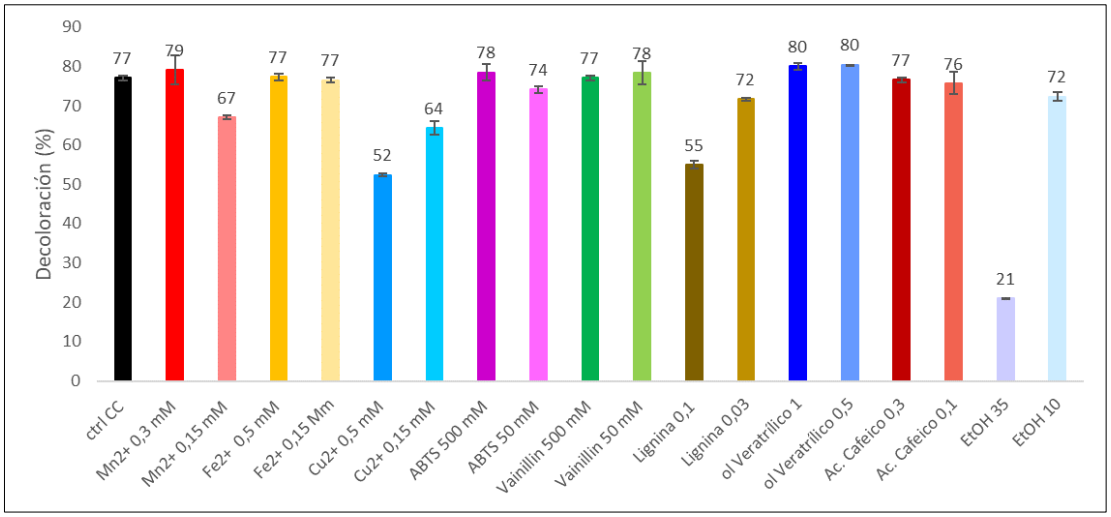


Figura 24. Porcentajes de decoloración alcanzados a las 6 horas para cada condición ensayada.

Efecto de los inductores y mediadores sobre la Actividad fenol oxidasa

Durante el proceso de decoloración de Negro Reactivo 5 llevado a cabo con *T.akiyoshidainum* HP-2023 no fue posible determinar, con la técnica empleada, actividad lacasa en ninguna de las condiciones ensayadas, como tampoco en el medio control con colorante y sin inductores. Sin embargo, se determinó inducción de la actividad fenol oxidasa en medios con Mn^{2+}, vainillin, lignina y alcohol veratrílico, en las dos concentraciones ensayadas. Con respecto al control solo con colorante Negro Reactivo 5, se registraron aumentos de 242% y 253% de la actividad fenol oxidasa con 0,3 mM y 0,15 mM de Mn^{2+} respectivamente. Se obtuvo un incremento de 135% y 89% con el agregado de 500 mM y 50 mM vainillin, respectivamente; mientras que el agregado de lignina produjo un aumento de 228% (0,1% de lignina) y 265% (0,03% de lignina) de la actividad fenol oxidasa registrada. El alcohol vertrílico produjo un aumento de un 190% en la actividad fenol oxidasa, en ambas concentraciones ensayadas (1% y 0,5%). Estos compuestos fueron reportados previamente por diversos autores como inductores de actividad fenol oxidasa (Leisola *et al*.,1984; Ikehata *et al*. 2004; Fonseca *et al*., 2014). En la Figura 25 se comparan los valores de actividades enzimáticas cuantificados a las 6 horas de inducción, con los del control sin inductor.

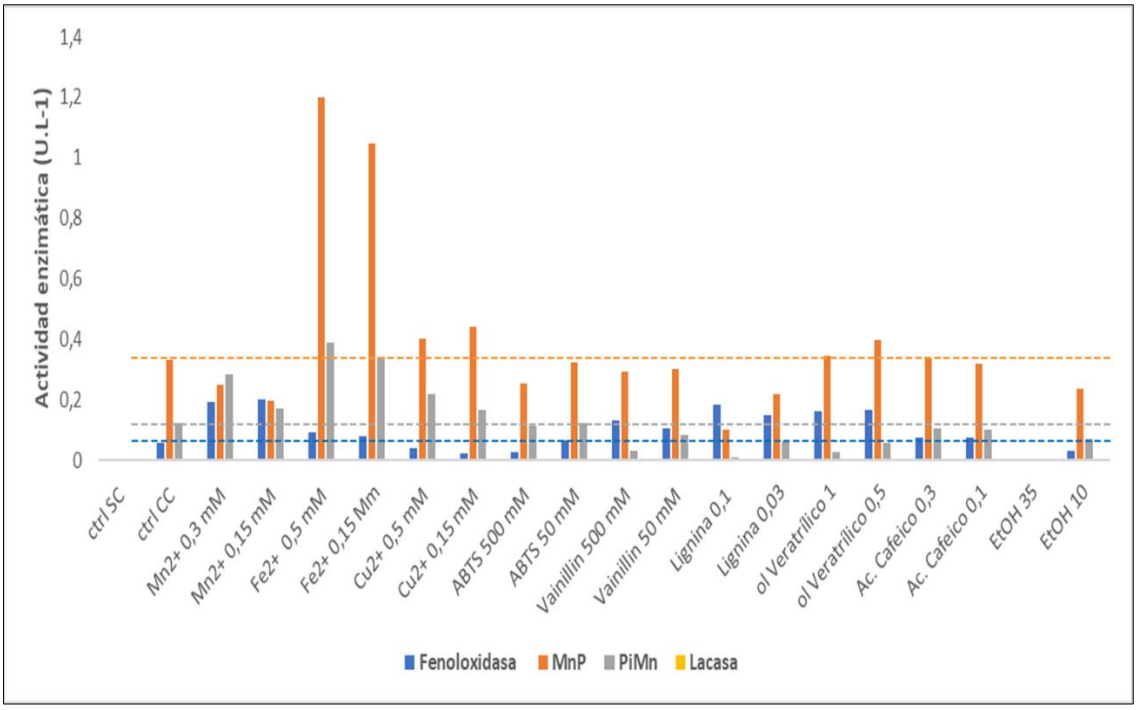


Figura 25. Actividades enzimáticas determinadas a las 6 h de inducción para cada condición de inducción ensayada, comparada con el control con colorante y sin inductor agregado (ctrl CC).

Como se mencionó anteriormente, tirosinasas (EC 1.14.18.1), lacasas (EC 1.10.3.2) y catecolasas (EC 1.10.3.1) comparten una gran variedad de sustratos, por lo que fue prácticamente imposible distinguir entre ellas (Rahouti *et al*., 1995, Burke & Cairney, 2002). Se sabe que estas tres enzimas son multicobre oxidasa (MCOs), que tienen Cu en sus centros activos y resultan inducidas por la presencia de iones Cu^{+2} en los medios de cultivos de microorganismos como *Trametes versicolor*, *T. hirsuta*, *T. trogii*, y *Aspergillus flavus* (Gomaa *et al*., 2015; Vasina *et al*., 2015; Campos *et al*., 2016). Este metal actúa como un cofactor en el centro catalíticos de estas enzimas (Baldrian, 2003). Además, está reportado que regula los niveles de ARNm de genes que codifican lacasas en diferentes hongos, por ejemplo, *Trametes versicolor* (Collins *et al*., 1997), *Trametes pubescens* (Galhaup *et al*., 2002) y *Pleurotus ostreatus* (Palmieri *et al*., 2000).

En los cultivos de *Trichosporon akiyoshidainum* HP-2023 el Cu^{2+} no tuvo un efecto inductor sobre la actividad fenol oxidasa durante la decoloración de Negro Reactivo 5, por el contrario, los niveles de actividad fueron más bajos que en el medio control, aunque el crecimiento en estas condiciones no fue afectado. Sin embargo, su efecto a nivel transcripcional debe ser estudiado, ya que la actividad fenol oxidasa en

cultivo de hongos, no necesariamente se corresponde con los niveles de expresión génica (Levin *et al*., 2008).

Efecto de los inductores y mediadores sobre la Actividad peroxidasa

Aunque poco frecuente, existe información que describe un efecto inductor de los iones de Cu^{2+} sobre actividad manganeso peroxidasa, por ejemplo, en el hongo de pudrición blanca *Phlebia radiata* (Mäkelä *et al*., 2013). Coincidentemente, en cultivos de *T. akiyoshidainum* HP-2023, el agregado de Cu^{2+} provocó una leve inducción de la actividad manganeso peroxidasa (un 21% con 0,5 mM de Cu^{2+} y un 32% con 0,15 Mm de este metal), mientras que la actividad peroxidasa independiente de manganeso, a las 6h de tratamiento aumentó, con respecto al control, un 79% y un 38%, con 0,5 Mm y 0,15 mM de Cu^{2+}, respectivamente. Sin embargo, el efecto inductor de los iones de Fe^{2+} sobre estas actividades enzimáticas fue mucho más importante. Se registraron incrementos en las actividades peroxidasas mayores al 200% con respecto al control. Un comportamiento similar fue descripto en hongos de la pudrición blanca como *T. versicolor* (Shah *et al*., 2010). Cabe destacar que el incremento registrado en las actividades enzimáticas en *T.akiyoshidainum* HP-2023, con la adición de Fe^{2+}, no fue debido a un incremento en el crecimiento celular, al igual que lo reportado por Shah y colaboradores (2010) para *T. versicolor*.

Si bien el manganeso es el inductor metálico más importante de actividad manganeso peroxidasa reportado en hongos ligninolíticos (Sklenar *et al*., 2010; Gettemy *et al*.; Vrsanska *et al*., 2016), la adición de Mn^{2+} en los cultivos de *T. akiyoshidainum* HP-2023, durante la decoloración de Negro Reactivo 5, produjo una disminución de los títulos de actividad manganeso peroxidasa. Mientras que se registró un aumento en la actividad peroxidasa independiente de manganeso de 135% con 0,3 mM de Mn^{2+}.

3.5. Efecto de los inductores más efectivos sobre el proceso de decoloración

Con el fin de estudiar el efecto de la inducción enzimática durante el proceso de decoloración de Negro Reactivo 5, se evaluó el efecto de los inductores más efectivos: Fe^{2+} (0,5 mM), Mn^{2+} (0,3 mM), vainillin (500 mM) y alcohol veratrílico (1Mm) a lo largo de 24 horas, tiempo suficiente para completar la decoloración de Negro Reactivo 5 por *T. akiyoshidainum* HP-2023.

Estudios previos como los descriptos por Rodríguez Couto y colaboradores (2002) y Cavallazzil y colaboradores *(*2005), demostraron que es posible aumentar las velocidades de decoloración de colorantes textiles, a través del agregado de inductores a los medios de cultivo. Sin embargo, en los cultivos de *T. akiyoshidainum*, aunque los inductores permitieron medir mayores títulos, no se observaron efectos significativos ni sobre el porcentaje final de decoloración ni sobre la velocidad de decoloración de Negro Reactivo (Figura 26).

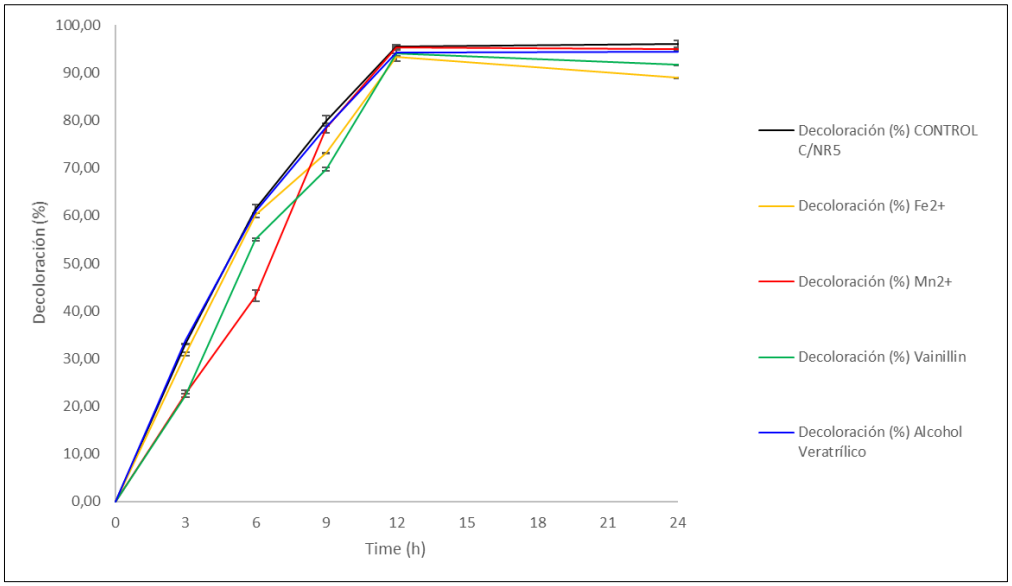


Figura 26. Curvas de decoloración de Negro Reactivo 5 para cada condición ensayada.

Actividades peroxidasas en los medios inducidos

En los ensayos de degradación de Negro Reactivo 5 por *T. akiyoshidainum* HP-2023 se observó una inducción significativa de la actividad manganeso peroxidasa en los medios con Fe^{2+}. Se registró un pico de actividad de 0,6 UL^{-1} frente 0,2 UL^{-1} determinados en el control a las 9 horas de cultivo (Figura 27), también se observó un incremento en la actividad peroxidasa independiente de manganeso, con un perfil de actividad a lo largo del tiempo muy similar al observado en los controles sin el metal.

Se confirmó que en medios con Mn^{2+}, se produjo la inducción de la actividad peroxidasa independiente de manganeso (PiMn), registrándose 0,4 UL^{-1} vs 0,2 UL^{-1} en el control. A diferencia de que ocurrió en los ensayos de inducción (en los que se trabajó

con un solo tiempo final de 6 horas de inducción) se observó también la inducción sobre la actividad manganeso peroxidasa (MnP). Además, se notaron diferencias con los perfiles de actividad registrados en los ensayos no inducidos. En presencia de Mn^{2+} se registró un pico de actividad MnP de 0,5 $U.L^{-1}$ a las 6 horas de cultivo, posteriormente la actividad descendió hasta las nueve horas y luego se mantuvo constante hasta el final del proceso y con valores inferiores respecto al control. Por el contrario, en medios sin Mn^{2+}, la actividad aumentó desde las 6 hasta las 12 horas, momento en el que comenzó a registrarse valores constantes.

También se comprobó que, tanto el alcohol veratrílico como el vainillín tuvieron un efecto negativo en la actividad peroxidasa independiente de manganeso (PiMn), mientras que no se observó prácticamente efecto sobre la actividad manganeso peroxidasa.

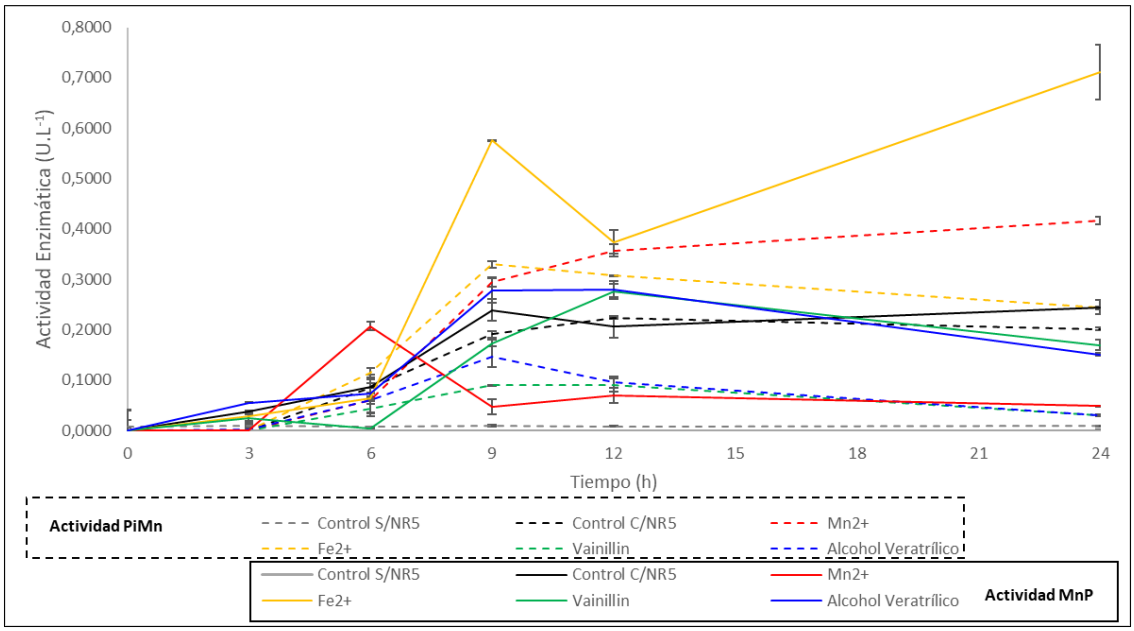


Figura 27. Perfiles de actividad Manganeso Peroxidasa determinados durante la degradación de NR5 por *T. akiyoshidainum* frente el agregado Mn^{2+} (0,3 mM), Fe^{2+} (0,5 mM), vainillin (500 mM) y alcohol veratrílico (1Mm) comparado con la con las condiciones controles sin inductores, con y sin NR5.

Los efectos diferenciales de los inductores ensayados sobre las actividades MnP y PiMn (dependientes e independientes de manganeso, respectivamente) sugieren la expresión de al menos dos enzimas diferentes.

Actividad fenol oxidasa en los medios inducidos

El agregado de Mn^{2+}, alcohol veratrílico y vainillin produjeron mayores títulos de actividad fenol oxidasa durante la decoloración de Negro Reactivo 5. En todos los casos se observó, picos de actividad alrededor de las 12 horas de cultivo, correspondientes a 0,66 UL^{-1}, 0,53 UL^{-1} y 0,49 UL^{-1}, respectivamente (Figura 28).

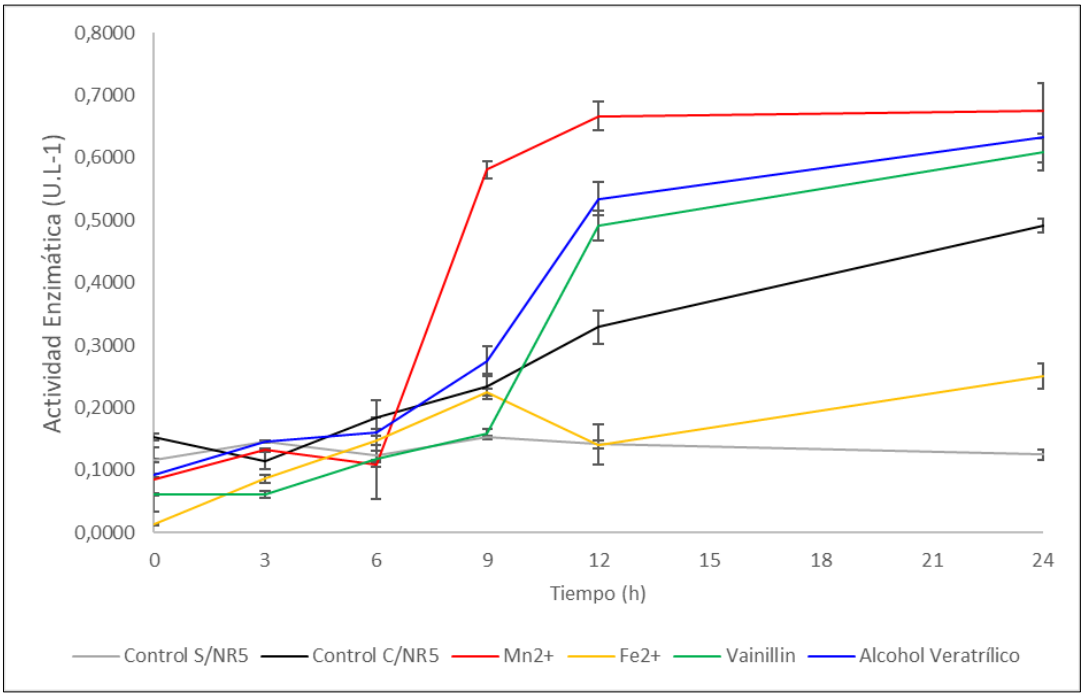


Figura 28. Perfiles de actividad Fenol oxidasa determinados durante la degradación de NR5 por *T. akiyoshidainum* frente el agregado de Mn^{2+} (0,3 mM), Fe^{2+} (0,5 mM), vainillin (500 mM) y alcohol veratrílico (1Mm) comparado con la con las condiciones controles sin inductores, con y sin NR5.

Cabe destacar que, si bien la inducción de las actividades enzimáticas registradas no tuvo efecto ni sobre el porcentaje de decoloración, ni sobre la velocidad de decoloración, el hecho que estas enzimas sean inducidas en presencia del colorante azoico Negro Reactivo 5, indicó que pueden estar involucradas en la degradación del colorante Negro Reactivo 5, o de algún metabolito generado durante su degradación por *T. akiyoshidainum* HP-2023.

A pesar de lo reportado en la literatura (Ikehata *et al*. 2004; Fonseca *et al*., 2014;), los efectos de los iones Mn^{2+}, Cu^{2+} y Fe^{2+} pueden no deberse a la inducción de enzimas, sino a la estimulación de reacciones de tipo Fenton durante las mediciones enzimáticas, mientras que los efectos de vainillin y alcohol veratrílico se explican por su rol como

mediadores redox, los que no actúan induciendo las actividades enzimáticas, sino simplemente acelerándolas al favorecer la oxidación de los sustratos usados en las determinaciones (Nouren *et al*., 2017).

4. CONCLUSIONES PARCIALES

- Como resultado de la comparación de la actividad decolorante de diferentes especies del género *Trichosporon,* se concluye que la habilidad decolorante es una característica presente en el género.
- En *T. akiyoshidainum* HP-2023 como en *T. chiarellii* y *T. porosum* 4029, la decoloración es un proceso co-metabólico en el que intervienen mecanismos de bioadsorción y/o degradación oxidativa dependiendo del medio de cultivo.
- La disminución de aminas aromáticas durante el proceso de decoloración de Negro Reactivo 5 en los tres microorganismos, es una característica destacable e importante para los procesos de biorremediación de efluentes coloreados, debido a la naturaleza tóxica de las aminas aromáticas resultantes de los procesos de degradación reductiva.
- Durante el proceso de decoloración llevado a cabo por *T. akiyoshidainum* HP-2023, *T. chiarellii* y *T. porosum* 4029 se inducen actividades enzimáticas oxidativas, relacionadas a la degradación de lignocelulosa.
- La mayor inducción de las actividades enzimáticas lignocelulolíticas alcanzada mediante la adición de mediadores redox, iones metálicos o compuestos de degradación de la lignina no afectó significativamente ni la velocidad del proceso ni el porcentaje final de la decoloración de Negro Reactivo 5.
- Las técnicas colorimétricas empleadas para la determinación de actividades enzimáticas ligninolíticas clásicas (lacasa, manganeso peroxidasa, etc.) producen falsos positivos y/o falsos negativos, dependiendo de las condiciones de cultivo y de la especie involucrada.
- Las imitaciones de las técnicas colorimétricas explican los resultados obtenidos previamente en estudios de decoloración de Negro Reactivo 5 por *T. akiyoshidainum* HP-2023.

Capítulo 2

Secuenciación, Anotación y Caracterización del Genoma de

***Trichosporon akiyoshidainum* HP-2023**

CAPÍTULO 2

Secuenciación, Anotación y Caracterización del Genoma de *Trichosporon akiyoshidainum* HP-2023

1. INTRODUCCIÓN

T. akiyoshidainum HP-2023 es una levadura de la clase Basidiomicetes que posee características importantes para la biodegradación de colorantes azoicos aromáticos.

Diversas enzimas comúnmente asociadas a la decoloración fueron inducidas por la presencia del colorante, tanto en los procesos de decoloración llevados a cabo por *T. akiyoshidainum* HP-2023 como por *T. chiarellii* y *T. porosum* 4029 (Capítulo 2). Sin embargo, no se puede afirmar que estas sean las principales enzimas responsables del proceso ya que se demostró que una mayor actividad enzimática no aumenta la velocidad de decoloración.

Las limitaciones relacionadas a las técnicas colorimétricas empleadas en las determinaciones enzimáticas, más las dificultades encontradas en la purificación de proteínas, hizo evidente la necesidad de un enfoque diferente que permita un análisis más completo de los mecanismos moleculares subyacentes involucrados en la degradación de colorantes, en esta y otras levaduras.

En este sentido, el análisis genómico de la mano de los estudios proteómicos que serán discutidos en el siguiente capítulo, añaden nuevas perspectivas a nuestro conocimiento actual sobre la degradación de colorantes y conducen a nuevas estrategias para mejorar los procesos de remediación, tanto de colorantes textiles como de compuestos aromáticos relacionados.

1.1. Análisis Genómico

El análisis genómico consiste en la identificación, caracterización, cuantificación o comparación de características como las secuencias de ADN, las variaciones estructurales, la expresión génica o la presencia de elementos reguladores y funcionales a una escala genómica. En contraste con la genética, que se refiere al estudio de los genes individuales y sus roles en la herencia, el análisis genómico utiliza secuenciación de ADN

de alto rendimiento y técnicas bioinformática para ensamblar y analizar la función y la estructura de genomas completos (Gasperskaja & Kučinskas, 2017).

1.1.2. Tecnologías de Secuenciación

La investigación biológica ha cambiado rápidamente desde que surgieron las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento, conocidas como secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés *Next Generation Sequencing*). Estos secuenciadores producen lecturas de alta calidad a un precio moderado, acelerando así los campos de investigación en genómica, transcriptómica, metagenómica, entre otros (El-Metwally *et al.*, 2013).

El concepto de NGS sirve para englobar todas las tecnologías destinadas a llevar a cabo la secuenciación masiva de cualquier ácido nucleico en la actualidad.

Las plataformas de NGS más ampliamente utilizadas son *Roche 454* (Roche Life Sciences), *ABI SOLiD* (Applied Biosystems) y la plataforma *Illumina HiSeq, Genome Analyzer IIx, MiSeq* y *HiScanSQ* (Illumina). En todas ellas el proceso de secuenciación es similar. En una primera etapa el ADN se fragmenta al azar, luego se une a adaptadores específicos y posteriormente se amplifica mediante la reacción en cadena de la polimerasa. En una segunda etapa, la biblioteca de ADN generada se inmoviliza en nanoesferas o en una matriz donde se forman agrupaciones o *clusters* que consisten en fragmentos de ADN idénticos. Estos grupos se leen mediante ciclos secuenciales de incorporación, lavado y detección de nucleótidos.

Como se puede observar en la Figura 29, el tamaño promedio de las secuencias obtenidas es muy importante, porque cuanto mayor sea la longitud de la secuencia, habrá un menor número de lecturas que solapar (A). En cambio, si las lecturas son más cortas, el número de lecturas finales será mayor, hecho que dificultará el ensamblaje necesario para posteriores análisis (B) (Garrigues, 2017).

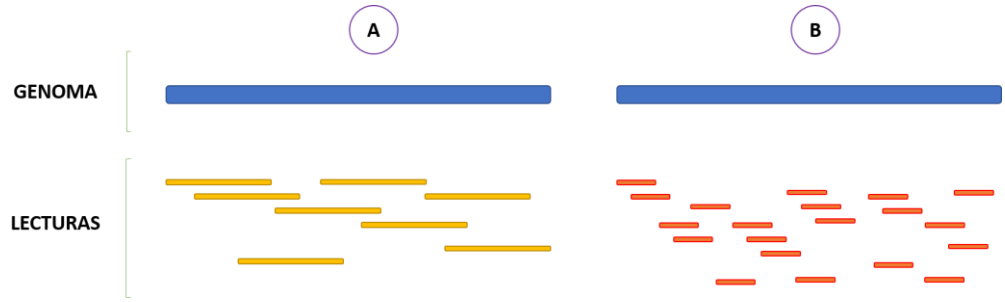


Figura 29. Importancia de la longitud de las lecturas obtenidas durante la secuenciación: A. cuanto mayor sea la longitud de la secuencia, habrá un menor número de lecturas que solapar. B. si las lecturas son más cortas, el número de lecturas finales será mayor, hecho que dificultará el ensamblaje necesario para posteriores análisis (Garrigues, 2017).

Actualmente también existen plataformas de Secuenciación de Tercera Generación que se encuentran todavía en fase de experimentación o requieren de la mejora en muchos de sus aspectos. Todas las estrategias utilizadas en estas plataformas de tercera generación se fundamentan en la idea de eliminar la etapa de reacción en cadena de la polimerasa y tratar de realizar la propia secuenciación a partir de una única molécula de ADN. Al mismo tiempo se intenta abaratar costes y conseguir lecturas más largas que faciliten el posterior ensamblado. Esto permite ampliar el abanico de posibles aplicaciones de la secuenciación a gran escala, a campos como la detección de grandes variaciones en la estructura de los cromosomas o la caracterización de haplotipos, etc.

1.1.3. Ensamblaje del genoma

Actualmente existen dos grandes vertientes en el ensamblado de secuencias:

Ensamblado *de novo*: Se reconstruye la secuencia de ADN completa a partir de las lecturas, sin ningún tipo de conocimiento previo a cerca del genoma a ensamblar. Busca lecturas cuyo final coincida con el principio de otra de forma que se puedan unir para formar fragmentos mayores hasta completar el genoma.

Ensamblado comparativo: Se basa en un genoma secuenciado previamente y que se supone es similar al que se quiere ensamblar. El procedimiento básico tratará de colocar cada una de las lecturas en la posición adecuada utilizando el genoma de referencia como guía.

1.1.4. Anotación del Genoma

Se denomina anotación de un genoma a la tarea de identificar y asignar funciones a los distintos elementos presentes en la secuencia genética de un organismo (Stein, 2001). La anotación puede realizarse de forma automática o manual. Si bien la anotación manual es más laboriosa, es a menudo más precisa y produce menos errores que la automática (Del Angel *et al*., 2018).

Los métodos de identificación de genes *ab initio*, identifican los genes a partir de características de la propia secuencia, como la existencia de los marcos de lectura abiertos (ORF, *open reading frames*). La identificación de las regiones que codifican para distintos tipos ARN, también puede realizarse mediante el uso de algoritmos específicos o "*gene callers"*, un proceso que se realiza de distinta manera en genomas eucariotas y en genomas procariotas. En el caso de genomas eucariotas, uno de los grandes inconvenientes es la presencia de intrones, por lo que predecir la estructura de un gen puede llegar a ser complejo (Stanke *et al*., 2006). Algunas de las herramientas más usadas para llevar a cabo estas predicciones en genes eucariotas son *Augustus* y *Genemark-ES*. Estos predictores *ab initio*, detectan genes eucariotas por la presencia de estructuras génicas (motivos, secuencias cortas, codones de inicio, etc.) que son detectadas en las secuencias gracias a un entrenamiento automático previo del software, basado en secuencias ya anotadas de especies relacionadas (Lomsadze *et al*., 2005). Este enfoque tiene aproximadamente un 100% de éxito dado su alto nivel de sensibilidad (Yandell *et al*., 2012).

1.1.5 Caracterización Funcional

Una vez lograda una identificación de las regiones génicas en el genoma, es necesario caracterizarlas funcionalmente, es decir que es necesario describir los posibles roles de estos genes o de las proteínas codificadas por ellos. Una de las aproximaciones comúnmente usada para este propósito es la de la asignación funcional, mediante la comparación de las secuencias de estos genes con bases de datos de secuencias de genes conocidos y clasificados de acuerdo a un lenguaje estandarizado conocido como Ontología (Cifuentes Triana, 2016). Esta ontología consiste en una colección de términos que describen la función de un gen y de una explicación de las relaciones entre estos términos, generalmente en forma de gráfico. El proyecto GO (por sus siglas en inglés, *Gene* Ontology) tiene como objetivo estandarizar un sistema de nomenclatura de genes

de modo que permita comprender las relaciones existentes entre las secuencias y sus atributos funcionales (Ashburner *et al*., 2000; Blake *et al*., 2013). Los descriptores GO de cada producto génico, se relacionan, por un lado, con términos GO más inclusivos y por otro con términos más específicos y han sido clasificados en tres grandes dominios:

1. Función molecular.
2. Proceso biológico.
3. Componente celular.

El dominio **función molecular (FM)**, se asocia con la actividad bioquímica del producto génico. Describe actividades que ocurren a nivel molecular. Sus términos representan a las actividades y no a las entidades (moléculas o complejos moleculares) que llevan a cabo las acciones, sin especificar cuándo, dónde, o en qué contexto ocurren. Para evitar confusiones entre los nombres de los productos génicos y las FMs, muchos términos incorporan la palabra *activity* (actividad).

El dominio **proceso biológico (PB)**, describe el objetivo de un producto génico. Los PBs implican generalmente transformaciones químicas o físicas que ocurren por la acción de un conjunto de funciones moleculares organizadas. Los PBs pueden referirse a procesos más bien abstractos, como el crecimiento celular, la transducción de señales o más específicos como el metabolismo de pirimidinas o la biosíntesis de AMPc.

El término **componente celular (CC)** incluye términos que describen el lugar donde el producto génico se encuentra o lleva a cabo su función. Un componente celular puede ser una estructura anatómica, como el retículo endoplasmático, el núcleo celular o una estructura molecular más simple formada por productos génicos, como un ribosoma o un dímero proteico (Gaudet *et al*., 2017).

La predicción de funciones génicas sobre la base de las anotaciones GO ofrece ventajas incuestionables. GO abarca todos los procesos biológicos, en contraste con esquemas anteriores que se limitaban, por ejemplo, a rutas metabólicas o de señalización.

En este trabajo se optó por la anotación funcional del genoma de *T.akiyoshidayinum* HP-2023 mediante el paquete Blast2GO (B2G), optimizado para la investigación genómica de especies “no modelos”. El software permitió la anotación automática de secuencias y la integración de información para minería de datos, basada en anotaciones de ontología génica (GO).

También se realizó la anotación funcional del genoma por comparación con la base de datos de KEGG (por sus siglas en inglés, *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). KEGG es una base de datos para el análisis sistemático de las funciones de

los genes. Vincula la información genómica con la información funcional de orden superior (rutas metabólicas). Entre las herramientas que proporciona KEGG se destacan BlastKOALA y GhostKOALA (http://www.kegg.jp/blastkoala/). Realizan asignaciones KO (*KEGG Orthology*) para caracterizar las funciones de genes individuales en un genoma, para reconstruir vías metabólicas y módulos KEGG de organismos o ecosistemas (Kanehisa *et al*., 2016).

Existen otras herramientas bioinformáticas disponibles en la web que caracterizan funcionalmente un genoma, como por ejemplo SignalP, muy utilizado actualmente para la predicción de péptidos señal a partir de secuencias de aminoácidos (Petersen *et al*., 2011). La identificación de proteínas con péptidos señal que las dirigen a la vía secretora, es de gran utilidad para analizar proteínas posiblemente extracelulares.

Existen también plataformas web que admiten la anotación de grupos de proteínas más específicos, acotando la cantidad de datos a grupos funcionales de interés particular. Entre estas, podemos destacar a dbCAN y MycoClap.

Las herramientas informáticas de dbCAN posibilitan la anotación automática de genes basada en la presencia de dominios conservados de enzimas activas sobre carbohidratos (CAZymes por su sigla en inglés, *Carbohydrate-Active Enzymes*). Estas enzimas son muy importantes a nivel industrial, particularmente para la industria de biocombustibles, ya que son responsables de la síntesis, degradación y modificación de todos los carbohidratos sobre la tierra (Yin *et al*., 2012).

Por otra parte, MycoCLAP (http://mycoclap.fungalgenomics.ca) reúne datos bioquímicos de más de 800 enzimas fúngicas que degradan lignocelulosa. Estos datos se recopilaron de la literatura y se organizaron en la base de datos de búsqueda que es capaz de clasificar los resultados de búsqueda según los homólogos más cercanos caracterizados bioquímicamente, mejorando la calidad de la anotación y disminuyendo significativamente el tiempo requerido para anotar secuencias nuevas (Strasser *et al*., 2015).

Los métodos de anotación basados en homología se basan en la comparación de las secuencias de distintas especies, con el fin de inferir sus correspondientes funciones. Estos métodos asumen que secuencias muy similares deben desempeñar las mismas funciones en especies distintas, ya que derivan de una secuencia ancestral común y han sido sometidas a los mismos procesos evolutivos (Koonin, 2001).

Tanto dbCAN como MycoCLAP contienen información sobre muchas oxidorreductasas potencialmente involucradas en la degradación de colorantes azoicos y

son de gran ayuda para conocer los posibles mecanismos de biodegradación de colorantes textiles de *T. akiyoshidainum* HP-2023.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.1 Extracción del ADN genómico de *T. akiyoshidainum* HP-2023

El ADN genómico total de *T. akiyoshidainum* HP-2023 se extrajo con el método descripto por Yamada y colaboradores (2002). Se tomaron 2 mL del medio de cultivo YM líquido inoculado con la levadura e incubado a 25ºC por 12 h. Este volumen se centrifugó 10 min a 10.000 rpm y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, el pellet celular se lavó tres veces con agua destilada estéril y se disgregó con nitrógeno líquido en un mortero. El pellet resultante se resuspendió en 400 µL de buffer de lisis (Tris-HCl 100 mM, pH 8,00, SDS 1,0%, Triton X-100 2,0%, EDTA 10mM, NaCl 100 mM) y luego fue colocado en un tubo Eppendorf de 2 mL junto con 400 µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Se centrifugó la mezcla obtenida durante 10 minutos a 10.000 rpm y 4ºC. La fase acuosa fue recuperada y transferida a tubos de microcentrífuga estériles, donde se realizaron dos lavados con un volumen igual de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). El ADN se precipitó con el agregado de un volumen de isopropanol frío. Las muestras se incubaron 30 minutos a -20°C y se centrifugaron 10 minutos a 10.000 rpm y 4ºC. El ADN precipitado fue lavado dos veces con etanol 70%, secado y resuspendido en agua bidestilada estéril para su posterior uso.

Se determinó la concentración y calidad del ADN midiendo la absorbancia de 2 µL de la muestra, en espectrofotómetro UV/Visible a 230 nm (absorbancia de fondo y posibles contaminantes de origen orgánico, como iones fenolato, tiocianatos y otros compuestos aromáticos), 260 nm (absorbancia específica para ácidos nucleicos) y 280 nm (absorben las proteínas, debido a sus aminoácidos aromáticos y también el fenol). La cantidad de ácidos nucleicos se determinó sobre la base de la absorbancia a 260 nm, mientras que las razones entre las absorbancias 260/280 y 260/230 fueron indicadores de pureza de la extracción.

2.1.2. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa

Para completar la evaluación de la calidad del ADN purificado, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (m/v) en tampón de electroforesis TAE 1x (1 g de agarosa en 100 mL de TAE 1x). La disolución de TAE 1x se preparó a partir una disolución madre a concentración 50x (Tris-HCl 2 M; ácido acético 5,71%; EDTA 50 mM; pH 8,0). La tinción del gel se realizó con 0,5 µL de gel RED (GelRed® Nucleica

Acid Stain, Biotium) que se añadieron a la disolución de agarosa antes de su gelificación. En la primera calle del gel se cargaron 2 µL de marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder de Invitrogen). Las muestras se prepararon con 5 µL de ADN y 1 µL de tampón de carga (azul de bromofenol 0,25 % (p/V), xilencianol 0,25 % (p/V) y glicerol 30 % (V/V)). Por último, se llevó a cabo la electroforesis a una intensidad de corriente constante de 100 mA durante 40 min con una fuente de alimentación (BioRad). Una vez finalizada la electroforesis, los fragmentos de ADN se detectaron en un transiluminador de luz UV (UVP 3uv).

2.2. Secuenciación y ensamblaje del ADN genómico de *T. akiyoshidainum* HP-2023

La secuenciación fue realizada en la plataforma MrDNA (Texas). Se prepararon dos librerias usando el Kit Nextera Mate Pair Sample Prep (Illumina) siguiendo las especificaciones del fabricante. La concentración inicial de ADNg fue evaluada con el kit Qubit® dsDNA HS Assay kit (Life Technologies). Luego la muestra fue diluida hasta alcanzar la carga de ADN recomendada: 1 µg con una concentración de 13,15 ng/µL. Posteriormente, la muestra se sometió a fragmentación, desplazamiento de cadena, circularización, cizallamiento, purificación de estreptavidina, reparación final, adenilación y ligadura de los adaptadores. Los adaptadores ligados se utilizaron durante una PCR de ciclo limitado (10 ciclos). Después de la preparación de las bibliotecas, se midió su concentración final usando el kit *Qubit® dsDNA HS assay* (Life Technologies) y se determinó el tamaño promedio de ambas bibliotecas usando Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Las librerías (12.5 pM cada una) fueron secuenciadas con el kit 600 *Cycles v3 Reagent Kit* (Illumina) en MiSeq (Illumina) y *de novo* ensambladas con NGEN v. 11 (DNASTAR, Inc.).

2.3. Anotación del genoma de *T. akiyoshidainum* HP-2023

La anotación se realizó con Maker, versión 2.31.8 (Holt & Yandell, 2011; Campbell *et al*., 2014). Esto incluyó la predicción de genes con Augustus 3.0.3 (Stanke *et al*., 2006), GeneMark-ES Suite 4.21 (Ter-Hovhannisyan *et al*., 2008), y SNAP (Korf, 2004). Los genomas de *T. chiarelli* MYA-4694 (Pagnocca *et al*., 2010) y *T. oleaginous* IBC0246 (Kourist *et al*., 2015), obtenidos de la base de datos *Mycocosm* (Grigoriev *et al*., 2014) se utilizaron como genomas de referencia para entrenar los predictores de genes.

2.4. Caracterización funcional del genoma de *T. akiyoshidainum* HP-2023

En primer lugar, se realizó una caracterización funcional del genoma de *T.akiyoshidainum* HP-2023, teniendo en cuenta la información global codificada en su ADN.

Posteriormente, se prestó principal importancia al análisis de los genes involucrados en procesos biológicos cuyas funciones pudiesen estar relacionadas al proceso de decoloración

2.4.1. Predicción de las funciones biológicas de las proteínas predichas en base a anotaciones GO

Como un primer paso para anotar funcionalmente los genes del genoma de *T.akiyoshidainum* HP-2023 se empleó la herramienta bioinformática Blast2GO (B2G) (Conesa *et al*., 2005) para otorgar términos de GO a las secuencias de proteínas predichas.

Se realizó una búsqueda de similitud de secuencia a través del uso de BLASTp, empleando la base de secuencias no redundantes del NCBI acotada a organismos fúngicos, para todas las secuencias de proteínas anotadas en el genoma de *T.akiyoshidainum* HP-2023. De esta manera se obtuvieron los archivos XML, los cuales fueron subidos al programa Blast2GO. Esto se realizó con el fin de acortar los tiempos de análisis, ya que el servidor Blast2GO requería tiempos mucho más prolongados para este análisis.

Una vez cargadas las secuencias con los 20 mejores *hits* encontrados al realizar el BLASTp para cada una de ellas, B2GO realizó una búsqueda de similitud de secuencias a través de IterProScan, se empleó la base de datos de proteínas de *InterPro*. Posteriormente, el programa extrajo los términos GO asociados a cada uno de los resultados obtenidos y devolvió una anotación GO evaluada para las secuencias de consulta. Finalmente, B2GO posibilitó asociar estos resultados con EC (por sus siglas en inglés, *Enzymatic Commission numbers*) y mapearlos en la base de datos KEGG (Conesa & Götz, 2009).

2.4.2. Caracterización de los genes y/o familia de genes potencialmente involucrados en la decoloración de colorantes en *T. akiyoshidainum* HP 2023 en base a los resultados de Blast2GO

A pesar de que los colorantes presentan diversas estructuras químicas, son degradados por un grupo relativamente pequeño de enzimas, que tienen dos características en común: todas son oxidorreductasas de baja especificidad y pueden actuar sobre diferentes sustratos (Martorell, 2015).

Estas enzimas redox generan radicales libres reactivos que atraviesan una serie de reacciones complejas y espontáneas que culminan con la ruptura de enlaces en la molécula.

Se examinó las enzimas oxidorreductasas codificadas en el genoma de *T.akiyoshidainum* HP-2023, prestando especial atención a aquellas oxidorreductasas (peroxidasas, fenol oxidasas, ferroxidasas, hierro reductasas), cuyas actividades fueron determinadas en los sobrenadantes de cultivo en presencia del colorante Negro Reactivo 5 (Capítulo 2).

Se identificó particularmente los genes que podían estar involucrados en las vías bajas de degradación de compuestos aromáticos.

Por otro lado, considerando el hecho de que *T. akiyoshidainum* no sufre ninguna modificación en el crecimiento durante la decoloración de colorantes azoicos como Negro Reactivo 5, se examinaron diferentes sistemas de desintoxicación o defensa contra el estrés oxidativo, que podrían entrar en juego durante el proceso de degradación oxidativa de colorantes.

La anotación de las proteínas del genoma de *T. akiyoshidainum* HP-2023 con términos GO facilitó analizar las proteínas que forman parte de un determinado proceso biológico, como así también permitió agruparlas por funciones moleculares y tener una idea aproximada de las localizaciones celulares de las proteínas analizadas.

El programa B2G admite filtrar los resultados de acuerdo a términos específicos de GO, obteniendo una identificación rápida de las proteínas de interés. Los términos de GO empleados para el análisis se detallan en la Tabla 3:

Tabla 3. Términos GO de interés, empleados para la caracterización de los genes potencialmente involucrados en la decoloración del colorante azoico Negro Reactivo 5.

Clase GO	GO ID	GO name
Componente celular	GO: 005618	Región extracelular
	GO: 005576	Región extracelular
	GO: 0016021	Componente celular integral de la membrana
Función molecular	GO: 0016614	Actividad oxidorreductasa
Función molecular	GO: 0016491	Actividad oxidorreductasa
	GO: 004601	Actividad Peroxidasa
	GO:004497	Actividad monooxigenasa
Proceso biológico	GO: 006979	Respuesta a estrés oxidativo
	GO: 0000302	Respuesta a especies reactivas del oxígeno

2.4.3. Función biológica de las proteínas predichas: Anotación con BLAST KOALA (*KEEG ANNOTATION*)

El conjunto de 9019 proteínas predichas en *T. akiyoshidainum* HP-2023 también fueron funcionalmente caracterizadas en la Base de Datos KEGG PATHWAY (http://www.genome.jp/kegg/pathway.html) con la herramienta de similitud de secuencias GhostKOALA (http://www.kegg.jp/ghostkoala/).

GhostKOALA es adecuado para anotar genomas completamente secuenciados, también posibilita anotar grandes conjuntos de datos como metagenomas. GhostKOALA asigna números K para anotar las secuencias de aminoácidos y permite el mapeo KEGG para la interpretación de funciones de alto nivel.

2.4.4. Identificación de proteínas extracelulares SignalP 4.0

Las proteínas destinadas a la vía secretora fueron predichas con la herramienta bioinformática SignalP 4.0.

SignalP es el programa más utilizado actualmente para la predicción de péptidos de señal a partir de secuencias de aminoácidos. Tener conocimiento de cuáles proteínas son intracelulares y cuáles están dirigidas a las vías secretora, es extremadamente útil para

estudiar los procesos metabólicos, especialmente cuando estos involucran en gran medida proteínas extracelulares.

2.4.5. Identificación de proteínas activas sobre material lignocelolósico

dbCAN (clasificación de CAZymes)

Las enzimas activas sobre carbohidratos fueron clasificadas con el programa dbCAN (http://csbl.bmb.uga.edu/dbCAN/annotate.php), cuyo sistema de clasificación se basa en HMMer (Yin *et al*. 2012).

dbCAN permite la anotación automatizada, basada en el dominio de enzimas activas sobre carbohidratos (CAZymes), de cualquier conjunto de datos de proteínas. Para lograr esto, se definió explícitamente un dominio característico para cada familia de CAZymes, derivado de la búsqueda en la base de dominios conservados (CDD) y de la curación de bibliografía. La construcción de un modelo oculto de Markov (HMM) para representar el dominio de cada familia CAZyme fue la base para la anotación automatizada de CAZymes.

MycoCLAP

Las proteínas de *T. akiyoshidainum* HP-2023 fueron clasificadas usando la base de datos MycoCLAP (http://mycoclap.fungalgenomics.ca).

MycoCLAP es una base de datos de búsqueda de genes fúngicos y bacterianos que codifican proteínas activas en lignocelulosa que se han caracterizado bioquímicamente. Todas las propiedades bioquímicas y las anotaciones funcionales descritas en mycoCLAP se curan manualmente y se basan en pruebas experimentales reportadas en la literatura publicada (Strasser *et al*., 2015).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Secuenciación, anotación y caracterización del genoma de *T. akiyoshidainum* HP-2023

La secuenciación de genomas completos es una herramienta muy importante para el análisis funcional de los genes de un microorganismo. La secuencia del genoma de *T.akiyoshidainum* HP-2023 se obtuvo a través de la tecnología MiSeq de *Illumina*, mediante un protocolo de secuenciación por síntesis. El kit empleado para la secuenciación, MiSeq v3 de 600 ciclos, permite obtener longitudes de lectura más largas en cualquier sistema de secuenciación de *Illumina*. El tamaño de lectura es muy importante a la hora de secuenciar, porque cuanto mayor sea la longitud de la secuencia, el fragmento del genoma cubierto es también más grande, por lo que, el posterior análisis bioinformático es más sencillo, ya que hay un menor número de lecturas que solapar.

La secuenciación del genoma de *T. akiyoshidainum* HP-2023 produjo lecturas emparejadas (*paired-end reads*) que fueron ensambladas en 1067 contigs con una cobertura promedio de 269X. La longitud N50 fue de 53.521 pb, el contig más largo fue de 320.689 pb y el más corto de 238 pb.

El genoma mostró un tamaño de 30.064.998 pb, ligeramente superior al promedio del tamaño de los genomas de las especies del orden trichosporonales secuenciadas (Takashima *et al*., 2017), con un contenido promedio de GC 60,76%. La anotación automática se realizó a través de Maker (versión 2.31.8), que incluye los predictores de genes Augustus 3.0.3, GeneMark-ES Suite 4.32, y SNAP (Campbell *et al*., 2014; Holt *et al*., 2011, Stanke *et al*., 2006; Ter-Hovhannisyan *et al*., 2008 & Korf, 2004). Si bien, los tres servidores admiten la anotación detallada y automatizada de genomas, existen diferencias en los resultados obtenidos. La información de cada uno se torna complementaria permitiendo el enriquecimiento de la caracterización del genoma en estudio. De esta manera se anotaron 9019 genes que codifican proteínas, lo que corresponde al 43,09% del total del genoma (12.955.601pb de 30.064.998 pb totales). Además, se identificaron un total de 1386 ARNt. En la Tabla 4 se detallan las características descriptas del genoma de *T. akiyoshidainum* HP-2023 determinadas luego de la secuenciación y anotación de su genoma.

El Proyecto del genoma de *T. akiyoshidainum* HP-2023 ha sido depositado en DDBJ/EMBL/GenBank, donde se encentra disponible bajo el Número de Acceso: PQXP00000000.1.

Tabla 4. Características del genoma de *T. akiyoshidainum* HP 2023

CARACTERÍSTICA	VALOR
Tamaño del genoma (Mpb)	30,06
Número de contigs	1067
Longitud del contig más largo (pb)	320682
Longitud del contig más corto (pb)	238
Longitud del contig N50 (pb)	53521
Contenido de GC (%)	60,76
Cobertura promedio	269X
Longitud total de los genes que codifican proteínas (pb)	12955601
Número de genes que codifican proteínas	9019
Longitud promedio de los genes (pb)	1381
Regiones del genoma que codifican proteínas (%)	43,09
ARNt	1386

3.2. Caracterización funcional del genoma de *T. akiyoshidainum* HP-2023

3.2.1. Anotación funcional con Blast2GO

La mayoría de los genes que codifican proteínas en *T. akiyoshidainum* HP-2023, fueron asignados con términos GO, lo cual facilita su análisis para la búsqueda de funciones.

De las 9019 secuencias de proteínas inicialmente anotadas en el genoma de *T.akiyoshidainum* HP-2023, que fueron analizadas, 1535 (17%) sólo fueron identificadas por alineamiento con secuencias disponibles en la base de datos refseq_protein, mediante BLASTp (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins) o bien en la base de datos InterPro al emplear InterProScan (https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search), 2621 (29 %) pudieron ser mapeadas, es decir que se las pudo asociar con términos de GO generales, mientras que 4503 secuencias (50 %) fueron anotadas exitosamente con términos GO específicos. Solamente 360 secuencias de proteínas (4%) no produjeron ningún resultado con este software (Figura 30).

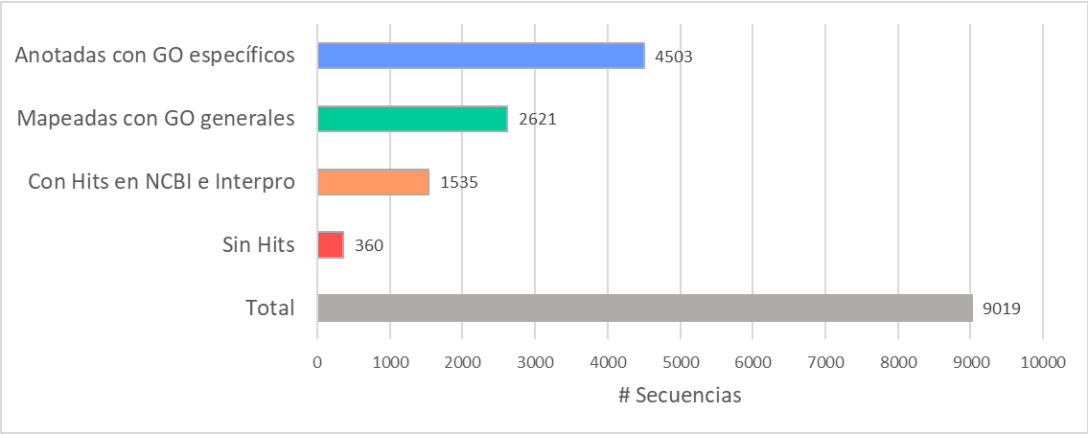


Figura 30. Resultados estadísticos obtenidos de la ejecución del programa BLAST2GO.

3.2.1.1. Análisis cuantitativo de las anotaciones funcionales

El análisis posibilitó asignar términos de GO a las secuencias de proteínas del genoma de *T. akiyoshidainum* HP-2023, clasificándolas dentro de tres categorías: proceso biológico, función molecular y componente celular. Esto ayuda a entender el significado biológico del conjunto de secuencias anotadas que conforman la información genética de este microorganismo.

En la Figura 31 se muestra la distribución de los términos GO mapeados por niveles máximos. Estos niveles representan el número de términos GO más generales con los que puede asociarse un término dado, es decir, es una medida de lo específico de la descripción del producto génico. Así, se observa que la mayoría de las secuencias cuentan con anotaciones de nivel 9 para procesos biológicos (verde), mientras que para las anotaciones de función molecular (azul) la mayoría son de nivel 5 y para componente celular, las anotaciones principalmente son de nivel 8 (amarillo). A medida que aumenta el nivel de especificidad (niveles mayores a10), los términos anotados disminuyen.

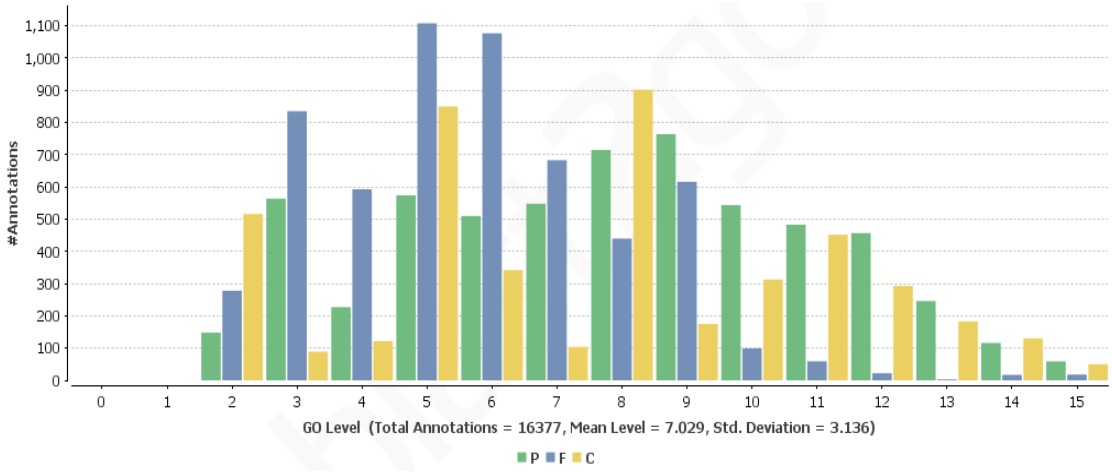


Figura 31. Distribución de los términos GO mapeados por niveles (Verde = Proceso Biológico, Azul = Función Molecular, Amarillo =Componente Celular).

En la Figura 32 se describe la distribución porcentual de los términos GO correspondiente al dominio **procesos biológicos**. Se observa que la mayoría de las anotaciones corresponden a procesos celulares relacionados con la expresión génica (12%), procesos metabólicos (reacciones químicas y rutas metabólicas) que involucran moléculas de ARN (8%), procesos metabólicos (reacciones químicas, rutas metabólicas que involucren proteínas específicas, incluyendo modificaciones celulares proteicas) de proteínas celulares (8%) y procesos de biosíntesis de macromoléculas celulares (8%). Sólo un 3% se asocia a procesos de oxido-reducción.

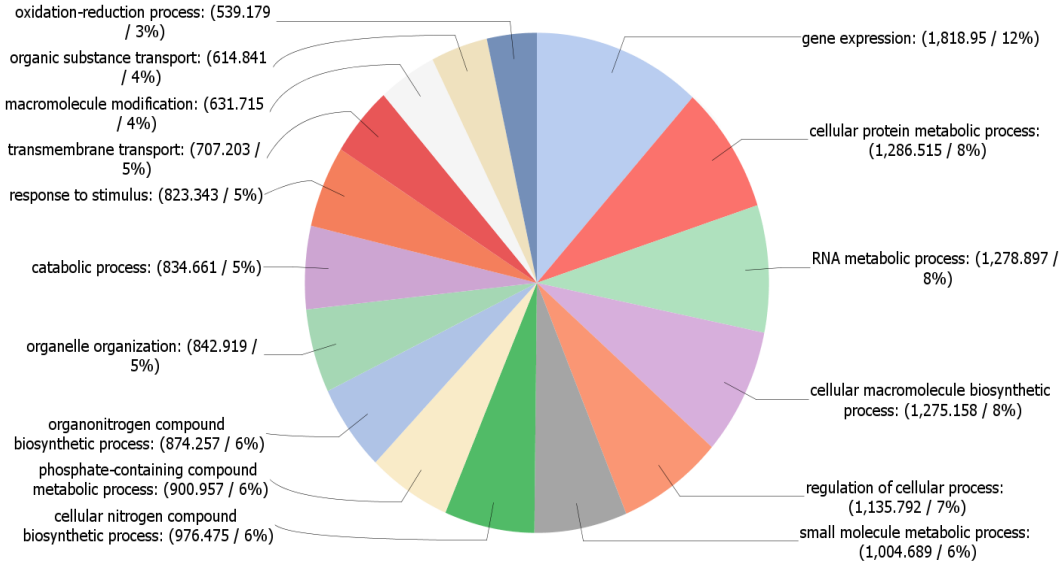


Figura 32. Resultados obtenidos de la ejecución del programa Blast2GO. Representación circular de porcentajes de aparición de términos GO en la categoría funcional de: Proceso Biológico.

En la Figura 33 se observa los resultados de términos GO correspondientes a componentes celulares asignados a las proteínas de *T. akiyoshidainum* HP-2023. En este caso, destacan los términos asociados a organelas intracelulares no limitadas por una bicapa lipídica, incluyendo ribosomas, citoesqueleto y cromosomas (20%), también son significativos los GO asociados a cualquier constituyente del núcleo celular (partes nucleares, 18%) y los de componentes integrales de membrana (18%).

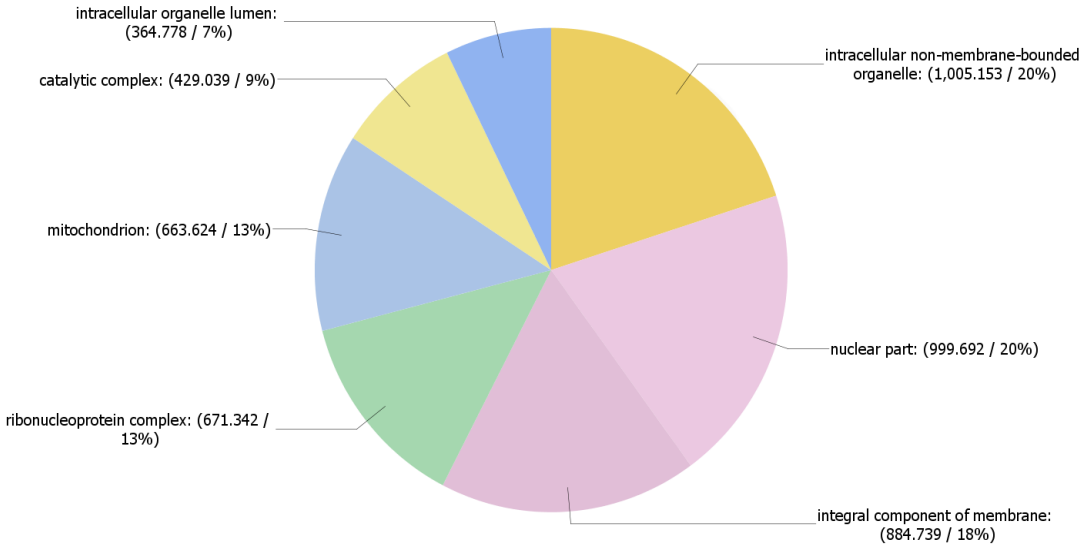


Figura 33. Resultados obtenidos de la ejecución del programa Blast2GO. Representación circular de porcentajes de aparición de términos GO en la categoría funcional de: Componente celular.

Finalmente, en la Figura 34 se muestra la distribución de las asignaciones de términos GO para función molecular realizadas en el genoma de *T. akiyoshidainum* HP-2023, donde hay una mayor representación de términos asociados a actividad hidrolasa (24%), seguido por aquellos asociados a actividad transferasa (18%). En cuanto a su relación con los mecanismos de decoloración, más estudiados, es importante destacar que un 11% de los términos se asocian a actividades de oxidación-reducción.

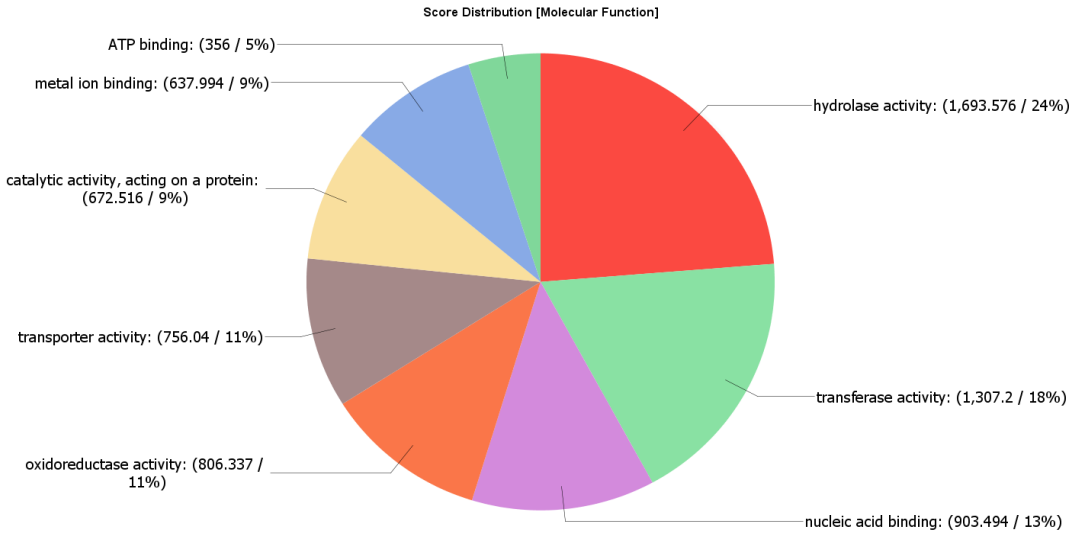


Figura 34. Resultados obtenidos de la ejecución del programa Blast2GO. Representación circular de porcentajes de aparición de términos GO en la categoría funcional de: Función molecular.

Es importante remarcar que esta anotación facilitó el análisis de los datos proteómicos que se describen en el siguiente capítulo, ya que con la clasificación por GO se determina de una manera más simple los procesos, funciones y localizaciones que están sobre-/sub-representadas en un grupo determinado de genes.

3.2.1.2. Caracterización de los genes y/o familia de genes potencialmente involucrados en la decoloración de colorantes en *T. akiyoshidainum* HP 2023

Se pueden usar diferentes términos GO para identificar y agrupar funcionalmente las proteínas que podrían intervenir en la decoloración de colorantes azoicos.

Debido a la naturaleza polar de los colorantes azoicos, estos no atraviesan la membrana plasmática. Por lo tanto, las reacciones claves de oxido-reducción necesarias para su degradación deben ser llevadas a cabo por proteínas secretadas o por proteínas o sistemas redox integrales de la membrana plasmática (Ramalho *et al*., 2005), constituyendo las vías altas de degradación del colorante.

Posteriormente, las moléculas resultantes de la degradación parcial de los colorantes, deben ser metabolizadas en el interior celular, por rutas metabólicas implicadas en la degradación de compuestos xenobióticos, de detoxificación celular y de respuesta al estrés oxidativo (vías bajas de degradación).

Entonces, aquellas proteínas que fueron anotadas con términos GO del dominio ***componente celular*** pertenecientes a la **región extracelular** o como parte **integral de la membrana** y cuya ***función molecular*** asignada es **actividad oxidorreductasa (**u otras más específicas como, por ejemplo, **actividad peroxidasa)**, como así también aquellas proteínas que participan en ***procesos biológicos*** de **detoxificación celular**, **respuesta a estrés oxidativo** o **radicales libres**, permiten tener una idea global de los mecanismos moleculares que *T. akiyoshidainum* emplea durante la degradación de colorantes y compuestos relacionados.

Para facilitar el análisis, los genes identificados fueron divididos en tres grupos, el primer grupo concentró aquellos genes que codifican proteínas que participan en las vías altas de degradación, y que por lo general cumplen su rol en el espacio extracelular. El segundo grupo, englobó aquellos genes de proteínas intracelulares que participan en las vías bajas de degradación y detoxificación del colorante y de sus metabolitos, y finalmente el tercer grupo, incluyó los genes de proteína que participan en la defensa contra el estrés oxidativo y en consecuencia en la detoxificación celular durante el proceso de degradación.

I. Genes involucrados en las vías altas de degradación

Oxidorreductasas involucradas en la oxidación de los enlaces azoicos

Lacasas

En total 36 genes que codifican proteínas en el genoma de *T. akiyoshidainum* HP-2023 fueron anotados con los términos GO correspondientes a componente de la región extracelular, de los cuales 2, TRI28_001542-RA y TRI28_002189-RA codifican oxidorreductasas anotadas como lacasas (Cu-oxidasas), enzimas reportadas por participar en la ruptura oxidativa de los enlaces azoicos de colorantes, primer paso necesario para su degradación. Estas enzimas multicobre oxidasas, por lo general necesitan de ciertos mediadores redox, para lograr una completa decoloración o bien actúan de manera conjunta con otras enzimas, como peroxidasas ligninolíticas (Camarero *et al*., 2005; Liu *et al*., 2004; Bibi & Bhatti, 2012; Singh *et al*., 2016).

Hemo-Peroxidasas y Hemo-Tiolato-Peroxidasas

Las hemo peroxidasas, que comprenden las clásicas peroxidasas ligninolíticas (lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y peroxidasa versátil) y las peroxidasas

decolorante de tintes (DyP por su nombre en inglés dye-decolorizing peroxidases), además de las hemoperoxigenasas, pertenecientes a una gran familia de hemo-tiolato peroxidasas, poco estudiadas hasta el momento, han sido reportados por participar en la degradación de diversos colorantes textiles (Alan *et al*., 2009; Pointing & Vrijmoed, 2000; Xia-Bin *et al*., 2007; Lan *et al*., 2006; Husain, 2010; Sugano *et al*., 2000; Kim & Shoda, 1999; Soto *et al*., 2004; Moreira *et al*., 2006; Camarero *et al*., 2005; Cohen *et al*., 2002).

El análisis funcional con B2GO del genoma de *T. akiyoshidainum* HP-2023 no permitió identificar ninguna peroxidasa ligninolítica clásica. Esto no es sorprendente ya que las levaduras no son organismos ligninolíticos. Sin embargo, no puede descartarse que la falla en la detección de estas enzimas se deba a un artefacto, causado durante el procesamiento de las secuencias.

Se identificaron varios genes anotados con actividad peroxidasa (función molecular asignada), de los cuales particularmente tres podrían tener un rol en la degradación de colorantes. Uno de ellos, TRI28_003136-RA, codifica una DyP peroxidasa, este tipo de peroxidasa fue descubierta por primera vez en hongos, aunque actualmente la mayoría de los registros en bases de datos pertenecen a enzimas de origen bacteriano (Colpa *et al*., 2014), han sido llamadas así debido a la capacidad de degradar un amplio rango de colorantes (Kim *et al*., 1999; Sugano *et al*., 2009). Entre las características más relevantes de esta familia de proteínas podemos mencionar que son activas a pH bajo y son capaces de degradar diversos colorantes eficientemente, en particular colorantes antraquinónicos, los cuales son escasamente degradados por peroxidasa clásicas de hongos, plantas y animales (Ahmad *et al*., 2011, Burner *et al*., 2000; Chen, 2006; Kim *et al*., 1999; Liers *et al*., 2010; Liers *et al*., 2013; Liu *et al*.,2011; Ogola *et al*.,2009).

Las otras dos proteínas con actividad peroxidasa, codificadas por los genes TRI28_007202-RA y TRI28_009939-RA, pertenecen a la familia de hemo-tiolato peroxidasas, un grupo de peroxidasas fúngicas extracelulares (Ruiz-Dueñas *et al*., 2011). Cloroperoxidasas (CPO) y peroxigenasas aromáticas (APO, actualmente llamadas también UPO, por su nombre en inglés *unspecific peroxygenases*), son peroxidasas pertenecientes a esta familia de hemo-tiolato peroxidasas. La baja especificidad de sustrato, la capacidad de catalizar reacciones de halogenación y el hecho de que compartan propiedades catalíticas con peroxidasas, catalasas y citocromo P450 moonxigensas (APO incluso cataliza la oxigenación de sustratos aromáticos), hace a estas

enzimas muy importantes desde un punto de vista biotecnológico (Hofrichter *et al*., 2006).

Oxidasas productoras de H_2O_2

109 genes fueron anotados con términos de GO correspondientes a componentes integrales de membrana y con una función molecular de actividad oxidorreductasa. De este conjunto de genes, cuatro genes que codifican glucosa oxidasas (TRI28_001435-RA, TRI28_004045-RA, TRI28_010120-RA, TRI28_010353-RA), dos aldehído-oxidasas (TRI28_001425-RA, TRI28_007312-RA) y una aril alcohol oxidasa (TRI28_005788-RA) fueron anotadas por el paquete Blast2GO. Se ha propuesto que enzimas con esta y otras actividades relacionadas son la fuente del H_2O_2 necesario para: i) la actividad de peroxidasas ligninolíticas, generalmente en hongos de la pudrición blanca, o ii) la generación de radicales hidroxilos, vía reacciones Fenton, en hongos de la pudrición parda (Martinez *et al*., 2017).

Genes involucrados en los mecanismos reductivos del enlace azoico y mecanismos no-enzimáticos

Adicionalmente, dentro del grupo anterior de 109 genes, se detectaron once genes (TRI28_000522-RA, TRI28_003284-RA, TRI28_005677-RA, TRI28_009225-RA, TRI28_009936-RA, TRI28_003851-RA, TRI28_003992-RA, TRI28_004290-RA, TRI28_002120-RA, TRI28_002121-RA, TRI28_005677-RA) correspondientes a enzimas hierro reductasas (FRE2, FRE3, FRE4, etc.), integrales de membrana. Como se comentó en el capítulo anterior, en *S. cereviceae* este sistema es un componente clave para la actividad azo-reductasa responsable de la degradación reductiva de colorantes azoicos (Ramalho *et al*., 2005). Sin embargo, no se detectó la acumulación de aminas aromáticas en cultivos de *T. akiyoshidainum* HP-2023 en presencia de colorantes azoicos, y durante este análisis no se identificaron genes que codifiquen proteínas con actividad azo-reductasa específica, lo cual sustenta la falta de actividad reportada en el capítulo anterior y re afirma la hipótesis que involucra la participación de un mecanismo oxidativo de degradación de colorantes en este microrganismo.

Por otro lado, estas proteínas reductoras de hierro han sido implicadas en la degradación de compuestos aromáticos mediante química Fenton, proporcionando el Fe^{2+}, imprescindible para que estas reacciones se desarrollen. También, se identificaron

2 genes que codifican proteínas transportadoras de sideróforos (TRI28_003604-RA, TRI28_009753-RA), los cuales tendrían un papel clave en la degradación no enzimática de compuestos aromáticos.

II. Genes involucrados en las vías bajas de degradación

Degradación de xenobiótico y detoxificación celular

Se identificaron 13 genes que codifican citocromos P450, estas proteínas son monooxigenasas inespecíficas, cuya actividad ha sido involucrada en la degradación y detoxificación de compuestos xenobióticos (Singh, 2015). En general, son proteínas integrales de membranas, del retículo endoplasmático, participan en las vías bajas de degradación de xenobióticos actuando a nivel intracelular. Además, se identificaron otras proteínas con actividad monooxigenasa, entre ellas cinco proteínas dimetilanilina monooxigensa (TRI28_003901-RA, TRI28-006579-RA, TRI28_001993-RA, TRI28_006259-RA, TRI28_001859-RA), posiblemente involucradas en el metabolismo oxidativo de compuestos xenobióticos tales como drogas y pesticidas; y una benzoato monooxigensa (TRI28_001927-RA), también perteneciente a la familia de citocromos P450.

Proteínas de estrés oxidativo y detoxificación celular

Se analizaron los sistemas de detoxificación celular y aquellos involucrados en la defensa del estrés oxidativo. Las enzimas como catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y ascorbato peroxidasa (APX) son bien conocidas porque controlan el estrés oxidativo en diversos organismos. Sin embargo, estas enzimas no solo protegen a la célula, sino que también tienen un papel en la decoloración de colorantes reactivos, junto con otras oxidorreductasas (Bedekar *et al*., 2014).

Dos genes (TRI28_005914-RA y TRI28_003186-RA) fueron anotados como SOD, 3 genes (TRI28_000756-RA, TRI28_003134-RA y TR28_009751-RA) codifican CAT bifuncionales ya que, además, tienen actividad peroxidasa y el gen TRI28_00769-RA codifica una APX. Además, se detectaron 4 genes que codifican peroxirredoxinas (TRI28_0100085-RA, TRI28_001447-RA, TRI28_003366-RA, TRI28_001575-RA), 4 genes que codifican tiorredoxinas disulfuro reductasas (TRI28_001454-RA, TRI28_005158-RA, TRI28_004786-RA, TRI28_000181-RA), y otros 4 con actividad

tiorredoxina, involucradas en procesos de detoxificación celular (TR28_000613-RA, TRI28_004584-RA, TRI28_005678-RA, TRI28_005117-RA).

Otros genes que codifican proteínas asociadas a términos GO correspondientes a detoxificación celular y/o con los procesos de estrés oxidativo, fueron: TRI28_009216-RA que codifica un citocromo c peroxidasa, TRI28_002805-RA correspondiente a una hemo-peroxidasa, TRI28_001026-RA similar a una glutatión disulfuro reductasa, TRI28_001287-RA y TRI28_009353-RA que codifican glutatión peroxidasas y un factor de supervivencia SVF1 codificado por el gen TRI28_007162-RA.

En la Tabla 5 se resume los resultados de la caracterización de los genes y/o familia de genes potencialmente involucrados en la decoloración de colorantes en *T. akiyoshidainum* HP-2023, realizada empleando los resultados del programa B2GO

Tabla 5. Genes involucrados potencialmente en la degradación y metabolismo de colorantes en *T. akiyoshidainum* HP-2023.

Genes involucrados en las vías altas de degradación de colorantes y/o compuestos aromáticos relacionados					
Rol propuesto en la degradación	**N° de genes encontrados**	**Descripción**	**Identificador ensamblaje de novo**	**GO ID**	**Nombres GO**
Oxidorreductasas involucradas en la oxidación de los enlaces azoicos	**5 genes**	Lacasa	TRI28_001542-RA	F:GO:0005507; C:GO:005576; C:GO:005618; F:GO:0046972: F:GO:0016491; F:GO:0052716; P:GO:0055114	F: unión de iones Cu; C: región extracelular; C: pared celular: F: actividad oxidorreductasa F: actividad hidroquinona oxidorreductasa P: procesos de oxidoreducción
			TRI28_002189-RA		
		Dye peroxidasa	TRI28_003136-RA	F:GO:0004601; F:GO:0020037; P:GO:0055114; P:GO:0098869	F: actividad de peroxidasa; F: enlace hemo; P: proceso de oxidación-reducción; P: desintoxicación celular oxidante
		Peroxigensa aromática	TRI28_007202-RA	F:GO:0004601; P:GO:0098869	F: actividad de peroxidasa; P: desintoxicación celular oxidante
			TRI28_009939-RA		
Oxidasas productoras de peróxido	**7 genes**	Glucosa oxidasa	TRI28_001435-RA	C:GO:0016020; C:GO:0016021; F:GO:0016614; F:GO:0050660; P:GO:0055114	C: membrana; C: componente integral de la membrana; F: actividad oxidorreductasa, que actúa sobre el grupo de donantes CH-OH; F: flavina adenina dinucleótido de unión; P: proceso de oxidación-reducción
			TRI28_004045-RA		
			TRI28_010120-RA		
			TRI28_010353-RA		
		Aldehído-oxidasa	TRI28_001425-RA	P:GO:0006081; C:GO:0016020; C:GO:0016021; F:GO:0016491; F:GO:0016620; P:GO:0055114	P: proceso metabólico del aldehído celular; C: membrana; C: componente integral de la membrana; F: actividad oxidorreductasa; F: actividad oxidorreductasa, que actúa sobre el grupo aldehído u oxo de los donantes, NAD o NADP como aceptor; P: proceso de oxidación-reducción
			TRI28_007312-RA	C:GO:0016020; C:GO:0016021; F:GO:0016491; P:GO:0055114	C: membrana; C: componente integral de la membrana; F: actividad oxidorreductasa; P: proceso de oxidación-reducción
		Aril alcohol oxidasa	TRI28_005788-RA	F:GO:0008270; C:GO:0016020; C:GO:0016021; F:GO:0016491; F:GO:0046872; P:GO:0055114	F: unión a iones de zinc; C: membrana; C: integral F: actividad oxidorreductasa

Continuación Tabla 5.

Genes involucrados en las vías altas de degradación de colorantes y/o compuestos aromáticos relacionados					
Rol en la degradación	**N° de genes encontrados**	**Descripción**	**Identificador ensamblaje de novo**	**GO ID**	**Nombres GO**
Mecanismos no-enzimáticos: Hierro reductasas y homeostasis celular	**13 genes**	Hierro reductasas	TRI28_000522-RA	C:GO:0016020; C:GO:0016021; F:GO:0016491; P:GO:0055114	C: membrana; C: componente integral de la membrana; F: actividad oxidorreductasa; P: proceso de oxidación-reducción
			TRI28_003284-RA		
			TRI28_005677-RA		
			TRI28_009225-RA		
			TRI28_009936-RA		
			TRI28_003851-RA		
			TRI28_003992-RA		
			TRI28_004290-RA		
		Reductasas quelantes de hierro	TRI28_002120-RA	C:GO:0016021; F:GO:0016491; P:GO:0055114	C: componente integral de la membrana; F: actividad oxidorreductasa; P: proceso de oxidación-reducción
			TRI28_002121-RA		
			TRI28_005677-RA		
		Transportador de sideróforos	TRI28_003604-RA	F:GO:0005506; C:GO:0016020; C:GO:0016021; F:GO:0016705; F:GO:0020037; F:GO:0022857; P:GO:0055085; P:GO:0055114	F: unión a iones de hierro; C: membrana; C: componente integral de la membrana; F: actividad oxidorreductasa, que actúa sobre donantes pareados, con incorporación o reducción de oxígeno molecular; F: enlace de hemo; F: actividad del transportador transmembrana; P: transporte transmembrana; P: proceso de oxidación-reducción
			TRI28_009753-RA		

Continuación Tabla 5.

Genes involucrados en las vías bajas de degradación de colorantes y/o compuestos aromáticos relacionados					
Degradación de xenobióticos y detoxificación celular	**19 genes**	Citocromo P450	TRI28_000663-RA	F:GO:0004497; F:GO:0005506; C:GO:0016020; C:GO:0016021; F:GO:0016705; F:GO:0020037; F:GO:0046872; P:GO:0055114	F: actividad monooxigenasa; F: unión a iones de hierro; C: membrana; C: componente integral de la membrana; F: actividad oxidorreductasa, que actúa sobre donantes pareados, con incorporación o reducción de oxígeno molecular; F: enlace de hemo; F: unión a iones metálicos; P: proceso de oxidación-reducción
			TRI28_001209-RA		
			TRI28_004452-RA		
			TRI28_005626-RA		
			TRI28_006520-RA		
			TRI28_007546-RA		
			TRI28_001956-RA		
			TRI28_002312-RA		
			TRI28_005044-RA		
			TRI28_004967-RA		
			TRI28_009185-RA		
			TRI28_000780-RA		
			TRI28_002045-RA	F:GO:0004497; P:GO:0008152; F:GO:0016705; F:GO:0046872; F:GO:0048037; F:GO:0097159; F:GO:1901363	F: actividad monooxigenasa; P: proceso metabólico; F: actividad oxidorreductasa, que actúa sobre donantes pareados, con incorporación o reducción de oxígeno molecular; F: unión a iones metálicos; F: unión al cofactor; F: unión de compuestos orgánicos cíclicos; F: unión de compuestos heterocíclicos
		Dimetilanilina monooxigensa	TRI28-006579-RA	F:GO:0004497; F:GO:0004499; C:GO:0016020; C:GO:0016021; F:GO:0016491; F:GO:0050660; F:GO:0050661; P:GO:0055114	F: actividad monooxigenasa; F: actividad de N, N-dimetilanilina monooxigenasa; C: membrana; C: componente integral de la membrana; F: actividad oxidorreductasa; F: flavina adenina dinucleótido de unión; F: unión a NADP; P: proceso de oxidación-reducción
			TRI28_003901-RA		

Continuación Tabla 5.

Genes involucrados en las vías bajas de degradación de colorantes y/o compuestos aromáticos relacionados					
Rol en la degradación	**N° de genes encontrados**	**Descripción**	**Identificador ensamblaje de novo**	**GO ID**	**Nombres GO**
Degradación de xenobióticos y detoxificación celular	**19 genes**	Dimetilanilina monooxigensa	TRI28_001993-RA	F:GO:0004497; F:GO:0004499; F:GO:0050660; F:GO:0050661; P:GO:0055114	F: actividad monooxigenasa; F: actividad de N, N-dimetilanilina monooxigenasa; F: unión a FAD; F: unión a NADP; P: proceso de oxidación-reducción
			TRI28_006259-RA		
			TRI28_001859-RA		
		Benzoato 4-monooxigenase	TRI28_001927-RA	F:GO:0004497; F:GO:0005506; C:GO:0016021; F:GO:0016705; F:GO:0020037; P:GO:0055114	F: actividad monooxigenasa; F: unión a iones de hierro; C: componente integral de la membrana; F: actividad oxidorreductasa, que actúa sobre donantes pareados, con incorporación o reducción de oxígeno molecular; F: enlace de hemo; P: proceso de oxidación-reducción
Estrés oxidativo y detoxificación celular	**25**	Ascorbato peroxidasa	TRI28_000769-RA	F:GO:0004601; P:GO:0006979; F:GO:0020037; F:GO:0046872; P:GO:0055114; P:GO:0098869	F: actividad de peroxidasa; P: respuesta al estrés oxidativo; F: enlace de hemo; F: unión a iones metálicos; P: oxidación-reducción
		Superóxido Dismutasa	TRI28_003186-RA	F:GO:0004784; P:GO:0006801; F:GO:0016491; P:GO:0019430; F:GO:0046872; P:GO:0055114	F: actividad de superóxido dismutasa; F: actividad oxidorreductasa; P: eliminación de radicales superóxido; F: unión a iones metálicos; P: proceso de oxidación-reducción

Continuación Tabla 5.

Genes involucrados en las vías bajas de degradación de colorantes y/o compuestos aromáticos relacionados					
Rol en la degradación	**N° de genes encontrados**	**Descripción**	**Identificador ensamblaje de novo**	**GO ID**	**Nombres GO**
Estrés oxidativo y detoxificación celular	**25**	Superóxido Dismutasa	TRI28_005914-RA	P:GO:0001320; F:GO:0004784; C:GO:0005634; C:GO:0005758; C:GO:0005829; P:GO:0006878; P:GO:0006882; P:GO:0019430; P:GO:0031505; P:GO:0036091; P:GO:0045454; F:GO:0046872; P:GO:0050821;	P: Respuesta a especies reactivas de oxígeno.; F:actividad superoxido dismutasa; C:núcleo; C: espacio intermembrana mitocondrial; C:citosol; P: homeostasis celular de iones de cobre; P: homeostasis celular de iones de zinc; P: eliminación de radicales superóxido; P: Organización de la pared celular fúngica; P: Regulación positiva de la transcripción del promotor de la ARN polimerasa II en respuesta al estrés oxidativo; P: homeostasis redox celular; F:union de ion metálico; P:estabilización de proteínas
		Catalasa	TRI28_000756-RA	F:GO:0004096; C:GO:0005777; F:GO:0020037; P:GO:0042542; P:GO:0042744; F:GO:0046872; P:GO:0055114; P:GO:0098869	F: activitividad catalasa; C:peroxisoma; F:union hemo; P:respuesta a peróxido de hidrógeno; P:procesos catabólicos peróxido de hidrógeno; F:unión de ion metálico; P:procesos oxido-reducción; P: desintoxicación celular oxidante
			TRI28_009751-RA		
			TRI28_003134-RA	P:GO:0001315; F:GO:0004096; C:GO:0005759; C:GO:0005782; F:GO:0020037; P:GO:0042542; P:GO:0042744; F:GO:0046872; P:GO:0055114; P:GO:0098869	P: respuesta a especies reactivas del oxigeno; F:actividad catalasa; C: matriz mitocondrial; C: matriz peroxisomal; F:unión hemo; P:respuesta a peróxido de hidrógeno; P: proceso catabólico peróxido de hidrógeno; F:unión de ion metálico; P: procesos oxido-reducción; P: desintoxicación celular oxidante

Continuación Tabla 5.

Genes involucrados en las vías bajas de degradación de colorantes y/o compuestos aromáticos relacionados					
Rol en la degradación	**N° de genes encontrados**	**Descripción**	**Identificador ensamblaje de novo**	**GO ID**	**Nombres GO**
Estrés oxidativo y detoxificación celular	**25**	Peroxirredoxina	TRI28_010085-RA	C:GO:0005623; P:GO:0045454; F:GO:0051920; P:GO:0055114; P:GO:0098869	C:céula; P: homeostasis redox celular; F:actividad peroxiredoxina; P:procesos oxido-reducción; P: desintoxicación celular oxidante
			TRI28_003366-RA	F:GO:0004601; C:GO:0005829; P:GO:0034599; P:GO:0042744; P:GO:0045454; F:GO:0051920; P:GO:0055114; P:GO:0098869	F: actividad peroxidasa; C: citosol; P: respuesta cellular a estrés oxidativo; P: procesos catabólicos peróxido hidrógeno; P:homeostasis redox celular; F: actividad peroxiredoxina; P: procesos oxido-reducción; P: desintoxicación celular oxidante
			TRI28_001447-RA	C:GO:0005623; F:GO:0016209; F:GO:0016491; P:GO:0045454; P:GO:0055114; P:GO:0098869	C: célula; F:actividad antioxidante; F:actividad oxidoreductasa; P: homeostasis redox celular; P: procesos de oxido-reducción; P: desintoxicación celular oxidante
			TRI28_001575-RA	F:GO:0051920; P:GO:0055114; P:GO:0098869	F: actividad peroxiredoxin; P: procesos de oxido-reducción; P: desintoxicación celular oxidante
		Tiorredoxina disulfuro reductasa	TRI28_000181-RA	F:GO:0004791; C:GO:0005737; P:GO:0019430; P:GO:0055114	F: actividad tioredoxin-disulfuro reductasa; C:citoplasma; P:remoción de radical superóxido; P: procesos de oxido-reducción
		Tiorredoxina	TRI28_000613-RA	F:GO:0016209; P:GO:0055114; P:GO:0098869	F:actividad antioxidante; P:procesos de oxido-reducción; P: desintoxicación celular oxidante
			TRI28_004584-RA		
			TRI28_005678-RA		
			TRI28_005117-RA		

Continuación Tabla 5.

Genes involucrados en las vías bajas de degradación de colorantes y/o compuestos aromáticos relacionados					
Rol en la degradación	**N° de genes encontrados**	**Descripción**	**Identificador ensamblaje de novo**	**GO ID**	**Nombres GO**
Estrés oxidativo y detoxificación celular	**25**	Citocromo c-Peroxidasa	TRI28_002805-RA	P:GO:0000302; F:GO:0004130; C:GO:0005758; C:GO:0009507; C:GO:0016020; F:GO:0020037; P:GO:0034599; P:GO:0042744; F:GO:0046872; P:GO:0055114; P:GO:0098869	P: respuesta a especies reactivas del oxigeno; F:actividad citocromo-c peroxidasa; C:espacio intermembrana mitocondrial; C:membrana; F: unión a hemo; P; respuesta cellular a estrés oxidativo; P: peróxido de hidrógeno de proceso; F: unión de iones metálicos; P: procesos de oxido-reducción; P: desintoxicación celular oxidante
		Hemo peroxidasa	TRI28_009216-RA	P:GO:0000302; F:GO:0004601; F:GO:0020037; P:GO:0034599; P:GO:0042744; F:GO:0046872; P:GO:0055114; P:GO:0098869	P: respuesta a especies reactivas del oxigeno; F:actividad peroxidasa; F:unión a hemo; P:respuesta cellular a estrés oxidativo; P: peróxido de hidrógeno de proceso catabólico; F: unión de iones metálicos; P:procesos de oxido-reducción; P: desintoxicación celular oxidante
		Glutatión disulfuro reductasa	TRI28_001026-RA	F:GO:0004362; C:GO:0005737; P:GO:0006749; F:GO:0009055; P:GO:0022900; P:GO:0045454; F:GO:0050660; F:GO:0050661; P:GO:0098869	F: actividad glutatión-disulfuro reductasa; C:citoplasma; P: proceso metabólico del glutatión; F: actividad transferencia de electrones; P: cadena de transporte de electrones; P: homeostasis redox celular; F:unión a FAD; F:unión a NADP; P: desintoxicación celular oxidante
		Glutatión peroxidasa	TRI28_001287-RA	F:GO:0004602; P:GO:0006979; P:GO:0055114; P:GO:0098869	F: glutathione peroxidase activity; P: response to oxidative stress; P: proceso de oxidación-reducción; P: desintoxicación celular oxidante
			TRI28_009353-RA		
		Factor de supervivencia	TRI28_007162-RA	P:GO:0006979	P: respuesta a estrés oxidativo

3.2.2. Anotación funcional con KEGG

Como se mencionó anteriormente, GhostKoala permite la anotación de las enzimas mediante la asignación de identificadores KO, los cuales proporcionan una clasificación funcional a nivel molecular, además, de estar vinculados con las vías metabólicas almacenadas en la base de datos de KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), facilitando su reconstrucción.

De acuerdo a la anotación obtenida en GhostKoala, el 40,3% de las secuencias codificantes (CDS) del genoma de *T. akiyoshidainum* HP-2023 (9019 proteínas predichas) pudieron ser anotadas y se agruparon en 22 grupos ortólogos (Figura. 2.A), siendo los dos más representativos los que incluyen familias de proteínas asociadas al procesamiento de información genética (21 y 22 %), seguido por el de metabolismo de carbohidratos que representa el 10 % de las CDS anotadas con GhostKoala.

En la Figura 35 se pueden ver los resultados de las categorías funcionales de KEGG anotadas en *T. akiyoshidainum* HP-2023 con GhostKoala.

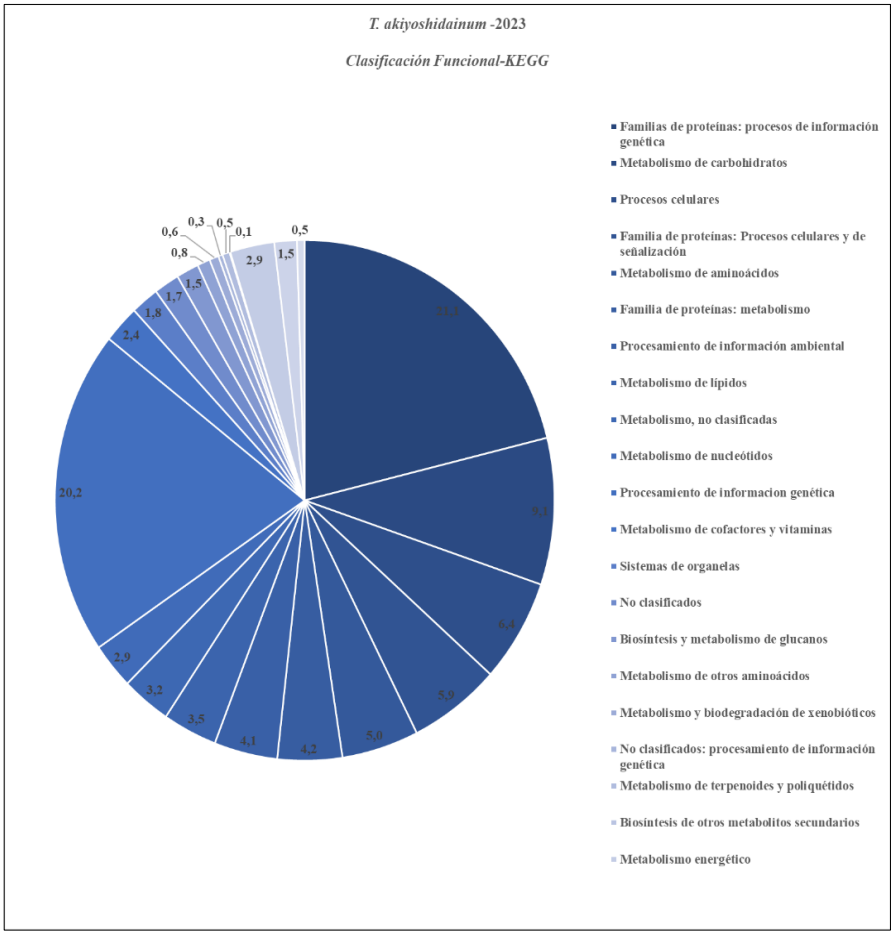


Figura 35. Resultados de las categorías funcionales del genoma de *T. akiyoshidainum* con GhostKoala.

Se compararon los resultados obtenidos con GhostKoala para *T. akiyoshidainum* HP-2023 con los obtenidos para *T. chiarellii* y *T. oleaginosus*. En la Figura 36 se observa que no hay diferencias significativas entre las categorías funcionales.

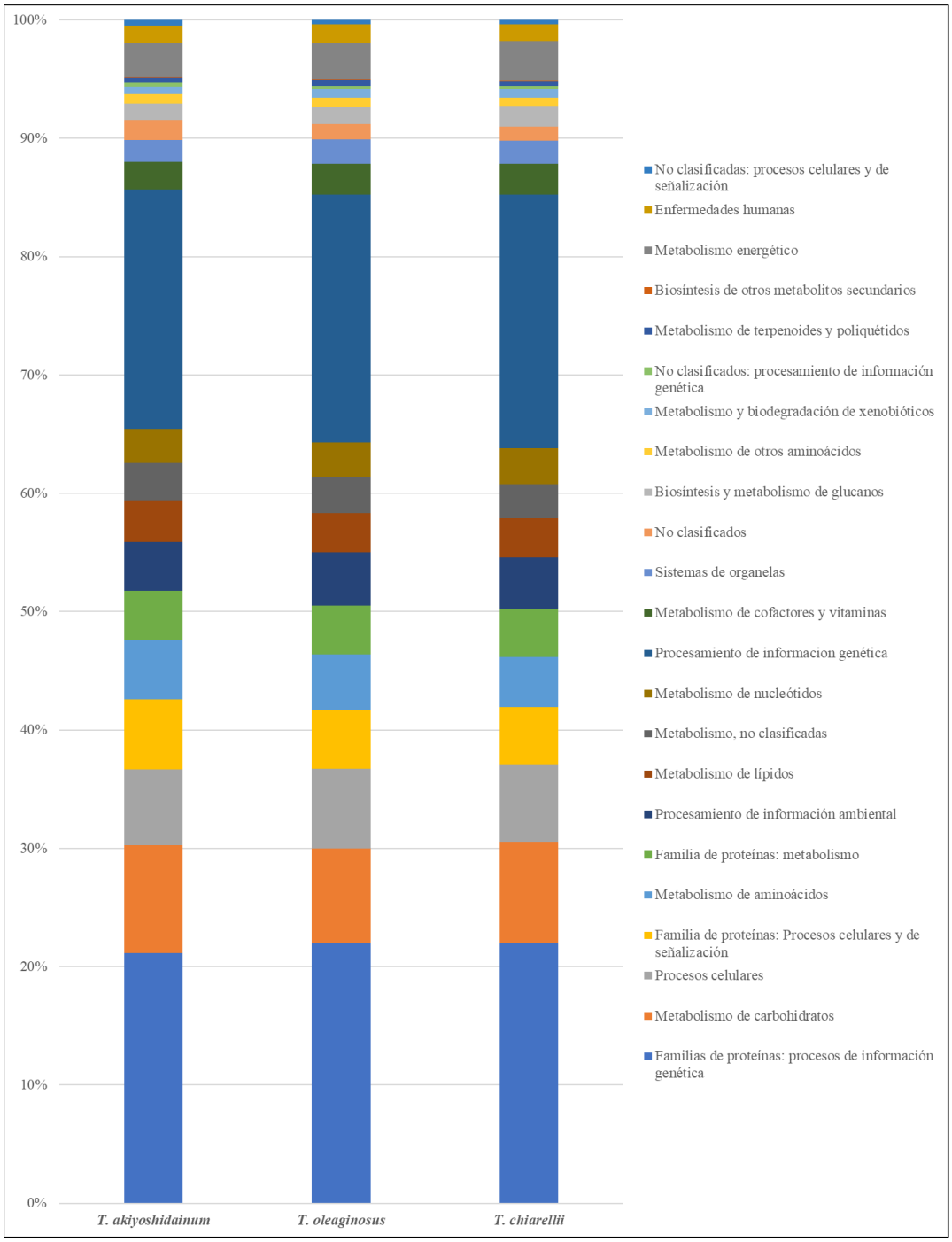


Figura 36. Comparación de los resultados de categorías funcionales anotadas por GhostKoala en los genomas de *T. akiyoshidainum*, *T. oleaginosus* y *T. chiarellii*.

Es importante remarcar que, de todos los grupos funcionales clasificados en los tres microorganismos con este programa, el más involucrado en la decoloración de

colorantes, es el de metabolismo y degradación de xenobióticos. Esta categoría representa solo un 0,61%, 0,76% y 0,74% de los genes anotados con GhostKoala en *T. akiyoshidaynun* HP-2023, *T. oleaginosus* y *T. chiarellii*; respectivamente. Sin embargo, involucran 12 rutas de degradación en *T. akiyoshidainum* y *T. oleaginosus*, y 13 en *T. chiarellii*, además de 3 rutas de metabolismo de xenobióticos y drogas en los tres microorganismos comparados (Tabla 6).

Tabla 6. Rutas metabólicas asociadas a la categoría: METABOLISMO Y DEGRADACIÓN DE XEBOBIÓTICOS, junto con la cantidad de KO asociados.

METABOLISMO Y DEGRADACIÓN DE XEBOBIÓTICOS			
Ruta	N° de KO en *T. akiyoshidainum*	N° de KO en *T. chairellii*	N° de KO en *T. oleaginosus*
Degradación de benzoato	8	8	8
Degradación de aminobenzoato	8	9	9
Degradación de fluorobenzoato	2	2	2
Degradación de cloroalcanos y cloroalquenos	4	4	4
Degradación de clorociclohenano y clorobenceno	4	5	6
Degradación de tolueno	3	4	3
Degradación de xyleno	-	1	-
Degradación de estireno	5	6	5
Degradación de antrazina	2	3	2
Degradación de caprolactámicos	5	5	4
Degradación de dioxinas	1	1	1
Degradación de naftaleno	3	3	3
Degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos	1	1	1
Metabolismo de xenobióticos por citocromo P450	3	3	3
Metabolismo de drogas por citocromo P450	4	5	3
Metabolismo de drogas por otras enzimas	10	12	11

Cada KO asociado a una ruta metabólica corresponde a una actividad enzimática encontrada en la vía, lo cual es independiente del número de genes anotados en el genoma

que participan en la vía. Por ejemplo, para la ruta de degradación de benzoato en ambos microorganismos se encontraron 8 KO, correspondientes a 8 actividades enzimáticas que participan en la vía de degradación. En la Tabla 7, a modo de ejemplo, se reportan los KO para la ruta de degradación de benzoato.

Tabla 7. Se detallan los números KO anotados en la ruta de degradación de benzoato, junto a su definición y número E.C correspondiente a su actividad enzimática, y el microorganismo en él que se anotó.

Degradación de benzoato			
KO	**DEFINICIÓN**	**E.C.**	**MICROORGANISMO**
K00074	3-Hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa	EC 1.1.1.157	*T. akiyoshidainum* *T. chiarellii* *T. oleaginosus*
K002522	Glutaril-CoA deshidrogenasa	EC 1.3.8.6	*T. akiyoshidainum* *T. chiarellii* *T. oleaginosus*
K000481	p-Hidroxibenzoato 3-monooxigenasa	EC 1.14.13.12	*T. akiyoshidainum* *T. chiarellii* *T. oleaginosus*
K00626	Acetil-CoA C-acetiltransferasa	EC 2.3.1.9	*T. akiyoshidainum* *T. chiarellii* *T. oleaginosus*
K01607	4-Carboximuconolactona descarboxilasa	EC 4.1.1.44	*T. akiyoshidainum* *T. chiarellii* *T. oleaginosus*
K03381	Catecol-1,2-dioxigenasa	EC 1.13.11.1	*T. akiyoshidainum* *T. chiarellii* *T. oleaginosus*
K07824	Benzoato-4 monooxigenasa	EC 1.14.14.92	*T. akiyoshidainum* *T. chiarellii* *T. oleaginosus*
K14333	2,3-Dihidroxibenzoato descarboxilasa	EC 4.1.1.46	*T. akiyoshidainum* *T. chiarellii* *T. oleaginosus*

3.3. Identificación de proteínas extracelulares SignalP 4.0

Con el objetivo de poder clasificar las proteínas anotadas en el genoma de *T.akiyoshidainum* HP-2023 en intracelulares y extracelulares, se empleó el servidor SignalP (http:www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/).

SignalP es uno de los programas más citados para la predicción de péptidos señal clásicos (Bendtsen *et al*., 2004b). Este software reconoce péptidos señal en el extremo amino terminal de las proteínas que deben dirigirse a la vía secretora. En contraste a otros

métodos, el SignalP predice además el sitio real de escisión y de este modo el péptido que se separa durante la translocación sobre la membrana.

Esta información es muy útil en el contexto de este estudio. Debido a que el proceso de degradación de colorantes azoicos comienza en el exterior de la célula, la identificación de los genes que codifican proteínas extracelulares es un paso importante en el análisis.

De las 9019 proteínas predichas en el genoma de *T. akiyoshidainum* HP-2023, SignalP fue capaz de reconocer 1015 proteínas con péptidos señal que las dirigen no sólo al exterior celular, sino al interior de otros compartimentos de la vía secretora de eucariotas (aparato de Golgi, retículos endoplasmáticos, vesículas, etc). Entre estas 1015, 506 no tienen una función conocida y entre el resto de las proteínas se encontraron algunas relacionadas a diversos procesos de decoloración de colorantes textiles y/o xenobióticos. Por ejemplo, TRI28_002189-RA, TRI28_007202-RA codifican a una lacasa y una proteína de la familia hemo-tiolato peroxidasa, respectivamente. Ambas proteínas tienen péptidos señal que indican que se liberan al espacio extracelular. Estos genes fueron previamente identificados mediante el programa B2GO. Esta inspección manual también posibilitó identificar una probable peroxidasa ligninolítica, que no fue anotada por el programa B2GO y codificada por el gen TRI28_002299-RA.

Con SignalP también se identificraon 7 genes de proteínas productoras de H_2O_2: TRI28_005769-RA y TRI28_010190-RA codifican glioxal oxidasas. Estas proteínas han sido ampliamente estudiadas por ser componentes esenciales en las vías extracelulares de degradación de lignina en hongos de la pudrición blanca, como por ejemplo en *P. chrysosporium* (Kersten *et al*., 1987, Kersten *et al*., 1990). Los 5 genes restantes codifican proteínas de la familia GMC oxidorreductasas, donde TRI28_001435-RA y TRI28_010120-RA, codifican proteínas similares a glucosa oxidasas. Mientras que los genes TRI28_003038-RA, TRI28_003838-RA y TRI28_004499-RA codifican alcohol oxidasas. Las GMC oxidorreductasas han sido descriptas previamente como proteínas extracelulares productoras de H_2O_2, en diversos hongos (Nishida & Eriksson 1987; Daniel *et al*., 2007; Carro *et al*., 2016). Eichlerová y colaboradores (2006) comprobaron que la decoloración de colorantes sintéticos por hongos está sustancialmente influenciada por la producción extracelular de H_20_2. Por lo tanto, la expresión de alguno de estos genes es esencial durante la decoloración de colorantes textiles por *T. akiyoshidainum* HP2023.

Se identificó el gen TRI28_010353-RA perteneciente a una piranosa deshidrogenasa (PDH, EC 1.1.99.29). Esta proteína es una oxidorreductasa extracelular

monomérica, dependiente de flavina, miembro de la familia glucosa-metanol-colina oxidorreductasa (GMC). Esta enzima es incapaz de utilizar oxígeno como aceptor de electrones, en su lugar utiliza benzoquinonas sustituidas o iones metálicos (Staudigl, *et al*., 2013). A diferencia de las otras GMC oxidorreductasas mencionadas anteriormente, esta proteína no produce H_2O_2, sin embargo, Peterbauer (2010) ha asociado a estas proteínas a Reacciones de Fenton.

También relacionados a la generación de radicales hidroxilos por su asociación a reacciones Fenton, se identificaron dos genes con péptido señal: TRI28_ 007773-RA y TRI28_001049-RA, involucrados en la oxido-reducción de hierro y homeostasis celular. Estas secuencias presentan además dominios transmembranas, por lo que se ubican en la membrana plasmática.

Finalmente, se identificaron 2 genes que codifican citocromos P450: TRI28_002312-RA y TRI28_004947-RA, los cuales ya habían sido identificados con Blast2GO y clasificados dentro de las enzimas que participan en las vías bajas de degradación, a nivel intracelular. La identificación de péptidos señal en estas proteínas, ampliamente reportadas en diversos hongos en procesos de detoxificación/degradación de xenobióticos (Durairaj *et al*., 2016), puede deberse a que son proteínas residentes de las membranas de retículo endoplasmático (RE), parte constituyente de las vías secretoras. En este caso el péptido señal identificado es el que dirige a los citocromos P450 al RE donde luego son retenidas mediante otros mecanismos (Szczesna-Skorupa & Kemper, 2011).

En la Tabla 8 se resume los resultados previamente descriptos de los genes de proteínas extracelulares potencialmente involucradas en la degradación de colorantes textiles, identificados con péptido señal.

Tabla 8. Genes involucrados en las vías altas de degradación de colorantes y/o compuestos aromáticos relacionados que fueron identificados con SignalP.

Genes involucrados en las vías altas de degradación de colorantes y/o compuestos aromáticos relacionados				
Rol propuesto en la degradación	**N° de genes encontrados**	**Descripción**	**Identificador ensamblaje de novo**	**SP**
Oxidorreductasas involucradas en la oxidación de los enlaces azoicos	3 genes	Lacasa	TRI28_002189-RA	si
		Peroxigensa aromática	TRI28_007202-RA	si
		Peroxidasa ligninolítica	TRI28_002299-RA	si
Producción extracelular de H_2O_2	7 genes	Glioxal oxidasa	TRI28_005769-RA	si
			TRI28_010190-RA	si
		Glucosa oxidasa	TRI28_001435-RA	si
			TRI28_010120-RA	si
		Alcohol oxidasa	TRI28_003838-RA	si
			TRI28_004499-RA	si
			TRI28_003038-RA	si
Mecanismos no enzimáticos: Generación de radicales HO° (Homeostasis celular y reducción de Hierro)	1 gen	Piranosa-1-deshidrogenasa	TRI28_010353-RA	si
	2 genes	Fe/Cu Reductasa	TRI28_ 007773-RA	si
		Ferroxidasa	TRI28_ 001049-RA	si

3.4. Identificación de proteínas activas sobre material lignocelolósico

dbCAN

El análisis de las proteínas predichas contra la base de datos de dbCAN posibilitó detectar un total de 351 enzimas activas sobre carbohidratos (CAZymes). Incluyen 166 glicosil hidrolasas (GHs, EC 3.2.1.-), 83 glicosil transferasas (GTs, EC 2.4.x.y), 6 polisacárido liasas (PLs, EC 4.2.2.-), 63 carbohidratos esterasas (CEs) y 33 enzimas con actividades auxiliares (AAs). Adicionalmente, 61 módulos de unión a carbohidratos (CBM) fueron predichos mediante este programa (Figura 37).

Estas enzimas son muy importantes a nivel industrial, particularmente por la emergente industria de biocombustibles, que si bien no es un tema que atañe específicamente a esta tesis doctoral, es una característica muy importante a tener en cuenta dada su importancia tecnológica.

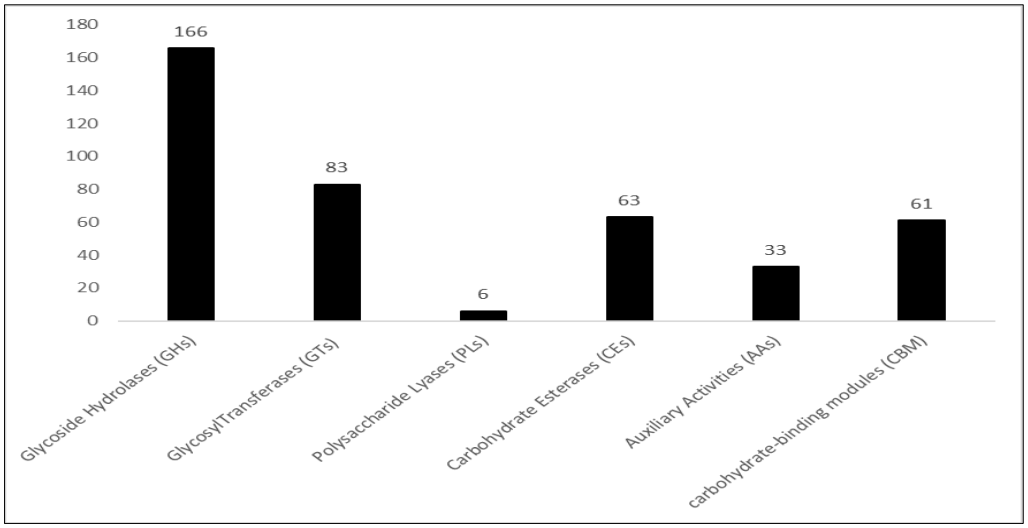


Figura 37. Número de CAZymes en el genoma de *T. akiyoshidainum* HP2023. AA: Actividades auxiliares, CBM: módulos de unión a carbohidratos, CE: carbohidrato esterasas, GH: glicosil hidrolasas; GT: glicosil transferasas; PL: polisacárido liasas.

Especialmente una clase importante de CAZymes, las enzimas con Actividades Auxiliares, participan en la modificación y degradación de la lignina, y fueron implicadas en la decoloración de colorantes a través de mecanismos ligninolíticos (Gil *et al*., 2018). Por lo tanto, las familias de enzimas con AA fueron analizadas en mayor detalle.

Como ya se mencionó, la degradación enzimática de los colorantes textiles es provocada por lacasas, peroxidasas ligninolíticas, DyP peroxidasas, peroxigenasas inespecíficas o citocromo P450 monooxigenasas. Mientras que el mecanismo no enzimático de degradación implica reacciones de Fenton mediadas por quelantes (*Chelator Mediated Fenton Reactions*, CMFR) y está relacionado con la producción de ácidos orgánicos, sideróforos y con la homeostasis del Fe en general. En ambos mecanismos de degradación, la producción de H_2O_2 es fundamental y es impulsada por oxidasas como glucosa oxidasas, aril alcohol oxidasas, celobiosa oxidasa, etc., que también están clasificadas dentro del grupo de Actividades Auxiliares en la esta base de datos dbCAN.

Al analizar los perfiles de proteínas con AA de *T. akiyoshidainum* HP-2023 y compararlos con los perfiles correspondientes a proteínas con AA de *T. chiarelli* y *T. oleaginosus* (Figura 38), los cuales fueron obtenidos también con dbCAN, empleando los archivos de proteínas en formatos FASTA disponibles en la base de datos de *JGI Genome Potal* (*https://genome.jgi.doe.gov/portal/*), se puede observar que tanto *T. akiyoshidainum* como *T. oleaginosus* tienen 9 grupos diferentes de proteínas con

actividades auxiliares, a diferencia de *T. chiarelli*, en el cual se encontraron 8 grupos. Estos carecen de proteínas del grupo AA7, que incluye proteínas del tipo oligosacárido oxidasa y quitooligosacárido oxidasa. Sin embargo, hasta el momento estas proteínas no han sido involucradas en procesos de decoloración.

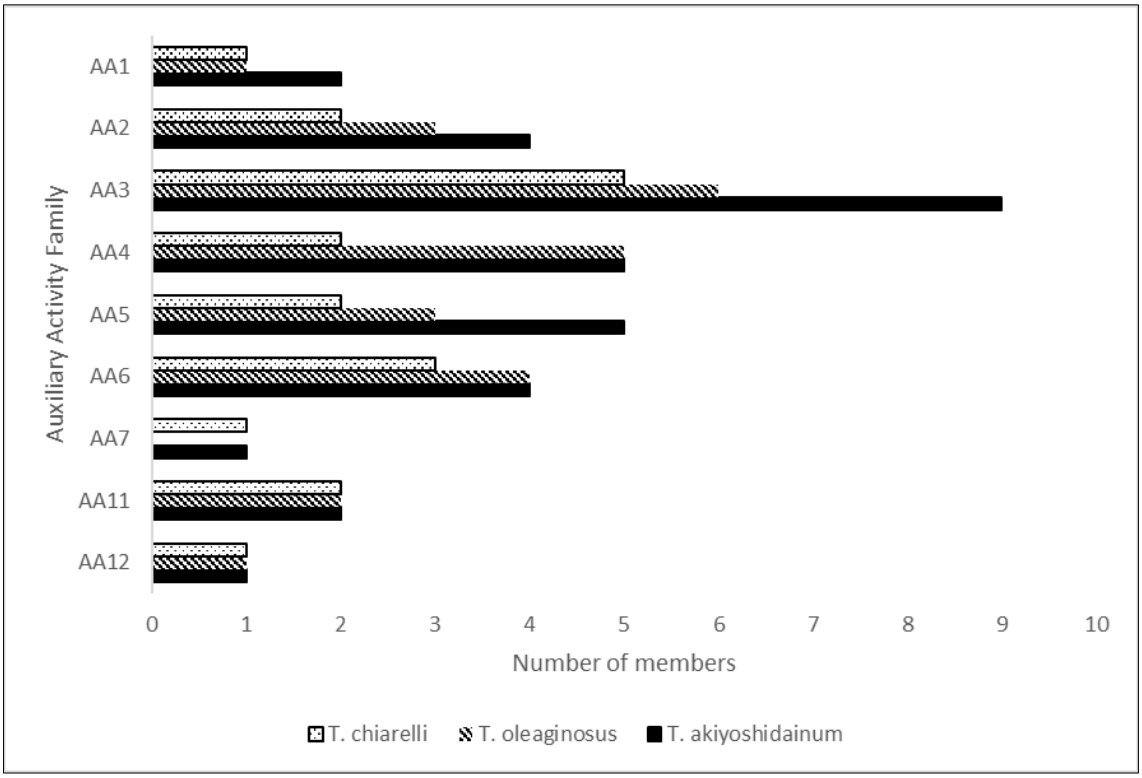


Figura 38. Distribuciones de proteínas de la familia AA de CAZymes en las tres especies, *T. akiyoshidainum*, *T. oleaginosus* y *T. chairelli*. **AA1:** Lacasa/p-difenol:oxigeno oxidoreductasa/ferroxidasa; ferroxidasa; multicobre oxidasa Tipo-Lacasa; **AA2:** manganeso peroxidasa; peroxidasa versátil; lignina peroxidasa; peroxidasa; **AA3:** celobiosa deshidrogenasa; glucosa 1-oxidasa; aril alcohol oxidasa; alcohol oxidasa; piranose oxidasa; **AA4:** vanillil-alcohol oxidasa; **AA5:** Oxidasa con oxigeno como aceptor; galactosa oxidasa; glioxal oxidasa; alcohol oxidasa; **AA6:** 1,4-benzoquinone reductasa; **AA7:** glucooligosacarido oxidasa; chitooligosacarido oxidasa; **AA11:** proteínas dependientes de cobre, polisacaride monooxygenases líticas; participan en la ruptura de cadenas de quitina con oxidación de C-1; **AA12:** proteínas con actividad oxidorreductasa pirroloquinolina quinona-dependiente.

Se observó también que *T. akiyoshidainum* HP-2023 y *T. oleaginosus,* tienen igual número de proteínas de las familias AA4, AA6, AA11 y AA12. Pero, *T. akiyoshidainum* HP-2023 posee un mayor número de proteínas correspondientes a las familias AA1 (lacasa/p-difenol:oxigeno oxidoreductasa/ferroxidasa, ferroxidasa y multicobre oxidasa similares a lacasas), AA2 (manganeso peroxidasas, versátil peroxidasas, lignina peroxidasas y peroxidasas), AA3 (celobiosa deshidrogenasas, glucosa 1-oxidasas, aril

alcohol oxidasas, alcohol oxidasas y piranosa oxidases; y oxidasas con oxígeno como aceptor de electrones) y AA5 (galactosa oxidasas, glioxal oxidasas, y alcohol oxidasas), todas ellas con un papel reconocido en la decoloración de colorantes textiles

De todas estas proteínas, en *T. akiyoshidainum* HP-2023 se encontraron, mediante la anotación con dbCAN, una lacasa y una ferroxidasa (Familia AA1, EC 1.10.3.2 y EC 1.10.3.-), cuatro hemo-peroxidasas modificadoras de lignina de clase II (Familia AA2, EC 1.11.1.-), cinco glucosa oxidasas (Familia AA3, EC 1.1.3.4), dos aril alcohol oxidasas (EC 1.1.3.7), dos alcohol oxidasas (Familia AA3, EC 1.1.3.13), dos galactosa oxidasas (Familia AA5, EC 1.1.3.9) y tres glioxal oxidasas (Familia AA5, EC 1.2.3.15), las cuales están de descriptas en la Tabla 9.

Las proteínas de los grupos AA3 y AA5 son particularmente importante en el contexto en estudio. Como resultado de su actividad catalítica generan peróxido de hidrógeno que es necesario para el funcionamiento de ambos tipos de sistemas de degradación de colorantes: enzimáticos y no enzimáticos. El hecho que la clase AA2, que codifica peroxidasas, se destaque junto con los grupos AA3 y AA5, sugiere una participación conjunta, en un mecanismo de degradación enzimática mediada por peroxidasas. Las proteínas de la familia AA1 codificadas por los genes TRI28_002189-RA y TRI28_001049-RA en el genoma de *T. akiyoshidainum* HP-2023 también pueden estar involucradas en este tipo de degradación. Esta información genética sustenta los resultados de actividades peroxidasas y fenol oxidasa detectadas en los sobrenadantes de cultivo en presencia del colorante azoico Negro Reactivo 5 (Capítulo 1), de manera que estas enzimas son candidatas responsables de las reacciones medidas experimentalmente.

Otras enzimas relacionadas con la degradación de lignina, pero con un papel desconocido en la decoloración de colorantes que fueron anotadas con dbCAN, incluyen dos monooxigensas líticas de polisacáridos (LPMO) de la familia AA11 y una proteína oxidorreductasa dependiente de quinona, perteneciente a la familia AA12 (Tabla 9).

Además de las enzimas productoras de peróxido identificadas, capaces de participar en ambos tipos de mecanismos de degradación de colorantes, el genoma de *T. akiyoshidainum* HP-2023 también contiene otras proteínas relacionadas con el mecanismo no enzimático de la degradación del colorante. Cuatro proteínas predichas podrían estar involucradas en el ciclo de las quinonas, con participación en la química Fenton. Dichas proteínas son miembros de la familia AA6, similares a 1,4-benzoquinona reductasas.

Tabla 9. Genes de *T. akiyoshidainum* potencialmente involucrados en la degradación de colorantes textiles anotados con dbCAN.

Genes involucrados en las vías altas de degradación de colorantes y/o compuestos aromáticos relacionados				
Rol propuesto en la degradación	**N° de genes encontrados**	**Identificador ensamblaje de novo**	**Descripción**	**EC**
Oxidoreductasas involucradas en la oxidación de los enlaces azoicos	AA1	TRI28_002189-RA	Lacasa	1.10.3.2
	AA1	TRI28_001049-RA	Ferroxidasa	1.10.3.-
	AA2	TRI28_000769-RA	Hemo-peroxidasas modificadoras de lignina de clase II	1.11.1.-
	AA2	TRI28_002805-RA		
	AA2	TRI28_009216-RA		
	AA2	TRI28_002299-RA		
Oxidasas productoras de peróxido	AA3	TRI28_001435-RA	Glucosa oxidasa	1.1.3.4
	AA3	TRI28_003838-RA		
	AA3	TRI28_004499-RA		
	AA3	TRI28_004045-RA		
	AA3	TRI28_010120-RA		
	AA3	TRI28_007206-RA	Aril alcohol oxidasa	1.1.3.7
	AA3	TRI28_003038-RA		
	AA3	TRI28_007739-RA	Alcohol oxidasa	1.1.3.13
	AA3	TRI28_008750-RA		
	AA4	TRI28_004044-RA	Vainillin alcohol oxidase (VAO)	1.1.3.38
	AA4	TRI28_004451-RA		
	AA4	TRI28_004920-RA		
	AA4	TRI28_006250-RA		
	AA4	TRI28_008697-RA		
	AA5	TRI28_002891-RA	Galactosa oxidasas	1.1.3.9
	AA5	TRI28_010288-RA		
	AA5	TRI28_004548-RA	Glioxal oxidasas	1.2.3.15
	AA5	TRI28_005769-RA		
	AA5	TRI28_010190-RA		
Ciclo de las quinonas, con participación en la química Fenton (Generación de radicales HO°)	AA6	TRI28_005401-RA	1,4-benzoquinona reductasas	1.6.5.6
	AA6	TRI28_009932-RA		
	AA6	TRI28_000671-RA		
	AA6	TRI28_000504-RA		
Rol desconocido en los procesos de decoloración	AA7	TRI28_009095-RA	Gluco/quitooligosacarido oxidasa	-
	AA11	TRI28_003219-RA	monooxigensas líticas de polisacáridos (LPMO)	-
	AA11	TRI28_009832-RA		
	AA12	TRI28_001818-RA	Deshidrogenasa dependiente de quinona	-

La gran cantidad de CAZymas con actividades auxiliares en el genoma de *T. akiyoshidainum HP-2023* sugiere que la decoloración del colorante es provocada por un mecanismo estrechamente relacionado con los descritos en los hongos ligninolíticos de pudrición blanca y pudrición parda con capacidad de decoloración.

MycoCLAP

La anotación de las proteínas predichas en el genoma de *T. akiyoshidainum* HP-2023 con la base de datos MycoCLAP, facilitó confirmar algunos resultados obtenidos con dbCAN.

De las 351 CAZymes anotadas con dbCAN, 127 fueron anotadas también con MycoCLAP. En la Tabla 10 se comparan las anotaciones obtenidas con ambas bases de datos para enzimas activas sobre carbohidratos.

Tabla 10. Comparación de anotaciones obtenidas con dbCAN y MycoCLAP

FAMILIA DE PROTEÍNA	dbCAN	MycoCLAP
Glicósido Hidrolasas	166	89
Glicósido Transferasas	83	-
Polisacárido Liasas	6	2
Carbohidratos Esterasas	63	7
Actividades Auxiliares	33	16
Módulos de Unión a Carbohidratos	61	13
Total	351	127

Nuevamente haciendo hincapié en las enzimas con Actividades Auxiliares, MycoCLAP anotó a los genes TRI28_000769-RA, TRI28_002805-RA, como dos manganeso peroxidasas y al gen TRI28_002299-RA como una peroxidasa versátil (Negro Reactivo 5:H_2O_2 oxidoreductasa). Mientras que todos los genes restantes de esta categoría (AA) fueron anotados como proteínas productoras de peróxido: glucosa oxidasas, aril alcohol oxidasas o glioxal oxidasas. En la Tabla 11, están las anotaciones de MycoCLAP comparadas con las de dbCAN para proteínas con Actividades Auxiliares, sumado a las predicciones correspondientes para cada secuencia de SignalP.

Este análisis nuevamente pone en evidencia un sistema de degradación enzimática genéticamente disponible para ser puesto en marcha durante la decoloración de colorantes azoicos.

Tabla 11. Genes de *T. akiyoshidainum* HP-2023 potencialmente involucrados en la degradación de colorantes textiles, anotados con MycoCLAP.

Genes involucrados en las vías altas de degradación de colorantes y/o compuestos aromáticos relacionados					
Rol propuesto en la degradación	**Identificador ensamblaje de novo**	**Mejor hit mycoclap**	**Anotación con mycoclap**	**Familia dbCAN**	**PS**
Oxidorreductasas involucradas en la oxidación de los enlaces azoicos	**TRI28_000769-RA**	MPO2D_PHACH	Mn(II)-H_2O_2-oxidoreductasa	AA2	Y
	TRI28_002805-RA	MPO2B_DICSQ	Mn(II)-H_2O_2-oxidoreductasa	AA2	N
	TRI28_002299-RA	VPO2A_PLEER	Negro Reactivo 5: H_2O_2-oxidorreductasa/PV	AA2	Y
Oxidasas productoras de H_2O_2	**TRI28_001435-RA**	AAO3A_PLEPU	aril-alcohol:oxigeno oxidoreductasa	AA3	Y
	TRI28_003038-RA	AAO3A_PLEPU	aril-alcohol:oxigeno oxidoreductasa	AA3	Y
	TRI28_003838-RA	GOX3A_TALVA	beta-D-glucosa:oxigeno 1-oxidorreductasa	AA3	Y
	TRI28_004045-RA	GOX3A_TALVA	beta-D-glucosa:oxigeno 1-oxidoreductasa	AA3	N
	TRI28_004499-RA	GOX3A_ASPNG	beta-D-glucosa:oxigeno 1-oxidoreductasa	AA3	Y
	TRI28_007206-RA	AAO3A_PLEER	aril-alcohol:oxigeno oxidorreductasa	AA3	N
	TRI28_007739-RA	AAO3A_PLEER	aril-alcohol:oxigeno oxidoreductasa	AA3	N
	TRI28_010120-RA	AAO3A_PLEPU	aril-alcohol:oxigeno oxidoreductasa	AA3	Y
	TRI28_002891-RA	GLX5A_PHACH	glioxal oxidasa	AA5	N
	TRI28_004548-RA	GLX5A_PHACH	glioxal oxidasa	AA5	N
	TRI28_005769-RA	GLX5A_PHACH	glioxal oxidasa	AA5	Y
	TRI28_010190-RA	GLX5A_PHACH	glioxal oxidasa	AA5	Y
	TRI28_010288-RA	GLX5A_PHACH	glioxal oxidasa	AA5	Y

3.5. Resumen del análisis genómico

En la Tabla 12 se presenta un resumen global de los genes que podrían intervenir en las distintas etapas del proceso de decoloración de colorantes.

Tabla 12. Genes de *T. akiyoshidainum* HP-2023 potencialmente involucrados en los procesos de decoloración.

Genes involucrados en las vías altas de degradación de colorantes y/o compuestos aromáticos relacionados						
Rol propuesto en la degradación	**Descripción**	**Identificador ensamblaje de novo**	**SP**	**TMH**	**CAZyme dbCAN**	**MycoCLAP**
Oxido-reductasas involucradas en la oxidación de los enlaces azoicos	Lacasa	TRI28_001542-RA	No	-	-	-
		TRI28_002189-RA	Si	-	AA1	-
	Manganeso peroxidasa	TRI28_000769-RA	Si	-	AA2	Mn(II)-H_2O_2 peroxidasa
		TRI28_002805-RA	No	1	AA2	Mn(II)-H_2O_2 peroxidasa
		TRI28_009216-RA	No	-	AA2	
	Peroxidasa Versátil	TRI28_002299-RA	Si	-	AA2	Negro Reactivo 5:H_2O_2 peroxidasa/ Peroxidasa versátil
	Peroxigena-sa aromática	TRI28_007202-RA	Si	1	-	-
		TRI28_009939-RA	No	-	-	-
	Dye peroxidasa	TRI28_003136-RA	Si	-	-	-
Oxidasas productoras de H_2O_2	Glucosa oxidasa	TRI28_001435-RA	Si	1	AA3	aril-alcohol:oxigeno oxidoreductase
		TRI28_004045-RA	No	1	AA3	beta-D-glucosa:oxigeno 1-oxidoreductasa
		TRI28_010120-RA	Si	1	AA3	aril-alcohol:oxigeno oxidoreductasa
		TRI28_003838-RA	Si	-	AA3	beta-D-glucosa:oxigeno 1-oxidoreductasa
		TRI28_004499-RA	Si	-	AA3	beta-D-glucosa:oxigeno 1-oxidoreductasa
		TRI28_010353-RA	No	-	-	-
	Piranosa-1-deshidrogen asa	TRI28_010353-RA	Si	-	-	-
	Glioxal oxidasa	TRI28_003079-RA	Si	-	-	-
		TRI28_005769-RA	Si	-	AA5	glioxal oxidasa
		TRI28_010190-RA	Si	-	AA5	glioxal oxidasa
		TRI28_004548-RA	No	1	AA5	glioxal oxidasa
	Galactosa oxidasa	TRI28_002891-RA	No	-	AA5	glioxal oxidasa
		TRI28_010288-RA	No	1	AA5	glioxal oxidasa

Rol propuesto en la degradación	Descripción	Identificador ensamblaje de novo	SP	TMH	CAZyme dbCAN	MycoCLAP
Oxidasas productoras de H_2O_2	Aril alcohol oxidasa	TRI28_005788-RA	No	-	-	-
		TRI28_003038-RA	Si	-	AA3	aril-alcohol:oxigeno oxidoreductasa
		TRI28_007206-RA	No	-	AA3	aril-alcohol:oxigeno oxidoreductasa
		TRI28_008750-RA	No	-	AA3	-
		TRI28_007739-RA	No	-	AA3	aril-alcohol:oxigeno oxidoreductase
	Aldehído alcohol oxidasa	TRI28_001425-RA	No	-	-	-
		TRI28_007312-RA	No	4	-	-
Mecanismos no-enzimáticos: participación en la química Fenton (Generación de radicales HO°) **Hierro reductasas**	Hierro reductasas	TRI28_000522-RA	No	7	-	-
		TRI28_003284-RA	No	7	-	-
		TRI28_005677-RA	No	6	-	-
		TRI28_009225-RA	Si	6	-	-
		TRI28_009936-RA	No	7	-	-
		TRI28_003851-RA	No	7	-	-
		TRI28_003992-RA	No	7	-	-
		TRI28_007773- RA	Si	7	-	-
		TRI28_004290-RA	No	7	-	-
Homeostasis celular	Reductasas quelantes de hierro	TRI28_002120-RA	No	5	-	-
		TRI28_002121-RA	No	1	-	-
		TRI28_005677-RA	No	1	-	-
	Ferroxidasa	TRI28_001049-RA	Si	6	AA1	-
	Transporta-dor de sideróforos	TRI28_003604-RA	No	12	-	-
		TRI28_009753-RA	No	12	-	-
Ciclo de las quinonas	1,4-Benzoquinona reductasa	TRI28_005401-RA	No		AA6	-
		TRI28_009932-RA	No		AA6	-
		TRI28_000671-RA	No		AA6	-
		TRI28_000504-RA	No		AA6	-
Genes involucrados en las vías bajas de degradación de colorantes y/o compuestos aromáticos relacionados						
Degradación de xenobióticos y detoxificación celular	Citocromo P450	TRI28_000663-RA	No	1	-	-
		TRI28_001209-RA	No	2	-	-
		TRI28_004452-RA	No	-	-	-
		TRI28_005626-RA	No	2	-	-
		TRI28_006520-RA	No	1	-	-
		TRI28_007546-RA	No	-	-	-
		TRI28_001956-RA	No	3	-	-
		TRI28_002312-RA	Si	2	-	-
		TRI28_005044-RA	No	2	-	-
		TRI28_004967-RA	No	-	-	-
		TRI28_009185-RA	No	-	-	-
		TRI28_000780-RA	No	-	-	-
		TRI28_002045-RA	No	-	-	-
		TRI28_006642-RA	No	1	-	-

Rol propuesto en la degradación	Descripción	Identificador ensamblaje de novo	SP	TMH	CAZyme dbCAN	MycoCLAP
Degradación de xenobióticos y detoxificación celular	Citocromo P450	TRI28_004947-RA	Si	-	-	-
		TRI28_008104-RA	Si	1	-	-
	Dimetilan-ilina Monooxige-nasa	TRI28-006579-RA	No	2	-	-
		TRI28_003901-RA	Si	2	-	-
		TRI28_001993-RA	No	-	-	-
		TRI28_006259-RA	No	-	-	-
		TRI28_001859-RA	No	-	-	-
	Benzoato-4 monooxige-nasa	TRI28_001927-RA	Si	-	-	-
Estrés oxidativo y detoxificación celular	Super oxido dismutasa	TRI28_003186-RA	Si	-	-	-
		TRI28_005914-RA	No	-	-	-
	Catalasa	TRI28_000756-RA	No	-	-	-
		TRI28_009751-RA	No	-	-	-
	Peroxiredo-xina	TRI28_010085-RA	No	-	-	-
		TRI28_003366-RA	No	-	-	-
		TRI28_001447-RA	No	-	-	-
		TRI28_001575-RA	No	-	-	-
	Tioredoxina disulfuro reductasa	TRI28_000181-RA	No	-	-	-
	Tioredoxina	TRI28_000613-RA	No	-	-	-
		TRI28_004584-RA	No	-	-	-
		TRI28_005678-RA	No	-	-	-
		TRI28_005117-RA	No	-	-	-
	Glutatión disulfuro reductase	TRI28_001026-RA	No	-	-	-
	Glutatión peroxidasa	TRI28_001287-RA	No	-	-	-
		TRI28_009353-RA	No	-	-	-
	Factor de supervi-vencia	TRI28_007162-RA	No	-	-	-

4. CONCLUSIONES PARCIALES

- El análisis del genoma, a través de diversos programas bioinformáticos, más el análisis y anotación manual de los datos, reveló la presencia de números genes responsables de la habilidad decolorarte de *T. akiyoshidainum* HP-2023.
- Se identificaron genes que codifican enzimas que participan en la degradación enzimática oxidativa de colorantes, como así también en la modulación de reacciones Fenton responsables de los mecanismos no-enzimáticos de degradación.
- Las vías reductivas estan ausentes, no se encontraron genes relacionados a proteínas azo-reductasas o DCIP reductasas, caracterizadas en los procesos de degradación reductiva de colorantes azoicos. Estos resultados sostienen la teoría de un proceso de degradación estrictamente oxidativo.
- La secuenciación del genoma de *T. akiyoshidainum* HP-2023 y posteriormente su anotación, proporcionaron un recurso útil para el estudio de los mecanismos de degradación de colorantes textiles por las levaduras basidiomiceas. Esto representa también un recurso importante para entender los mecanismos de modificación de la lignina, tanto en *T. akiyoshidainum* HP-2023 como en otras levaduras relacionadas del mismo género.

Capítulo 3

Estudio Proteómico de la degradación del colorante textil Negro Reactivo 5 por *T. akiyoshidainum* HP-2023

CAPÍTULO 3

Estudio Proteómico de la degradación del colorante textil Negro Reactivo 5 por *T. akiyoshidainum* HP-2023

1. INTRODUCCIÓN

En el capítulo anterior, con el objetivo de tener una mayor comprensión de los mecanismos de degradación de colorantes textiles en *T. akiyoshidainum* HP-2023 se identificaron los genes que podrían estar involucrados en el proceso de decoloración de Negro Reactivo 5, permitiendo al microorganismo resistir y degradar eficientemente estos contaminantes. Sin embargo, solo algunos de esos genes son realmente expresados durante el proceso en estudio.

1.1. Proteómica

El término proteómica fue acuñado en 1997 como una analogía a genómica, el estudio de los genes (James, 1997). La palabra "proteoma" es la fusión de "proteína" y "genoma", y fue acuñada por Marc Wilkins en 1994, mientras trabajaba en ese concepto como estudiante de doctorado (Wilkins *et al*., 1996). El proteoma es la dotación completa de proteínas, incluyendo las modificaciones hechas a un conjunto particular de proteínas, producidas por un organismo o sistema. Esto varía con el tiempo y con requisitos diferentes, o debido al estrés que sufre una célula o un organismo (Martínez de Bartolomé Izquierdo, 2013).

La descripción del proteoma permite tener una imagen dinámica de todas las proteínas expresadas, en un momento dado y bajo determinadas condiciones concretas de tiempo y ambiente. El estudio y comparación sistemáticos del proteoma en diferentes situaciones metabólicas posibilita identificar aquellas proteínas cuya presencia, ausencia o alteración se correlaciona con determinados estadios fisiológicos. Por tanto, la comparación entre los proteomas de *T. akiyoshidainum* HP-2023 en medios con y sin colorantes proporciona una comprensión más detallada del proceso de decoloración.

1.1.2. "Shotgun Proteomics"

El estudio a gran escala de proteínas ha requerido de la evolución convergente de 1) técnicas de separación de proteínas y/o péptidos, 2) técnicas de identificación masiva

mediante espectrometría de masas, 3) un crecimiento extraordinario de las bases de datos generadas por los proyectos de secuenciación masiva de genomas, 4) un desarrollo sin precedentes de algoritmos computacionales que vinculan los datos experimentales con los lenguajes propios de las bases de datos (Sinitcyn *et al*., 2018).

Actualmente la Proteómica de Segunda Generación, llamada en inglés "*shotgun proteomics*", facilita el análisis de muestras complejas por medio de la combinación de la digestión de los extractos proteicos con endoproteasas, seguida de la separación de alto rendimiento por cromatografía líquida de los péptidos generados, combinada con la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) (Washburn *et al*., 2001). Luego pueden utilizarse diversos motores de búsqueda que identifican y cuantifican las proteínas presentes en la muestra a partir de los péptidos analizados.

Las técnicas de segunda generación permiten realizar un análisis global y sistemático de los proteomas, produciendo un mapa exhaustivo de las proteínas existentes en una muestra, sin necesidad de realizar una separación de proteínas previa que, en la mayoría de los casos, es costosa en tiempo y material, y es poco reproducible.

En la actualidad, el análisis posterior de los datos de proteómica sigue siendo un arte. No siempre hay una sola manera correcta de llegar a conclusiones biológicamente significativas (Sinitcyn *et al*., 2018).

1.1.3. Proteómica cuantitativa

Dentro de los diferentes enfoques de la proteómica basada en espectrometría de masas, la proteómica cuantitativa, determina el cambio en la abundancia de las proteínas sintetizadas por un organismo en diferentes condiciones. Esta metodología posibilita identificar y determinar proteínas claves de un proceso biológico.

En este trabajo de Tesis se utilizó la proteómica cuantitativa basada en espectrometría de masas para comprender el mecanismo de degradación del colorante azoico Negro Reactivo 5 por *T. akiyoshidainum* HP-2023.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Microorganismo y medio de cultivo

En todos los ensayos proteómicos del metabolismo de degradación de Negro Reactivo 5 se utilizó la cepa *T. akiyoshidainum* HP-2023 (ATCC MYA-4129).

El medio NDM_2 (composición en g/L: lactosa, 10; extracto de levadura, 1; KH2PO4, 1; MgSO4.7H2O, 1; urea, 5) fue empleado en todos los experimentos. En este medio la decoloración de Negro Reactivo 5 se debe principalmente a un proceso de degradación oxidativo (Capítulo 1).

En los ensayos se comparó el proteoma de la levadura en cultivos con Negro Reactivo 5 contra el proteoma del microorganismo en condiciones control, sin colorante.

Los ensayos de decoloración se realizaron en *Erlenmeyers* de 500 mL con 100 mL de medio, adicionados con Negro Reactivo 5 Vilmafix en una concentración final de 200 mg L^{-1} o sin colorante (en los cultivos control). Como inóculo se utilizaron 10 mL de una suspensión de levaduras (DO550=0,8) obtenido luego de 24 h de cultivo en medio NDM_2 sin colorante. Los cultivos se incubaron a 25ºC y 250 rpm durante el tiempo requerido según el ensayo.

2.2. Obtención de extractos proteicos extracelulares para la determinación del tiempo de muestreo para estudios proteómicos.

Para obtener los extractos proteicos extracelulares para la determinación del tiempo de muestreo, se realizaron ensayos de decoloración, en las condiciones previamente descriptas. A partir de estos se tomaron muestras de 5 mL a las 0, 4, 8, 12 y 24 horas. Las células fueron removidas por centrifugación a 3500 rpm por 10 min a 4 °C. Luego los sobrenadantes fueron esterilizados por filtración con filtros estériles Millipore de 0,22 μm. Las proteínas en las muestras se concentraron usando centricones pre-lavados con un *cut off* de 10 KDa y 15 mL de volumen final (*Macrosep Advance*, Pall). Estos dispositivos se cargaron con 5 mL de sobrenadante, los cuales se concentraron 10 veces, hasta un volumen final de 0,5 mL. Las muestras fueron lavadas dos veces durante la concentración con buffer acetato 10 mM, pH 4. La concentración se llevó a cabo a 4 °C y 10000 rpm.

2.2.1. Electroforesis monodimensional en geles de poliacrilamida: SDS PAGE

La determinación del tiempo de muestreo más adecuado para la comparación de los proteomas de la levadura en ambas condiciones (con y sin colorante) se llevó a cabo mediante el análisis y comparación de los perfiles proteicos extracelulares correspondientes a diferentes tiempos (0, 4, 8, 12 y 24 horas).

Para realizar esta comparación, se realizaron electroforesis monodimensionales en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida al 12 % (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970; Schägger y von Jagow, 1987). Las muestras se prepararon mezclando 20 µL de muestra más 5 µL de buffer de carga (4x), luego 15 µL de cada mecla fueron cargados en los pocillos de un gel de poliacrilamida al 12%. Para una máxima sensibilidad, la tinción del gel fue realizada con plata (Gharahdaghi & Weinberg *et al*.,1999).

2.3. Obtención de extractos proteicos extracelulares para el análisis proteómico cuantitativo por espectrometría de masas

Para la obtención de los extractos proteícos extracelulares para espectrometría de masa, se realizaron nuevamente los ensayos de decoloración en las condiciones previamente descriptas. Se tomaron 100 mL de muestras a las 12 h de cultivo, tiempo correspondiente a la fase final de remoción del colorante Negro Reactivo 5, según fue determinado en el ensayo anterior. Las células fueron removidas por centrifugación a 3500 rpm por 10 min a 4 ° C. Los sobrenadantes se esterilizaron por filtración con filtros estériles Millipore de 0,22 µm. Las proteínas en los sobrenadantes se concentraron usando concentradores Amicon (50 mL de volumen final) presurizados con nitrógeno, con membranas de ultrafiltración de 10 KDa (*EMD Millipore CorporationUltracel*). Las membranas fueron pre-lavadas con buffer acetato 10 mM, pH 4. Se cargaron 45 mL de sobrenadante en los concentradores, se redujo el volumen hasta 1 mL. Luego el extracto fue lavado con 45 mL de buffer bicarbonato de amonio 50 Mm (pH 7,8), el mismo buffer empleado para disolver las proteínas para su identificación por espectrometría de masas. El volumen fue nuevamente reducido a 1 mL final, por lo que los extractos proteicos quedaron concentrados 45 veces (45X) con respectos a los sobrenadantes de cultivo. Todo este procedimiento se llevó a cabo manteniendo las muestras a 0°C en hielo.

2.4. Obtención de extractos proteicos intracelulares para el análisis proteómico cuantitativo por espectrometría de masas

Trichosporon akiyoshidainum HP-2023 se cultivó en las mismas condiciones descriptas para el estudio de proteínas extracelulares. Las células, crecidas en presencia y ausencia de colorante, fueron cosechadas a las 12 horas de tratamiento, se lavaron con buffer de extracción: Tris-HCl 50 mM pH 7,5 más una mezcla de inhibidores de proteasas (*Complete Mini Tablet, Roche*) y PMSF (fluoruro de fenil-metilsulfunilo, por sus siglas en inglés de *phenyl-methylsulfunyl fluoride*).

Las células fueron resuspendidas en buffer de extracción hasta alcanzar una DO_{550}= 2,5. Posteriormente, 1 mL de esta suspensión se colocó en tubos de 2 mL que tenían ¼ de su volumen con perlas de vidrio de 0,5 mm, pre-lavadas con ácido (*Scientific Industries, Inc.*). La mezcla fue agitada en bead beater durante 16 ciclos de 30 segundos, con intervalos de 10 segundos entre cada ciclo. Los tubos fueron colocados en hielo, cada dos ciclos de ruptura (60 segundos), para enfriar las muestras.

Una vez terminada la lisis celular, cada muestra fue centrifugada a 1500 x*g* por 15 minutos a 4°C en una ultracentrífuga Beckman L8-70, para remover las células intactas.

2.5. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó por el método del ácido bicinconínico (BCA). Se utilizó un kit comercial (*Pierce TM BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific*). Para la calibración del método se empleó como estándar albumina de suero bovino. En las muestras extracelulares se realizó una precipitación previa a la cuantificación con ácido tricloroacético (TCA, por sus siglas en inglés) para eliminar las sustancias que pudieran interferir en la cuantificación (*Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA*).

2.6. Identificación de proteínas por espectrometría de masas.

2.6.1. Preparación de los extractos peptídicos para cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (nanoLC-MS/MS)

2.6.1.1. Extractos proteicos extracelulares: Digestión de proteínas en solución

La digestión de las proteínas obtenidas del medio extracelular, se realizó con un volumen de muestra conteniendo 10 µg de proteínas. Este se llevó a sequedad total en un *SpeedVac*. Luego fueron disueltas en buffer bicarbonato de amonio 50 Mm, pH 7,8 con

urea 8 M y ditiotreitol (DTT) 5 mM e incubadas a 37 °C durante 1 hora. Posteriormente se adicionó iodoacetamida (IAA) en una concentración final de 15 Mm. Se incubaron por un tiempo adicional de 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Después, la solución fue diluida con tres volúmenes de tampón bicarbonato de amonio 50 mM pH 7,8 para su posterior digestión con tripsina. *Trypsin Gold* (Promega) fue añadida a cada muestra en una proporción de 1:50 (tripsina:proteina). La mezcla de reacción, 480 µL de volumen total, fue incubada durante 18 h a 30 °C (Protocolo para digestión de proteínas en solución, *Promega Gold*). Las muestras digeridas fueron acidificadas con ácido trifluoroacético (1%, concentración final). Luego fueron pasadas dos veces a través de una columna de desalinización Zip-Tic C18. Los péptidos eluidos fueron secados en *SpeedVac* y resuspendidos en 60 µL de acetonitrilo al 5 %: ácido fórmico 0,1 % (ACN:FA).

2.6.1.2. Extractos proteicos intracelulares: Digestión de proteínas en gel

Frecuentemente la digestión de proteínas de una muestra compleja para su posterior identificación por espectrometría de masas se realiza en gel (*in-gel digestión*).

En este trabajo se cargaron volúmenes de muestras correspondientes a 10 µg de proteínas en un gel de poliacrilamida al 12%. Se corrió solamente la muestra en el gel concentrador, de manera de concentrar todas las proteínas en una sola banda. Se procedió a la tinción del gel con *Coomasie Safe Blue (BioRad)* para la visualización de la única banda correspondiente a cada una de las muestras. Posteriormente, con un bisturí se procedió a cortar las bandas de proteínas del gel. Se colocaron las bandas en tubo de microcentrífuga de 0,5 mL, los cuales fueron previamente lavados dos veces con acetonitrilo (ACN) al 50%/ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1%. Se añadió 0,2 mL de NH_4HCO_3 100 mM/ACN 50%. Los tubos se incubaron durante 45 min a 37°C para remover el colorante. A continuación, los pasos de digestión se realizaron siguiendo el protocolo establecido para la digestión de proteínas en gel, proporcionado por PROMEGA para "*Trypsin Gold Mass Spectrometry Grade*".

2.6.2. Análisis por LC-MS/MS

El análisis proteómico se llevó a cabo por Nano-LC-MS/MS, con un sistema Thermo EASY nLC II LC acoplado a un espectrómetro de masas Thermo LTQ Orbitrap equipado con una fuente iónica por nanospray.

Los péptidos trípticos fueron resuspendidos en 30 mL de solución de solubilización que contenía: 97% de agua, 2% de acetonitrilo (ACN) y 1% de ácido fórmico (FA). Un volumen de 2 µL de cada muestra, correspondiente aproximadamente a 200 ng de péptidos trípticos, fue inyectado en una columna *in-house* de 10 cm × 75 µm empaquetada con una fase estacionaria de *Phenomenex Jupiter* C18 (tamaño de partícula: 3 µm; y tamaño de poro 100 Å). Los péptidos se eluyeron con un gradiente de 70 min (para proteínas extracelulares) y 90 min (para proteínas intracelulares) a una velocidad de flujo de 400 nL/min con una fase móvil A (96.9% de agua, 3% ACN y 0.1% FA) y B (97% ACN, 2.9% de agua y 0.1% FA).

Los espectros de masas (m/z 400-1400) se obtuvieron en el Orbitrap con una resolución de 60.000 para m/z 400 a una velocidad de escaneo de 1Hz (resolución máxima >100.000 para m/z 400). Luego los 10 picos más intensos de cada espectro de MS fueron seleccionados para la fragmentación MS/MS en trampa lineal con opción de exclusión dinámica.

La fragmentación de los péptidos se realizó utilizando una disociación inducida por colisión a una energía de colisión normalizada del 35% con un tiempo de activación de 10 ms.

2.6.3. Identificación y cuantificación de proteínas

Los datos obtenidos se analizaron mediante el software *Thermo Proteome Discover* (v2.1, SP1) utilizando el motor de búsqueda SEQUEST. Este programa permite identificar los péptidos y asignar un valor de área a cada proteína. Para la identificación de los péptidos se utilizó la base de datos obtenida del análisis del genoma de *Trichosporon akiyoshidainum* HP-2023.

Para la búsqueda en la base de datos se seleccionó tripsina como enzima empleada para una digestión total (*full*) y el máximo número de lugares de corte perdidos permitidos fue 2. Las tolerancias de masa del ión precursor y el ión fragmento se establecieron en 10 ppm y 0.7, respectivamente.

Se admitieron modificaciones dinámicas en residuos de metionina (oxidación, +15.994915 Da) y residuos de cisteína (carbamidometilación, +57.021464 Da). Únicamente se reportaron péptidos y proteínas con un elevado índice de confianza (false discovery rate <1%).

Solo proteínas con dos o más de dos péptidos identificados fueron consideradas para el análisis.

Para determinar las proteínas diferencialmente expresadas se llevó a cabo un análisis estadístico de los datos utilizando el software Perseus v. 1.5.5.3. Los valores de área fueron expresados como log_2. Los resultados obtenidos para la condición con colorante (CC) fueron comparados con la condición control, sin colorante (SC). Las proteínas se consideraron significativamente sobre-reguladas cuando:

i) el *test T de Student* mostró un valor de $p < 0,05$;

ii) mostraron un cambio relativo mayor a 2 entre las abundancias promedio (*fold change* > 2).

De acuerdo al software Perseus, el valor de *p* se expresó como *-log p*, donde un valor igual o mayor a 1,3 indicaba una diferencia significativa entre las abundancias. Se calculó también un parámetro denominado *T-test Difference CC-SC*, que contempla la diferencia entre el promedio de las áreas de cada proteína en las condiciones CC y SC ($log_2 CC - log_2 SC$). Los parámetros *-log p* y *T-test Difference* se utilizaron para construir un gráfico de distribución de proteínas (*Volcano Plot*), que representa la distribución de las proteínas en relación a sus abundancias en ambas condiciones.

2.7. Categorización funcional de las proteínas

Las proteínas sobre-reguladas en CC y SC se agruparon de acuerdo a su función utilizando la herramienta bioinformática BlastKOALA que asigna una función a cada proteína identificando las vías metabólicas en las que la proteína participa (Kaneshia *et al*., 2016).

La información obtenida posibilitó obtener un panorama general de las proteínas involucradas en la degradación del colorante y el contexto metabólico de *T. akiyoshidainum* HP-2023 durante el proceso.

2.8. Identificación y análisis de expresión de las proteínas involucradas en la degradación del colorante textil Negro Reactivo 5

Posteriormente, se realizó un análisis más detallado de los resultados obtenidos, enfocado en el estudio de las enzimas codificadas por los genes analizados en el Capítulo 2. Estas fueron divididas en categorías, según interviniesen en las vías altas de

degradación, en las vías bajas de degradación, en los mecanismos de detoxificación o en los mecanismos de respuesta al estrés oxidativo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Determinación del tiempo de muestreo para el estudio proteómico

A fin de determinar el punto más conveniente en el tiempo para realizar los estudios proteómicos del proceso de decoloración, se tomaron muestras a tiempo inicial y a las 4, 8, 12 y 24 horas de cultivo, tanto en presencia como en ausencia del colorante. Se analizó el perfil proteico de las muestras mediante SDS-PAGE. En la Figura 39 se muestran los resultados obtenidos.

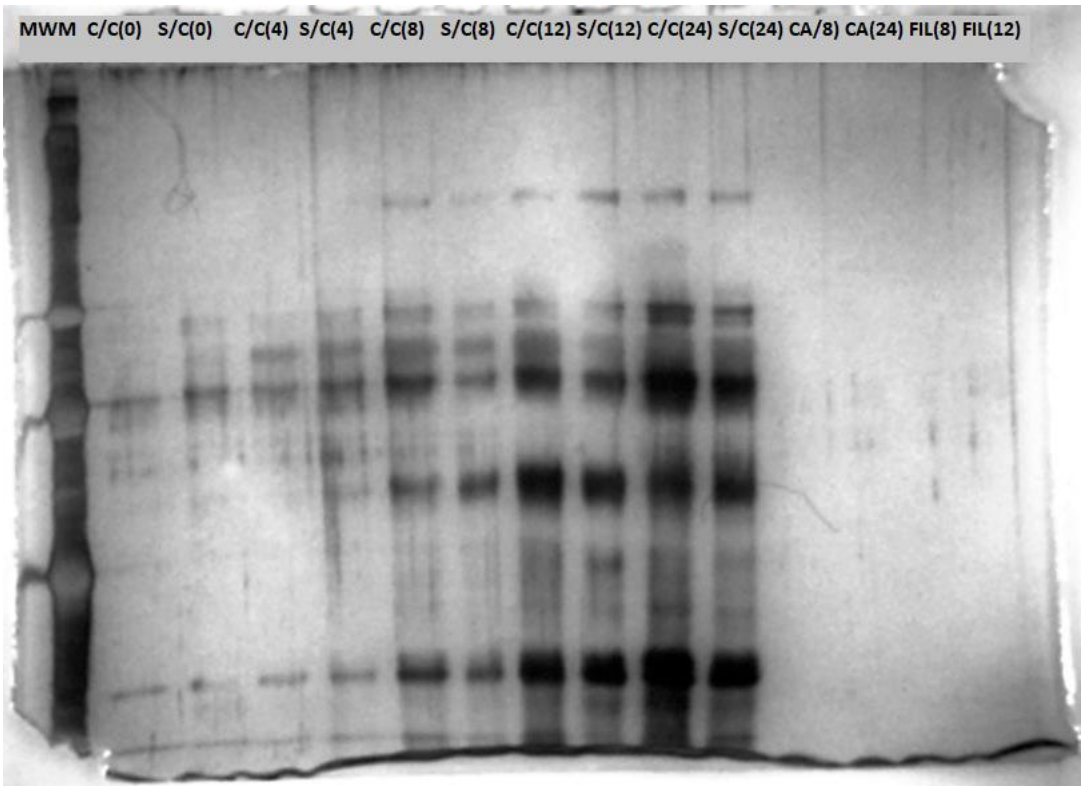


Figura 39. Perfil proteico correspondientes a diferentes tiempos del proceso de decoloración. MWM: marcador de peso molecular. c/c: muestras de la condición con colorante a diferentes tiempos. s/c: muestras de la condición control, sin colorante, a diferentes tiempos. CA: control abiótico, a las 8 y 24 horas del proceso respectivamente. FIL: fluido filtrado resultante de pasar las muestras por los concentradores.

Los resultados obtenidos demostraron que en los cultivos con colorante (c/c) se produce una mayor cantidad de proteínas que en cultivos control, sin colorantes (s/c). Aun así, los perfiles proteicos fueron muy similares. No se detectaron proteínas en los

controles abióticos (CA) ni en el líquido filtrado (FIL), resultante del proceso de concentración.

Se observó que la decoloración era superior a un 90% a las 12 horas de cultivo y total a las 24 horas. Sin embargo, como se puede observar en la Figura 38, los perfiles proteicos fueron similares a lo largo del período de incubación. De acuerdo a estos resultados se decidió que los análisis proteómicos se realizarían a las 12 horas del proceso de decoloración.

3.2. Análisis proteómico de la decoloración de Negro Reactivo 5 por *Trichosporon akiyoshidainum* HP-2023

3.2.1. Proteínas identificadas en los extractos extracelulares

El análisis del proteoma extracelular de *T. akiyoshidainum* HP-2023 mediante nanoLC-MS/MS posibilitó identificar un total de 229 proteínas en los cultivos realizados en presencia del colorante Negro Reactivo 5 y 175 proteínas en los cultivos en la condición control (sin colorante). De ellas, 155 proteínas fueron identificadas en ambas condiciones. 74 proteínas solo fueron detectadas en la condición con colorante y 20 solo en el medio control (Figura 40).

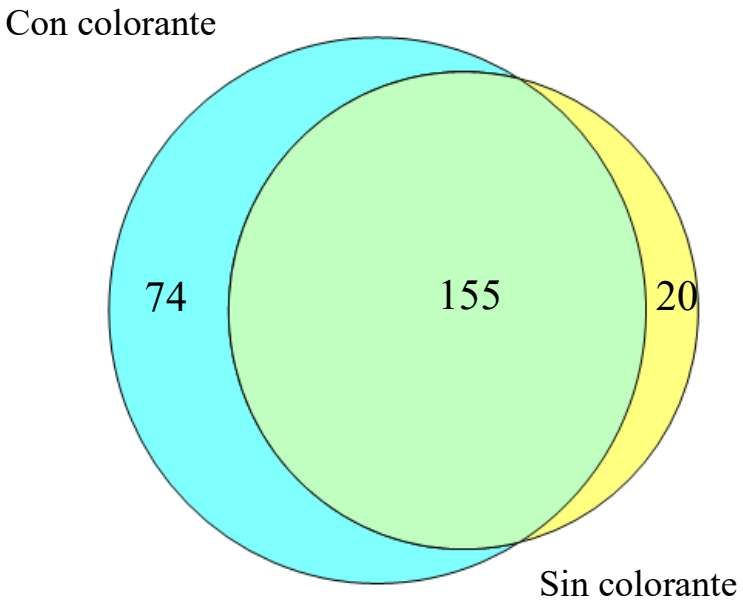


Figura 40. Diagrama de Venn que muestra la distribución de las proteínas identificadas en los sobrenadantes de cultivo.

Las proteínas identificadas se representaron en un gráfico de dispersión (*volcano plot*), donde cada punto corresponde a una única proteína. La ubicación de cada proteína en el gráfico, depende de los parámetros "*–log p*" (eje y) y "la diferencia entre los promedios de las áreas obtenidas" (eje x) (Figura 41). Las proteínas sobre-reguladas son aquellas que se ubican en los cuadrantes superiores derecho (medios con colorante) e izquierdo (sin colorante). La distribución de proteínas obtenida, indicó una mayor sobre-regulación de proteínas en el medio con el colorante textil y admite observar que muchas de las proteínas no tienen una expresión diferencial en ambas condiciones, posiblemente debido a que en ambas condiciones se utilizó el mismo medio de cultivo (NDM_2).

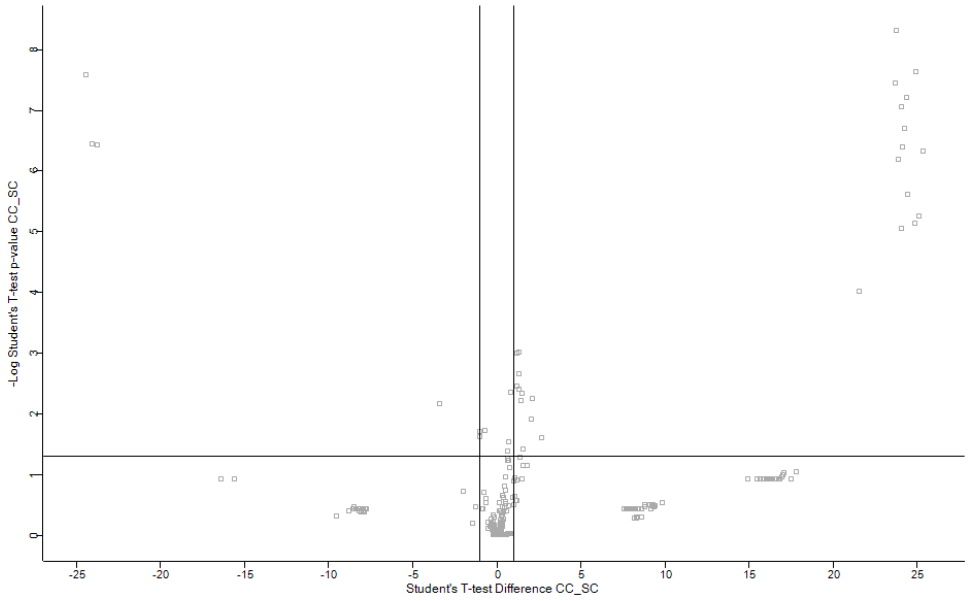


Figura 41. Gráfico de dispersión del proteoma extracelular de *T. akiyoshidainum* HP-2023 en las condiciones CC y SC. Gráfico realizado en software Perseus. La línea horizontal dentro del gráfico representa el parámetro *–log p* =1,3 (corresponde a un valor de *p*= 0,05). Las líneas verticales representan al parámetro "diferencia entre los promedios de las áreas" igual a -1 y 1, que es equivalente a un cambio de abundancias de 2 "FC=2".

Solo 27 proteínas presentaron un *fold change* >2 y un $p<0,05$ según el análisis realizado con el software Perseus. Entre ellas, 23 fueron sobre-expresadas en medios con colorante y 4 se encontraron sobre-expresaron en la condición control.

3.2.2. Proteínas identificadas en los extractos intracelulares

En cuanto a las proteínas intracelulares, se identificaron un total de 1365 proteínas en la condición con colorante y 928 proteínas en la condición control (sin Negro Reactivo 5). De todas estas, 502 proteínas fueron identificadas solamente en presencia del colorante Negro Reactivo 5, 65 proteínas fueron identificadas solamente en ausencia del colorante Negro Reactivo 5 (solo en la condición control) y 863 proteínas en las dos condiciones (Figura 42).

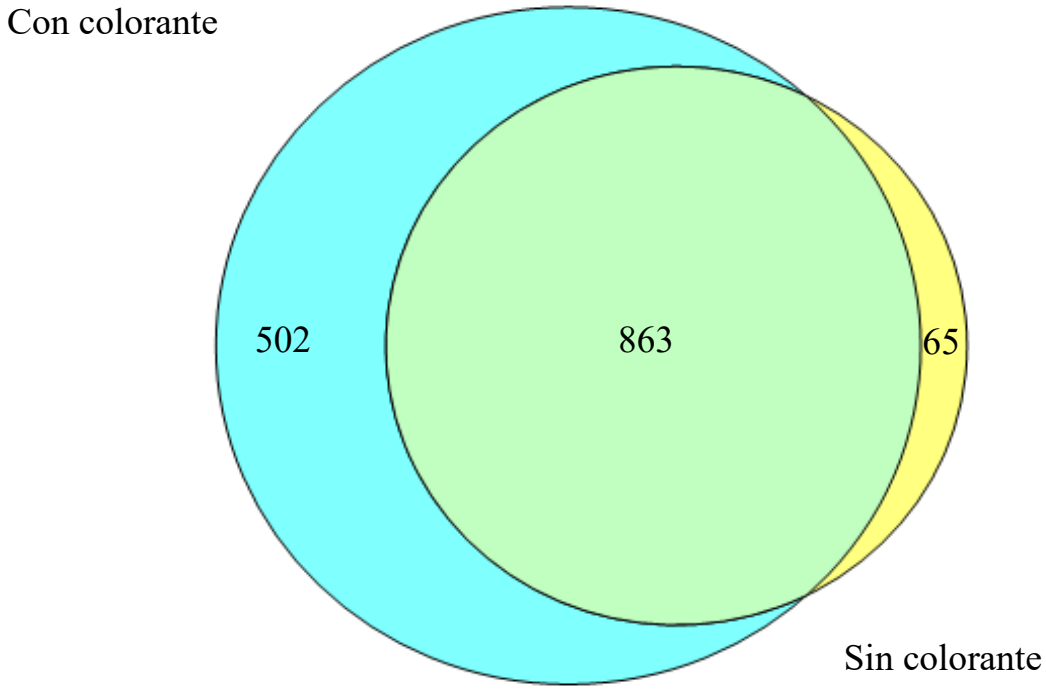


Figura 42. Diagrama de Venn que muestra la distribución de las proteínas identificadas en los extractos proteicos intracelulares.

Cuando se realizó el análisis estadístico de los proteomas obtenidos con el software Perseus, se determinó que 141 proteínas pueden considerarse significativamente sobre-reguladas (*fold change*>2, p<0.05).

De estas 141 proteínas, 122 fueron sobre-reguladas frente al agregado del colorante, mientras que 19 proteínas se encontraron sobre-reguladas en la condición control, sin colorante (Figura 42). Estas proteínas también se representaron en un gráfico de dispersión, donde cada punto corresponde a una única proteína. La ubicación de cada

proteína en el gráfico, depende de los parámetros "*–log p*" (eje y) y "la diferencia entre los promedios de las áreas obtenidas" (eje x) (Figura 43). Nuevamente, las proteínas sobre-reguladas son aquellas que se ubican en los cuadrantes superiores derecho e izquierdo. Sin embargo, queda en evidencia una mayor tendencia de sobre-regulación de proteínas ante el agregado del colorante textil.

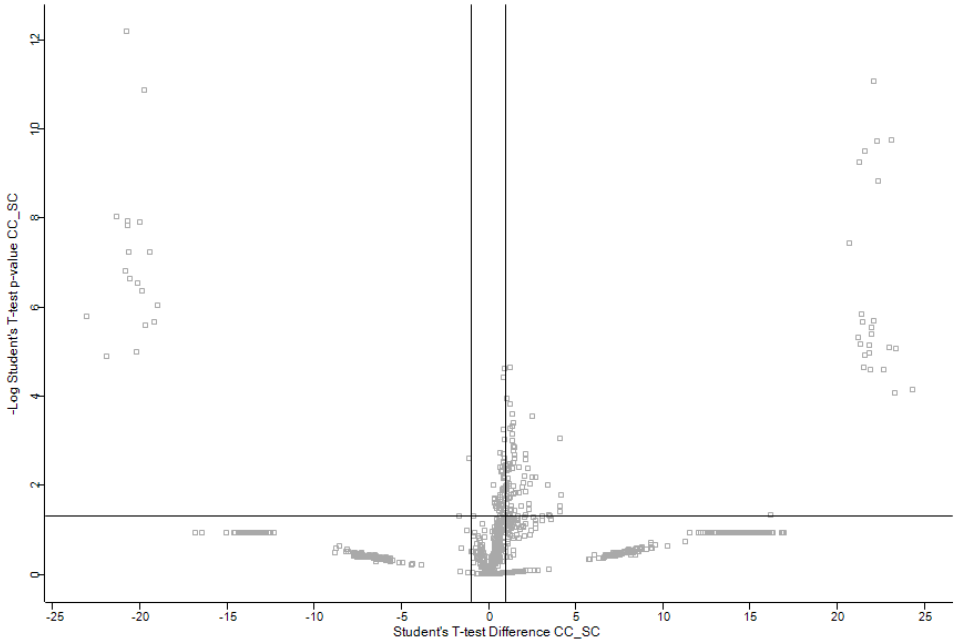


Figura 43. Gráfico de dispersión del proteoma intracelular de *T. akiyoshidainum* HP-2023 en las condiciones CC y SC. Gráfico realizado en software Perseus. La línea horizontal dentro del gráfico representa el parámetro *–log p* =1,3 (corresponde a un valor de *p* = 0,05). Las líneas verticales representan al parámetro "diferencia entre los promedios de las áreas" igual a -1 y 1, que es equivalente a un cambio de abundancias de 2 "FC=2".

3.3. Categorización funcional de las proteínas: análisis de las proteínas expresadas diferencialmente con BlastKOALA y KEEG *Pathway*

Las proteínas sobre-reguladas, tanto en el medio extracelular como en los extractos intracelulares, fueron categorizadas en base a su función utilizando la herramienta bioinformática BlastKOALA.

El resultado del análisis mostró que las proteínas sobre-reguladas formaban parte de vías metabólicas que son esenciales para un correcto funcionamiento celular (Figura 44). En la condición CC, se observó un mayor número de proteínas involucradas principalmente en el procesamiento de información genética, en el metabolismo de

carbohidratos, metabolismo energético, metabolismo de lípidos y especialmente cabe mencionar la categoría “biodegradación y metabolismo de xenobióticos” (Figura 44).

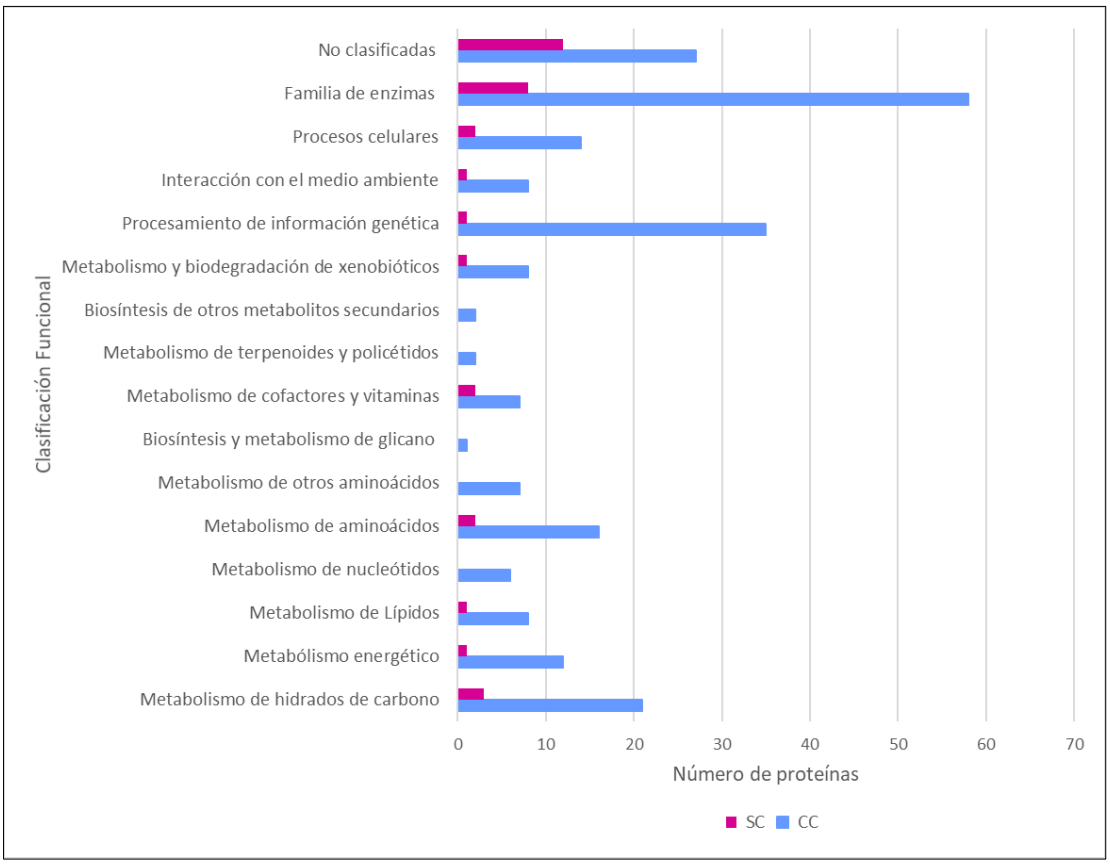


Figura 44. Categorización funcional de las proteínas sobre-reguladas obtenidas del proteoma de *T. akiyoshidainum* HP-2023 cultivado en presencia del colorante azoico Negro Reactivo 5 (CC) y en usencia de este compuesto (SC). Se utilizó la herramienta bioinformática BlastKOALA.

La inducción de proteínas relacionadas al procesamiento de información genética está asociada directamente con la necesidad que tiene el microorganismo de poner en marcha una maquinaria enzimática compleja que permita la degradación y metabolismo del compuesto xenobiótico agregado al medio de cultivo, lo cual se ve reflejado también en al número de enzimas inducidas en esta condición con respecto a la condición control (Figura 44).

A su vez, la sobre-regulación de proteínas involucradas en el metabolismo de carbohidratos, metabolismo energético y metabolismo de lípidos están principalmente relacionadas al ciclo de las pentosas, ciclo del ácido cítrico y a la β-oxidación de ácidos

grasos. Estas vías metabólicas estuvieron claramente identificadas al realizar un análisis global de las rutas metabólicas en la base de datos KEEG (Figura 45).

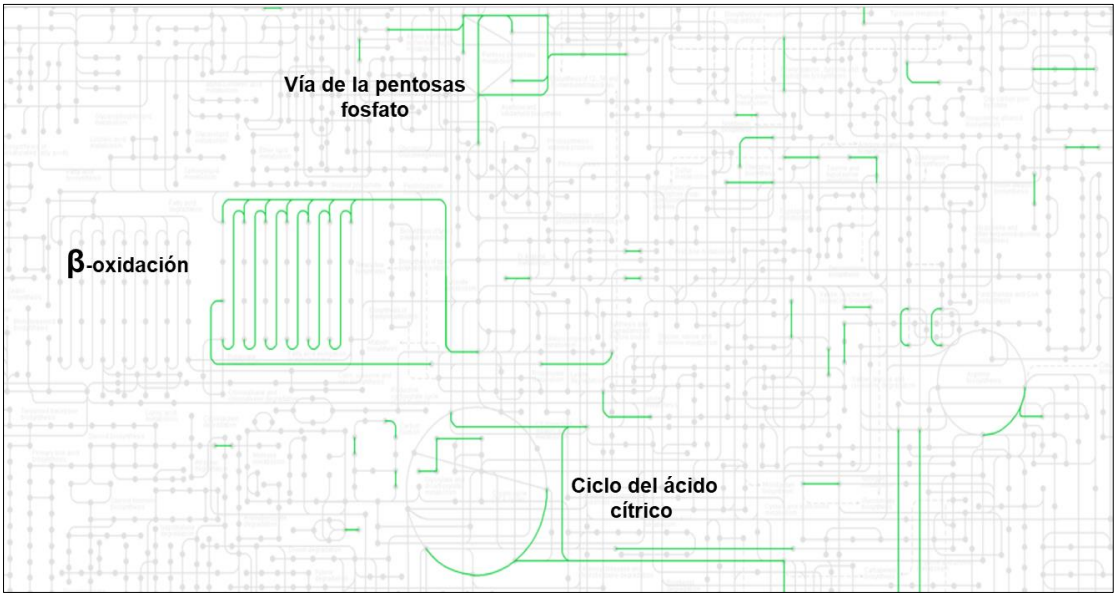


Figura 45. Visión general de las rutas metabólicas sobre-reguladas en *T. akiyoshidainum* HP-2023 en presencia del colorante textil Negro Reactivo 5 en base a las anotaciones realizadas en la base de datos KEGG con BlastKoala.

Se conoce que la vía de las pentosas fosfato es una de las principales vías responsables del suministro de NADPH en las células (Barcia-Vieitez & Ramos-Martínez, 2014). Su activación en *T. akiyoshidainum* HP-2023 en presencia del colorante Negro Reactivo 5 es consecuencia de una demanda creciente de NADPH requerido por varias enzimas antioxidantes, que participan en la defensa contra el estrés oxidativo durante el proceso de degradación. El NADPH también podría ser empleado por enzimas tales como quinonas oxidorreductasas, las cuales dependen de este cofactor para su funcionamiento. Las quinonas oxidorreductasas, pueden intervenir en la degradación no enzimática del colorante mediante el ciclo redox de las quinonas, el cual puede modular las reacciones extracelulares de generación de radicales hidroxilos.

A su vez, el NADPH puede tomar parte de la detoxificación y metabolismo de xenobióticos a través de los citocromos P450 (Pandey & Fluck, 2013), vía metabólica que se encontró inducida en presencia del colorante Negro Reactivo 5. La inducción de proteínas relacionadas al metabolismo y detoxificación por la vía de los citocromos P450

fue reportada también durante la degradación del colorante textil Azul Directo 5 por el hongo de la pudrición blanca *Irpex lacteus* (Sun *et al*., 2016; Sun *et al*., 2017).

Por otra parte, la inducción de enzimas involucradas en la degradación/catabolismo de ácidos grasos (β-oxidación), se explica por la composición del colorante Negro Reactivo 5 ya que el mismo es un preparado comercial (Vilmafix® B-V) que incluye ácidos grasos empleados como dispersantes (Martorell *et al.*, 2012), por lo que el metabolismo y degradación de estos ácidos, por parte de *T. akiyoshidainum HP-2023*, explica la inducción de la vía en cuestión.

La sobre-expresión de algunas de las proteínas involucradas en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, se asocia, por un lado, a la mayor demanda energética requerida para la degradación y metabolismo del colorante textil, y por el otro, se debe a la secreción de ácidos orgánicos como ácido succínico, cítrico o málico, los cuales son intermediarios del ciclo.

Sin lugar a dudas, este contexto metabólico basado en la generación de energía y equivalentes de reducción como el NADPH, ayuda a *T. akiyoshidainum* HP-2023 a llevar a cabo la degradación y detoxificación del colorante textil.

3.4. Identificación y análisis de expresión de las proteínas involucradas en la degradación del colorante textil Negro Reactivo 5

3.4.1. Vías altas de degradación

I. Oxidorreductasas involucradas en la oxidación de los enlaces azoicos

Entre las enzimas ligninolíticas, las peroxidasas se encuentran entre las más asociadas a procesos de decoloración en hongos de la pudrición blanca, sin embargo, su identificación en levaduras ha sido escasamente reportada (Wasenberg *et al*., 2003; Ravichandran & Sridhar, 2016).

En los sobrenadantes se detectaron péptidos correspondientes a la proteína codificada por el gen TRI28_002299-RA. Esta enzima es una peroxidasa versátil según MycoCLAP, correspondiente a la familia de enzimas con Actividades Auxiliares AA2, de acuerdo a dbCAN.

Esta proteína se identificó con una abundancia 1,6 veces mayor en los medios con colorante. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p > 0,05$), sin embargo,

la presencia de una peroxidasa versátil explica la actividad peroxidasa, medida tanto en presencia como en ausencia de Mn^{2+}.

Otra enzima ligninolítica cuya actividad se asocia a la oxidación de los enlaces azoicos durante la degradación de colorantes textiles, es la lacasa, una fenol oxidasa perteneciente a la familia de las multicobre oxidasas (MCO). En el Capítulo 1 se describió que fue posible determinar actividad fenol oxidasa en los sobrenadantes de cultivo de *T. akiyoshidainum* HP-2023 en presencia de Negro Reactivo 5, sin embargo, no se pudo definir si esta actividad correspondía a alguna lacasa o a alguna de las otras enzimas con actividad fenol oxidasa codificadas en el genoma de *T. akiyoshidainum* HP-2023. Por espectrometría de masas tampoco se identificaron péptidos correspondientes a una lacasa propiamente dicha en los extractos extracelulares ni en los intracelulares. Sin embargo, fueron detectados péptidos de una ferroxidasa (TRI28_001049_RA) perteneciente a la familia AA1_2 de las enzimas activas sobre carbohidratos (*Cazymes*), que se encuentra sobre-regulada en presencia del colorante. La familia de proteínas multicobre oxidasas (MCO), a la cual pertenecen tanto ferroxidasas como lacasas, presentan secuencias muy similares con tres dominios bien característicos que están presente en la proteína identificada. Teniendo en cuenta el hecho de que ciertas MCO sean activas sobre sustratos propios de lacasas y además tengan actividad ferroxidasa (Larrondo *et al*., 2003; Hoopes & Dean, 2004; Hoegger *et al*., 2006; Rodríguez-Rincón *et al*, 2010; Copete *et al*, 2015), se asume que la proteína identificada es la responsable de la actividad fenol oxidasa detectada en presencia del colorante Negro Reactivo 5. Por otro lado, estas ferroxidasas, cumplen un rol clave en la homeostasis celular y en la modulación de las reacciones Fenton por lo que los detallas de la enzima identificada serán desarrollados en ese apartado.

II. Oxidasas productoras de H_2O_2

Las enzimas de la familia GMC oxidorreductasas, tales como glucosa oxidasa, aril-alcohol oxidasa, metanol oxidasa y piranosa oxidasa participan en la degradación de compuestos aromáticos mediante el suministro del peróxido de hidrógeno necesario para la química Fenton y para el funcionamiento o activación de peroxidasas (Vyas & Molitoris, 1995; Shah & Nerud, 2002; Ayeronfe *et al*., 2018).

En el medio extracelular de los cultivos de *T. akiyoshidainum* HP-2023 se identificaron tres proteínas de la familia de GMC oxidorreductasas, codificadas por los

genes: TRI28_001435-RA, TRI28_010120-RA y TRI28_003838-RA los cuales fueron analizados en el capítulo anterior. Las proteínas codificadas por los primeros dos genes, son glucosas oxidasas sobreexpresadas en el medio con colorante, con una abundancia relativa > 2 ($p < 0,05$). Mientras que la proteína codificada por el último gen mencionado, correspondiente a una alcohol oxidasa, que se identificó en ambas condiciones sin diferencias significativas.

También se identificaron péptidos correspondientes a dos proteínas de la familia *Copper-radical oxidases* (CROs), codificadas por los genes TRI28_004548-RA y TRI28_010288-RA, ambas con función glioxal oxidasa, según Blast2GO y la base de datos MycoCLAP. Estas proteínas, que son catalíticamente diferentes a las GMC oxidasas, fueron identificadas tanto en presencia como en ausencia de colorantes, pero la codificada por el gen TRI28_004548-RA se detectó con diferencias significativas en sus niveles de expresión (FC > 2 y p < 0,05).

Al menos en *P. chrysosporium*, y posiblemente en todos los hongos de la pudrición blanca, las enzimas con actividad glioxal oxidasa proveen el H_2O_2 necesario para el funcionamiento de las peroxidasas ligninolíticas extracelulares (Kersten, 1990; Kurek & Kersten, 1995; Kersten & Cullen, 2014). La actividad peroxidasa detectada en presencia de colorante (Capítulo 1) y los péptidos identificados correspondientes a una peroxidasa ligninolítica extracelular y a enzimas con actividad glioxal oxidasas en los sobrenadantes, sugieren que estas proteínas tienen una relación similar en *T. akiyoshidainum* HP-2023.

Por otro lado, el H_2O_2 producido tanto por las CRO como por las GMC oxidorreductasas también podría ser empleado para la producción de radicales hidroxilos vía reacciones tipo Fenton (Ferreira *et al*., 2015; Kameshwar & Qin, 2018).

III. Reducción de hierro y homeostasis celular

El mecanismo no enzimático de degradación de colorantes implica la formación de radicales hidroxilos **(1)**, mediante reacciones químicas conocidas como Reacciones Fenton.

(4) $Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + OH^{\cdot} + OH^{-}$

(5) $Fe^{3+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{2+} + OOH^{\cdot} + OH^{+}$

La reducción del hierro (III) generado, a su estado reducido de Fe (II), es el paso limitante en este tipo de sistemas **(2)**. El suministro continuo de esta especie se lleva a cabo mediante diferentes estrategias. En varios trabajos se describió, en hongos de la pudrición de la madera, enzimas con actividad quinona reductasa (QRD) que aceleran reacciones de tipo Fenton mediante un ciclo redox en el que intervienen quinonas secretadas por estos hongos (Karem *et al*., 1999; Cohen *et al*., 2004; Shimokawa *et al*., 2004; Krueger *et al*., 2015) (Figura 46).

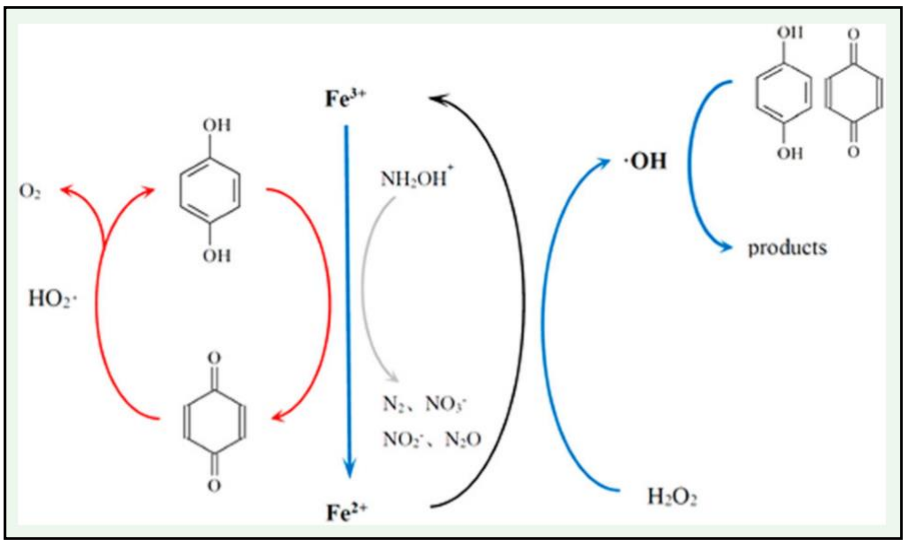


Figura 46. Ciclo Redox de las Quinonas.

Muchas de las enzimas involucradas en el llamado ciclo redox de las quinonas son enzimas que cumplen funciones intracelulares, interviniendo en la síntesis y reducción de las quinonas. Mediante espectrometría de masas se identificaron los péptidos correspondientes a diversas quinonas oxidorreductasas, entre ellas, la proteína codificada por el gen TRI28_005401-RA se detectó con una abundancia relativa (*fold change*) mayor a 2 y con valor de $p < 0,05$ en presencia de Negro Reactivo 5. Esta proteína presentaría actividad 1,4-benzoquinona reductasa, (familia de enzimas con actividades auxiliares AA6 de CAZy). Además, se identificaron significativamente sobre-reguladas en el medio con colorante, dos proteínas codificadas por los genes: TRI28_007257-RA y TRI28_009993-RA, que codifican NAD(P)H-ubiquinona reductasas y una proteína que presentaría actividad quinona oxidorreductasa dependiente de NAD(P)H (codificada por el gen TRI20_004066-RA), perteneciente a la superfamilia de alcohol deshidrogenasas dependiente de zinc. También se identificaron péptidos correspondientes a las proteínas

codificadas por los genes TRI28_003503-RA, TRI28_002267, TRI28_000537-RA y TRI28_004446-RA, solo en presencia del colorante textil, pero sin soporte estadístico (p>0.05).

La identificación de un elevado número de proteínas relacionadas al ciclo redox de las quinonas, sugiere una activa participación de este sistema durante la degradación de Negro Reactivo 5.

Conjuntamente a este sistema de reducción de hierro basado en hidroquinonas, otros sistemas están involucrados en el mantenimiento adecuado de los niveles de Fe (II) para que las reacciones Fenton tengan lugar. La enzima celobiosa deshidrogenasa, cuya actividad se detectó en el sobrenadante de los cultivos de *T. akiyoshidainum* HP- 2023, oxida celodextrinas, manodextrinas y lactosa empleando como aceptores de electrones quinonas, radicales fenoxilo, oxigeno molecular y Fe^{3+}. Diversas investigaciones han enfatizado la actividad hierro III reductasa del dominio hemo que está involucrado en la generación de radicales hidroxilos necesarios para el metabolismo de hidratos de carbono y la degradación de lignina (Hyde *et al*., 2017). Sin embargo, esta proteína no pudo ser identificada en los estudios de proteómica por espectrometría de masas, en ninguna de las condiciones ensayadas.

Además del rol central que juega en un amplio rango de procesos celulares, la homeostasis celular tiene uno crítico en la modulación y funcionamiento de la química Fenton. El genoma de *T. akiyoshidainum* HP-2023 posee numerosos genes involucrados en el transporte de hierro y mantenimiento del estado redox celular. Generalmente estos sistemas se dividen en dos tipos: sistemas reductivos y sistemas no reductivos. Durante la degradación del colorante Negro Reactivo 5 ambas vías parecen inducerse.

Sistema reductivo

Diversos péptidos de proteínas que intervienen en estas vías fueron identificados. Las proteínas codificadas por los genes TRI28_007773-RA, TRI28_003992-RA fueron sobreexpresadas en el medio con colorante, corresponden a una Fe/Cu reductasa 2 (FRE2) y una Fe/Cu reductasa 3 (FRE3), respectivamente. Estas hierro-reductasas podrían jugar un rol directo en la generación de Fe (II), a través de la reducción de quelatos de Fe (III). También podrían participar en la captación de cobre, mediante su reducción de Cu (II) a cobre (I). Los metales reducidos pueden, de esta manera, ser captados por la célula, pero además podrían participar en reacciones tipo Fenton. Ambas proteínas fueron identificadas en los extractos intracelulares, únicamente en cultivos con Negro Reactivo

5, pero sin soporte estadístico (p > 0,05). Sin embargo, en los extractos de proteínas extracelulares se identificó la proteína hierro reductasa codificada por el gen TRI28_003851-RA con una abundancia relativa significativamente mayor a 2 en presencia del colorante Negro Reactivo 5 (p < 0,05). La identificación de esta proteína reductora de hierro, sustenta la actividad hierro reductasa que se determinó inducida en presencia del colorante Negro Reactivo 5 (Capítulo 1), principalmente en este medio de cultivo (NDM_2).

El gen TRI28_007441-RA codifica una permeasa de hierro que se identificó diferencialmente expresada en presencia del colorante textil (*fold change* > 2 y p < 0,05).

Como se mencionó anteriormente, se identificaron péptidos correspondientes a una proteína con actividad ferroxidasa, codificada por el gen TRI28_001049-RA. Esta proteína fue identificada con una abundancia relativa > 2 (p < 0,05) en el medio con colorante.

Otras enzimas de la familia multicobre oxidasa (MCO), como ferroxidasa/lacasa, o bien Fe(II):oxígeno oxidorreductasa, son enzimas que catalizan la oxidación de Fe(II) a Fe(III), y fueron extensamente estudiadas en *Sacharomyces cereviseae* donde desempeñan un papel clave en la homeostasis celular (Askwith *et al*., 1994, Kosman, 2003). Es probable que la ferroxidasa identificada en los cultivos de *Trichosporon akiyoshidainum* HP-2023, en presencia Negro Reactivo 5, este también involucrada en la homeostasis de hierro, oxidando Fe^{+2}, modulando las reacciones Fenton y reduciendo los niveles tóxicos de radicales hidroxilos, rol que ya fue sugerido en *P. chrysosporium* (Kersten & Cullen, 2006).

Sistema no reductivo

Los transportadores de sideróforos son los principales componentes de la vía no reductiva de captación de hierro. Éstos son compuestos de bajo peso molecular (de 500 a 1000 Da), que mantienen al hierro soluble mediante su quelación. Si bien el rol de los sideróforos es en primer lugar quelar al Fe^{3+}, también forman complejos con otros cationes/metales esenciales como (por ejemplo: Mo, Mn, Co y Ni) y de esta manera dejarlos disponibles para los microorganismos (Bellenger *et al*., 2008; Braud *et al*., 2009 a, b). En *T. akiyoshidainum* HP-2023 se identificaron numerosos genes que codifican transportadores de sideróforos, de los cuales, el producto del gen TRI28_005335-RA se detectó, solo en el medio con colorante, pero sin soporte estadístico p > 0,05).

Diversos hongos ligninolíticos son capaces de producir sideróforos que actúan en reacciones de tipo Fenton (Fekete *et al*., 1989; Fekete, 1993). Por ejemplo, un sideróforo aislado de *Gloephyllum trabeum*, un hongo de la pudrición parda, es capaz de mediar la reducción de Fe^{+3} a Fe^{+2}. El Fe reducido posteriormente reacciona con peróxido de hidrógeno para generar radicales hidroxilos altamente activos capaces de despolimerizar celulosa, hemicelulosa y lignocelulosa. Este proceso de despolimerización fue considerado el principal rol de los sideróforos en el bioblanqueado de pulpas (Xu & Goodell, 2001; Milagres *et al*., 2002; Arantes & Milagres, 2007; Ahmed & Holmström, 2014). Teniendo en cuenta esto, la identificación de una proteína relacionada al transporte de sideróforos que se encuentra inducida en presencia del colorante azoico, sumada a la evidencia de la producción de sideróforos por *T. akiyoshidainum HP2023* reportada por Pajot y colaboradores (2011), permite suponer un papel similar en la biodegradación de colorantes azoicos como el Negro Reactivo 5.

3.4.2. Vías bajas de degradación

I. Proteínas involucradas en el catabolismo de los productos de degradación de Negro Reactivo 5

Además de los sistemas extracelulares y/o de membrana que participan en las vías altas de degradación, los hongos poseen redes enzimáticas intracelulares que constituyen el "xenoma", el cual ha sido definido como el bio-sistema responsable de la detección, transporte y metabolismo de xenobióticos (Edwards *et al*., 2005). Estas vías constituidas principalmente por los miembros de las familias multigénicas de citocromos P450 monooxigenasas y glutatión transferasas, participan en la detoxificación de diversos tipos de contaminantes (Morel *et al*., 2013).

Como en otros organismos eucariotas, en los hongos, las rutas metabólicas de detoxificación de compuestos recalcitrantes/tóxicos se dividen en tres etapas diferentes: la primera corresponde a una activación de la molécula, generalmente a través de una etapa de oxidación; la segunda etapa involucra reacciones de conjugación y la tercera el transporte o almacenamiento (Sang *et al*., 2018).

El análisis del proteoma de *T. akiyoshidainum* HP-2023 posibilitó identificar numerosos citocromos P450, responsables de la Fase I de detoxificación intracelular (oxidación) de los productos de degradación del colorante Negro Reactivo 5. A su vez,

se identificaron diversas proteínas glutatión transferasas que están involucradas en la Fase II (conjugación) de detoxificación de estos compuestos.

Se identificaron péptidos correspondientes a dos citocromos P450 monooxigenasas que se encontraban diferencialmente expresados en presencia del colorante azoico, de los cuales el codificado por el gen TRI28_001541-RA es un citocromo P450 61 (CYP61) que fue identificado solamente en presencia del colorante textil ($p< 0,5$). Según Shin y colaboradores (2018) los CYP51, CYP56, CYP61, entre muchos otros CYPs fúngicos, están involucrados en la biosíntesis de metabolitos primarios y secundarios, como así también en la detoxificación/degradación de xenobióticos. La enzima citocromo P450 monooxigenasa, codificada por el gen TRI28_005626-RA, fue detectada tanto en cultivos con colorante como en cultivos control y sin el colorante Negro Reactivo 5, pero con una abundancia relativa > 2 ($p<0,05$) en la primera condición. Además, se identificó un citocromo P450 reductasa dependiente de NADPH (CPR, codificado por TRI28_008104-RA) solo en medios con Negro Reactivo 5 ($p<0,05$). Esta enzima podría, participar en la transferencia de electrones a una hemooxigenasa o a un citocromo B5 (Lamb *et al*., 2001).

Por otro lado, en los extractos proteicos fueron detectadas tres proteínas glutatión transferasas. La primera de ellas, codificada por el gen TRI28_006055-RA fue identificada solo en la condición con colorante ($p < 0,05$), mientras que las codificadas por los genes TRI28_009580-RA y TRI28_004998RA fueron identificadas con una abundancia relativa > 2 en presencia de Negro Reactivo 5 ($p < 0,05$). La principal actividad catalítica de estas enzimas es la transferencia de moléculas de glutatión a diferentes sustratos, convirtiéndolos en moléculas más electrofílicas (Deshmukh *et al.*, 2016).

Las enzimas de la Fase II (conjugación) catalizan la formación de compuestos conjugados con azúcares (glucósidos, xilósidos o glucorónidos), sulfatos, acetilos, metilos o bien glutatión. Estos compuestos son excretados, almacenados o degradados completamente (Morel *et al*., 2013). Diferentes compuestos conjugados y/o diferentes actividades enzimáticas asociadas a su formación han sido detectadas durante la degradación de diversos compuestos en varias especies de hongos. Por ejemplo, durante la degradación de fenantreno llevada a cabo por el hongo de la pudrición blanca *Pleurotus ostreatus* reportada por Bezalel y colaboradores (1991). También, durante la degradación de benzopireno por *Fusarium solani*, reportada por Fayeulle y colaboradores (2014). Aranda (2016) mediante estudios transcriptómicos y proteómico identificó estas

actividades durante la degradación de compuestos policíclicos aromáticos en diversos hongos de la división Ascomicota.

En hongos la correlación directa entre enzimas citocromos P450 y glutatión transferasas fue descripta en diversos estudios, donde se observó su inducción conjunta frente a hidrocarburos policíclicos aromáticos, nonilfenoles, como así también frente a compuestos derivados de la degradación de la madera (Syed *et al*., 2010; Thuillier *et al*., 2011; Subramanian & Yadav, 2009; Vanden Wymelenberg *et al*., 2011; MacDonald *et al*., 2011).

El análisis de las proteínas sobreexpresadas en medios con Negro Reactivo 5 en la base de datos de KEEG, sugiere que la principal ruta metabólica involucrada en el catabolismo de los productos de degradación del colorante Negro Reactivo 5 es la del metabolismo de xenobióticos por citocromos. Las enzimas que forman parte de esta vía metabólica incluyen monooxigenasas inespecíficas (citocromos P450), alcohol deshidrogenasas, aldehído deshidrogenasas, trans-1,2-dihidrobenceno-1,2-dioldeshidrogenasa, glucuranosil transferasa, glutatión transferasa, epóxido hidrolasa y beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa. Además de los citocromos P450 y glutatión transferasas antes mencionadas, muchas de estas proteínas fueron identificadas durante el proceso de decoloración del colorante Negro Reactivo 5, pero solo dos proteínas alcohol deshidrogenasas, codificadas por los genes TRI28_003372-RA y TRI28_000531-RA, se encontraron significativamente sobre-regulada en el cultivo con colorante ($FC > 2$; $p < 0,05$).

Es importante mencionar que se identificaron algunas proteínas relacionadas a otras vías de degradación de xenobióticos descriptas en *KEEG PATHWAY*. Por ejemplo 3-hidroxibenzoato 6-hidroxilasa, 4-carboximuconolactona descarboxilasa, 3-hydroxianthranilato 3,4-dioxigenasa, enoil-CoA hidratasa, carboximetilen-butenolidasa involucradas tanto en la degradación de benzoato y compuestos relacionados, como también de en las vías de degradación de tolueno y naftaleno, compuestos similares a los que podrían producirse como intermediarios durante la degradación Negro Reactivo 5 (Figura 47). Sin embargo, en ningún caso la diferencia en niveles de expresión contó con soporte estadístico.

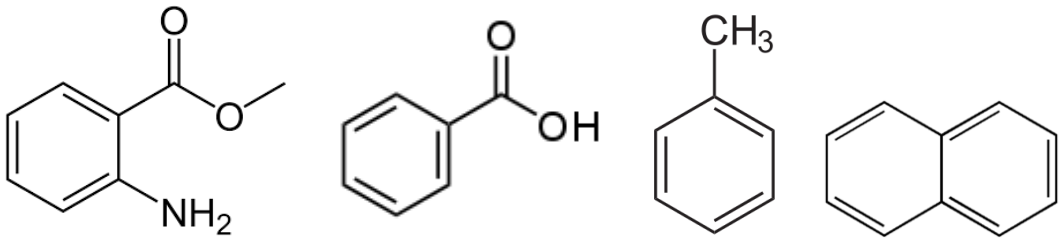


Figura 47. Estructuras de metil antranilato, ácido benzoico, tolueno y naftaleno, compuestos similares a los que podrían producirse como intermediarios durante la degradación Negro Reactivo 5.

II. Proteínas de respuesta a estrés oxidativo y detoxificación celular

La identificación masiva de proteínas por espectrometría de masas también detectó ciertas proteínas que participan en la respuesta al estrés oxidativo, indicando que *T. akiyoshidainum* HP-2023 pone en marcha un eficiente sistema con el que sobrevive a la adición de colorantes textiles, como el Negro Reactivo 5, mientras que lleva a cabo su degradación y metabolismo.

Las enzimas involucradas con la respuesta al estrés oxidativo están íntimamente relacionadas con las proteínas del grupo anterior, ya que ambos grupos permiten la detoxificación intracelular, ya sea mediante la remoción de especies reactivas del oxígeno (EROs) o mediante la degradación de compuestos tóxicos, resultantes de la degradación del colorante añadido.

Se identificaron péptidos, tanto en los extractos extracelulares como intracelulares, de una superóxido dismutasa (SOD, codificada por el gen TRI28_005914-RA), pero solo en el medio extracelular se encontró diferencialmente sobre-expresada en presencia del colorante ($FC > 2$; $p<0,05$), además se identificó otra SOD (TRI28_001661-RA), tanto en presencia como en ausencia del colorante textil.

También se identificaron diversas peroxirredoxinas en los extractos de proteínas intracelulares de *T. akiyoshidainum* cultivado tanto en presencia como en ausencia del colorante textil, pero no se encontraron diferencias significativas en sus niveles de expresión. Una tiorredoxina reductasa, codificada por el gen TRI28_000181-RA, se encontró significativamente sobre-regulada en presencia del colorante Negro Reactivo 5 ($FC > 2$; $p < 0,05$).

Se identificaron dos catalasas, de las cuales la proteína codificada por el gen TRI28_009751-RA se detectó en los extractos proteicos intracelulares con una

abundancia relativa > 2 en la condición con colorante ($p < 0,05$), mientras que la otra, codificada por TRI28_000756-RA se encontró en ambas condiciones (CC y SC).

La acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO) produce daños en las macromoléculas celulares, lo que es perjudicial para la integridad celular. El mecanismo de defensa primario contra la generación de EROs en hongos consiste en catalasas monofuncionales y enzimas bifuncionales tales como peroxidasa/catalasa. Todos los estudios sobre el efecto de compuestos que inducen generación de ROS, como metales pesados, plaguicidas entre otros xenobióticos, han indicado un aumento concomitante de las enzimas antioxidantes (Deshmukh *et al*., 2016). Laxminarayana y colaboradores (2010) reportaron que la actividad catalasa se encontraba inducida durante la degradación de colorantes sulfonados (rojo escarlata, violeta brillante y azul verdoso) llevada a cabo diversos hongos: *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Dechslera rostrata*, *Penicillum nutalum*, entre otros. Mientras que, durante la degradación de Naranja Reactivo 16 (colorante azoico sulfonado), por *Lysinibacillus* sp., se observó una inducción de actividades SOD y CAT. Se demostró que estas enzimas relacionadas al estrés oxidativo no solo protegen a la célula de este proceso celular, sino que, además tienen un rol durante la decoloración junto con la participación de otras enzimas oxidorreductasas (Bedekar *et al.*, 2014).

3.5. Resumen del análisis proteómico

En la Tabla 13 se presenta un resumen de las principales proteínas relacionadas a la degradación de colorantes azoicos que fueron identificadas mediante espectrometría de masas y que se encontraron diferencialmente expresadas con respecto al control sin colorante (*fold change* ≥ 2 y $p < 0,05 = -log\ p > 1,3$).

Tabla 13. Proteínas involucradas en la degradación del colorante Negro Reactivo 5.

Vías altas de degradación			**Promedio del área normalizada[a]**		**T-test (*-log p*)[b]**
Rol	Identificador del gen	Proteína	CC	SC	
Producción de H_2O_2	TRI28_001435-RA	Glucosa oxidasa (GMC oxidorreductasa)	26,15	24,05	2,3
	TRI28_010120-RA		29,12	27,80	2,7
	TRI28_004548-RA	Glioxal oxidasa (CRO)	29,36	28,51	2,3
Reducción de Hierro y homeostasis celular	TRI28_003851-RA	Hierro reductasa	21,54	0,00	4,0
	TRI28_001049-RA	Ferroxidasa	25,41	23,95	2,2
	TRI28_007441-RA	Permeasa de hierro	23,76	0,00	8,3
	TRI28_005401-RA	Quinonas oxidoreductasas	22,27	21,17	1,8
	TRI28_004066-RA		22,45	20,39	2,2
	TRI28_007257-RA		22,23	20,50	1,8
	TRI28_009993-RA		22,07	0,00	5,7
Vías bajas de degradación					
Degradación de xenobióticos por citocromo P450	TRI28_001541-RA	Citocromo P450 monooxigenasa	22,32	0,00	8,8
	TRI28_005626-RA		22,61	21,68	3,0
	TRI28_008104-RA	Citocromo P450 reductasa	23,12	0,00	9,8
	TRI28_006055-RA,	Glutatión transferasa	25,37	0,00	6,3
	TRI28_009580-RA,		24,37	0,00	7,2
	TRI28_004998-RA		22,32	21,16	2,0
	TRI28_003372-RA	Alcohol deshidrogenasa	23,52	22,44	2,3
	TRI28_000531-RA	NADP-alcohol deshidrogenase	22,81	22,46	1,7
Proteínas de estrés oxidativo					
Detoxificación celular	TRI28_005914-RA	Superóxido dismutasa	24,99	23,68	2,4
	TRI28_000181-RA	Tiorredoxina	24,11	0,00	6,4
	TRI28_009751-RA	Catalasa	22,74	21,59	3,4

[a] El promedio del área normalizada se calculó utilizando tres repeticiones biológicas independientes. Los valores se representan como log2.

[b] El valor p se calculó como -log utilizando el software Perseus. Los valores superiores a 1,3 indican una diferencia estadísticamente significativa entre las abundancias de CC y SC.

En la Figura 46 se puede observar el mecanismo propuesto para la degradación extracelular de Negro Reactivo 5 por *T. akiyoshidainum* HP-2023 (Vías altas de degradación).

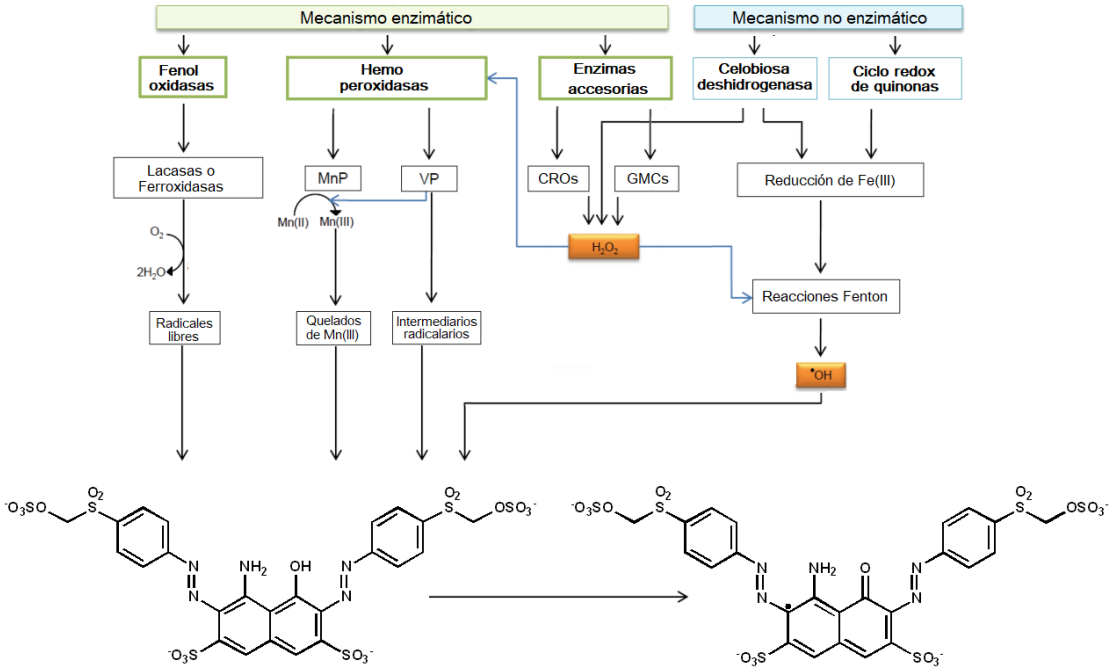


Figura 48. Mecanismos propuestos para la degradación de Negro Reactivo 5 por *T. akiyoshidainum* HP-2023 (Vías altas de degradación).

4. CONCLUSIONES PARCIALES

- Por la naturaleza polar del colorante Negro Reactivo 5, este no atraviesa la membrana plasmática de *T. akiyoshidainum* HP-2023, por este motivo, la primera parte del proceso de decoloración ocurre en el medio extracelular, posteriormente los metabolitos/compuestos resultantes de su degradación son captados por las células y metabolizados.
- El principal mecanismo responsable de la degradación del colorante Negro Reactivo 5 es la degradación no enzimática mediada por radicales hidroxilos. Esto se deduce de la identificación masiva de las proteínas expresadas durante la decoloración de Negro Reactivo 5, por nanoLC-MS/MS.
- Se demostró la participación conjunta de un mecanismo de degradación enzimático, donde la peroxidasa versátil identificada en el medio extracelular entra en

juego. A pasar que no fue posible su identificación de manera diferencial, esto puede deberse al momento en el cual fue tomada la muestra para realizar el estudio.

- La degradación de los compuestos resultantes de la reducción extracelular del colorante azoico Negro Reactivo 5 está mediada principalmente por la vía asociada a los citocromos P450.
- La presencia del colorante textil en el medio de cultivo provoca la inducción de sistemas de defensa contra el estrés oxidativo, protegiendo a *T. akiyoshidainum* HP-2023 del ambiente oxidativo generado durante la remoción del colorante y permitiendo llevar adelante un proceso exitoso de decoloración.
- La sobre-regulación de las vías de pentosas fosfatos sustenta la actividad de muchas de las enzimas determinadas diferencialmente expresadas, quienes necesitan un suministro continuo de poder reductor como NADPH para poder actuar.

Capítulo 4

Validación de la hipótesis derivada del estudio proteómico

CAPÍTULO 4

Validación de la hipótesis derivada del estudio proteómico

1. Introducción

El análisis proteómico permitió la identificación de numerosas enzimas involucradas en la producción de peróxido hidrógeno, expresadas de manera diferencial durante la decoloración del colorante textil Negro Reactivo 5 por *T. akiyoshidainum* HP-2023. La inducción de diversos sistemas de reducción de hierro, que incluyen: reductasas de hierro propiamente dichas, quinonas reductasas involucradas en el ciclo redox de las quinonas y transportadores de sideróforos, implicados en la solubilización del Fe (III), junto con la identificación de una ferroxidasa, nos permiten proponer que las reacciones Fenton y/o Fenton mediadas, estarían involucradas en la degradación de este colorante por *T. akiyoshidainum* HP-2023.

1.2. Degradación no enzimática de compuestos aromáticos

Existen numerosos trabajos que demuestran la participación de radicales hidroxilos, producidos mediante reacciones Fenton, en la degradación de hemicelulosa, celulosa y lignina por hongos de la pudrición parda de la madera (BRFs por sus siglas en inglés, *Brown Rot Fungi*), (Kaneko *et al.*, 2005, Martinez *et al*., 2009). Debido a la baja especificidad de este sistema de degradación de lignocelulosa, los hongos de la pudrición de la madera fueron usados para la biodegradación de diversos compuestos aromáticos (Purnomo *et al*., 2008, 2010, 2011a, 2011b; Sun *et al.*, 2015; Sun *et al*., 2017).

Por ejemplo, Rizqi y Purnomo (2017) reportaron que *Daedelea dickinsi*, fue capaz de decolorar y transformar el colorante azul de metileno mediante la formación de radicales hidroxilos producidos *vía* reacciones tipo Fenton. Sun y colaboradores (2017), demostraron que la degradación del colorante Azul Directo 5, llevada a cabo por el hongo de la pudrición blanca *Irpex lactus*, implicó la participación conjunta de reacciones de producción de radicales hidroxilos y de una enzima manganeso peroxidasa.

Sin embargo, hasta el momento no se ha descripto ninguna levadura capaz de degradar colorantes azoicos y/compuestos relacionados mediante este tipo de mecanismo.

En este capítulo mediante un enfoque biomimético, se simula la oxidación biológica del colorante azoico Negro Reactivo 5, llevada a cabo por *T. akiyoshidainum* HP-2023, como una manera de corroborar las hipótesis desprendidas del estudio

proteómico. Posteriormente, con la identificación de ácidos orgánicos y compuestos de bajo peso molecular en los sobrenadantes de cultivo se busca agregar un soporte adicional al mecanismo de degradación oxidativa propuesto.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Ensayos Biomiméticos: decoloración no enzimática mediada por reacciones Fenton

Con el fin de analizar la participación de las reacciones de tipo Fenton, en la decoloración del colorante Negro Reactivo 5, se intentó reproducir posibles condiciones biológicas en las que este tipo de reacciones tienen tener lugar durante el proceso de decoloración del colorante por *T. akiyoshidainum* HP-2023. Para lograrlo, se emplearon diferentes combinaciones de metales de transición: Fe^{2+}, Cu^{2+} y Mn^{2+}, junto con ácidos orgánicos: ácido oxálico, ácido succínico, acido málico y ácido cítrico, los cuales son capaces de coordinarse con los iones de los metales de transición y formar complejos metal-ligando estables. Las reacciones se llevaron a cabo por triplicado en el medio NDM_2. Se propusieron los siguientes sistemas catalíticos (Tabla 14):

Tabla 14. Sistemas catalíticos empleados en los ensayos biomiméticos.

Sistemas Catalíticos			
Colorante C_f**= 200mg/L**	**Metal de transición** C_f**= 10 mM**	**Oxidante** C_f**= 100 mM**	**Ácido orgánico** C_f**= 200 mM**
NR5	Fe^{2+} / Cu^{2+} / Mn^{2+}	H_20_2	Ácido oxálico
NR5	Fe^{2+} / Cu^{2+} / Mn^{2+}	H_20_2	Ácido succínico
NR5	Fe^{2+} / Cu^{2+} / Mn^{2+}	H_20_2	Ácido málico
NR5	Fe^{2+} / Cu^{2+} / Mn^{2+}	H_20_2	Ácido cítrico
NR5	Fe^{2+} / Cu^{2+} / Mn^{2+}	H_20_2	-------
NR5	Fe^{2+} / Cu^{2+} / Mn^{2+}	-------	-------
NR5	-------	H_20_2	-------
NR5	-------	-------	-------

El colorante azoico Negro Reactivo 5, empleado en una concentración final de 200 mg L-1, fue incubado con un sistema que consistía en $FeSO_4.7H_2O$ o $CuSO_4$ o $MnSO_4.H_2O$, añadidos en una concentración final de 10 mM y peróxido de hidrogeno (H_2O_2) en una concentración final de 100 Mm, junto con el agregado o no de ácidos orgánicos (cítrico, málico, oxálico, o succínico; en una concentración final de 200 mM) a 25 °C en un volumen final de 300 µL. Se realizaron los controles correspondientes en cada caso.

Se midió la absorbancia de la mezcla de reacción a la longitud de onda de máxima absorbancia del colorante Negro Reactivo 5 (λ_{opt} = 595) y se determinó el porcentaje de decoloración a distintos tiempos de reacción: 0, 30, 90 minutos y luego de 20 horas, según la fórmula:

$$\% \text{ Decoloración} = ((A_0 - A_t)/A_0) \cdot 100$$

Donde, A_0: absorbancia inicial a $\lambda_{opt=595nm}$ y A_t: absorbancia a $\lambda_{opt=595nm}$ a diferentes tiempos.

Se registró el espectro de absorbancia de las mezclas de reacción, correspondientes a los distintos sistemas catalíticos a los 90 minutos de incubación, en el rango 360-800 nm, utilizando un lector de microplacas *Multiskan GO* (*Thermo Fisher).*

2.2. Identificación de ácidos orgánicos y metabolitos de bajo peso molecular en los sobrenadantes de cultivo por espectrometría de masas

La identificación de ácidos orgánicos se realizó mediante un espectrómetro de masas Finnigan LTQ Linear Ion Trap (Thermo, Electron Corporation, Bremen, Germany) equipado con una fuente de ionización LDTD (*Phytronix Laser Diode Thermal Desorption Ion Source*).

Los sobrenadantes de los medios de cultivo de *T. akiyoshidainum* HP-2023 con colorante y sin colorante, tomados a las 12 horas de incubación, como así también las soluciones de los estándares de ácido succínico, ácido málico y ácido oxálico, fueron filtrados y las muestras fueron evaporadas a sequedad. Posteriormente, se resuspendieron en agua calidad *milliQ*. Luego, se tomaron 2 µL de cada solución y se los colocó, individualmente en pocillos de la placa LDTD, donde se dejaron nuevamente evaporar a sequedad.

Las condiciones empleadas para la ionización e identificación fueron: Intensidad del láser 0% (punto de tiempo [t] 1-5 en segundos) 0-15% de rampa (t6-15) 15% (t16-20 segundos) 0% (t20-25) para un período de recolección de 25 segundos por ejecución.

Los espectros obtenidos se analizaron con el software MAVEN (Clasquin *et al*., 2012), contra la biblioteca de compuestos provista por el fabricante.

La identificación de otros compuestos de bajo peso molecular en los sobrenadantes de cultivó, relacionados a procesos de degradación no enzimática, se realizó mediante la comparación de los espectros obtenidos con la base de datos KEGG COMPOUND, también mediante el empleo del software MAVEN.

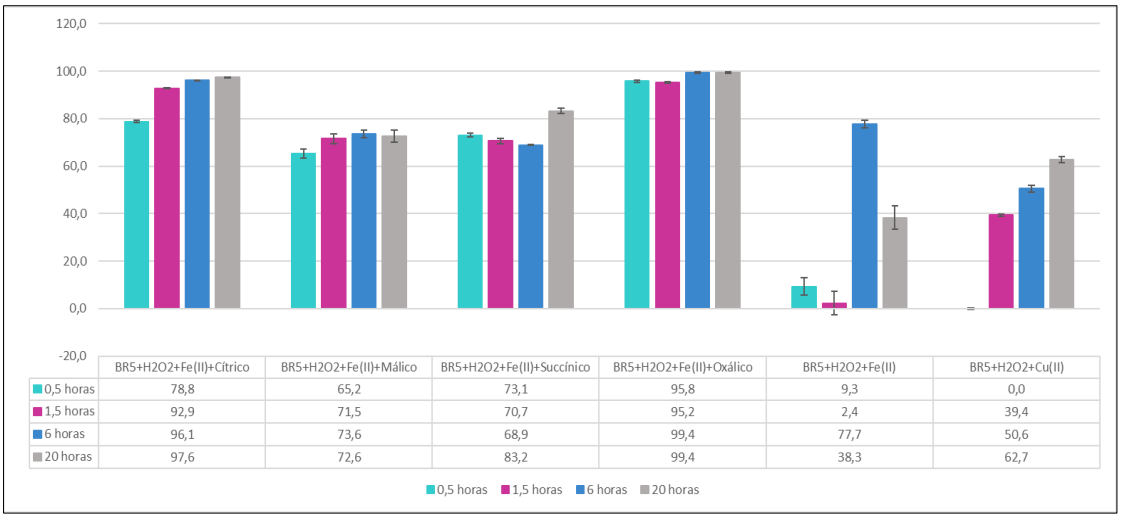
3. Resultados y discusión

3.1. Ensayos Biomiméticos

3.1.1. Decoloración no enzimática mediada por reacciones Fenton

De los sistemas catalíticos probados, los sistemas compuestos por Fe^{2+} fueron los más eficientes, demostraron en todos los casos una decoloración superior al 65%. Los sistemas con Cu^{2+}o Mn^{+2} con metales de transición y ácidos orgánicos no degradaron al colorante en las condiciones ensayadas. Sólo se obtuvo una decoloración significativa, superior al 70%, del colorante Negro reactivo 5 en sistemas compuestos por Cu^{2+} y H_2O_2, pero sin ácidos orgánicos.

En la Figura 49 se pueden observar los porcentajes de decoloración alcanzados con los distintos sistemas catalíticos en el medio NDM_2.



	BR5+H2O2+Fe(II)+Cítrico	BR5+H2O2+Fe(II)+Málico	BR5+H2O2+Fe(II)+Succínico	BR5+H2O2+Fe(II)+Oxálico	BR5+H2O2+Fe(II)	BR5+H2O2+Cu(II)
0,5 horas	78,8	65,2	73,1	95,8	9,3	0,0
1,5 horas	92,9	71,5	70,7	95,2	2,4	39,4
6 horas	96,1	73,6	68,9	99,4	77,7	50,6
20 horas	97,6	72,6	83,2	99,4	38,3	62,7

Figura 49. Porcentajes de decoloración registrados a distintos tiempos, durante la degradación del colorante Negro Reactivo 5 en presencia de los sistemas catalíticos: Fe (II) + H_2O_2, Fe (II) + H_2O_2 + ácido cítrico/ácido málico/ácido succínico/ácido oxálico y Cu (II) + H_2O_2.

A pesar que con el sistema Fenton clásico, sin adición de ácidos orgánicos, se alcanzó un porcentaje de decoloración de un 78 % a las 6 horas de incubación, la variación en los resultados obtenidos se debió a interferencias en las lecturas ocasionadas por la precipitación del Fe^{+3}. La adición de ácidos orgánicos a este sistema evitó la precipitación del Fe^{+3} formado durante la reacción de oxidación del ion ferroso, lo que favoreció la

degradación del colorante, y permitiendo superar el 90 % de decoloración a los 90 minutos (1,5 horas) de reacción con ácido cítrico y oxálico. Por otra parte, se alcanzó un 70 % de decoloración con ácido málico y succínico. La síntesis y secreción de ácidos orgánicos (oxalato, succinato, malato y citrato) como quelantes de metales, está ampliamente reportada en hongos de pudrición de la madera, y fueron asociados a los procesos de degradación de la misma (Shimada *et al*., 1997; Watanabe *et al*., 1998; Martinez *et al*., 2018).

Como se destacó previamente, los resultados obtenidos durante este trabajo demostraron que la adición de ácidos orgánicos no tuvo un efecto positivo en los sistemas con Cu (II) como metal de transición, siendo solamente efectivo el sistema catalítico simple: Cu^{2+} + H_2O_2, pero con una decoloración mucho más lenta que en los sistemas con Fe^{2+}. Sin embargo, Shah y colaboradores (2003) determinaron que la adición de ácidos orgánicos al sistema Cu^{2+} + H_2O_2, favorecía la decoloración de diversos colorantes azoicos y antraquinónicos y propusieron al sistema Cu^{2+} + H_2O_2 + ácido succínico como el más eficiente para la decoloración de colorantes textiles. Esta diferencia se explica por interferencias en las reacciones Fenton causadas por el medio de reacción, lo que pone de manifiesto la necesidad de realizar las reacciones biomimeticas en el medio de cultivo NDM_2, que es el medio de cultivo empleado para estudiar la decoloración de Negro Reactivo 5 por *T. akiyoshidainum* HP-2023.

3.1.2. Análisis de los espectros de absorción

El análisis de los espectros de absorción, correspondiente a los 90 minutos de reacción de los sistemas en los cuales se registró decoloración (Figura 50), permite concluir que existió una degradación efectiva del colorante causada por radicales hidroxilos formados mediante estos sistemas químicos en el medio de cultivo NDM_2.

Se observa que, en los sistemas catalíticos Fenton mediados por ácidos orgánicos, se produjo la desaparición del pico correspondiente a los cromóforos del colorante a 595 nm: la ruptura de los enlaces azoicos en la molécula, explican los espectros obtenidos para estos sistemas y confirma la degradación del colorante por los radicales hidroxilos generados. Específicamente, se registró una disminución total del pico máximo para los sistemas con ácido cítrico y oxálico, en los cuales el porcentaje de decoloración determinado, a los 90 minutos de incubación, fue superior al 90 %, mientras que se

registró una leve absorción para los sistemas con ácido succínico y málico en los que se había alcanzado, a los 90 minutos de reacción, un 70% de decoloración.

Por otro lado, también se puede observar en estos espectros un incremento en la absorbancia por debajo de los 400 nm y un incremento, aunque menor, en la absorbancia en la región de 400 a 450 nm, especialmente en los sistemas con ácido cítrico y succínico. Santana y Aguiar (2015), cuando trabajaron con un sistema similar de formación de radicales hidroxilos, formado por Fe^{2+} + H_2O_2 + ácido 3-hidroxiantránilico, reportaron cambios similares en los espectros de varios colorantes sintéticos, obtenidos luego del tratamiento con este sistema de generación de radicales hidroxilos. Estos autores propusieron que estas alteraciones indicaron una posible conversión de los colorantes en compuestos de menor masa molecular y la formación de estructuras de tipo quinonas, respectivamente.

En cuanto al sistema Fenton clásico (Fe^{2+} + H_2O_2) se percibe que el espectro de absorción, correspondiente a los 90 minutos de incubación, difiere con respecto al control (espectro del colorante solo), esto se debió principalmente al precipitado de Fe (III) formado durante la reacción de generación de radicales hidroxilos lo cual produjo interferencia en las lecturas.

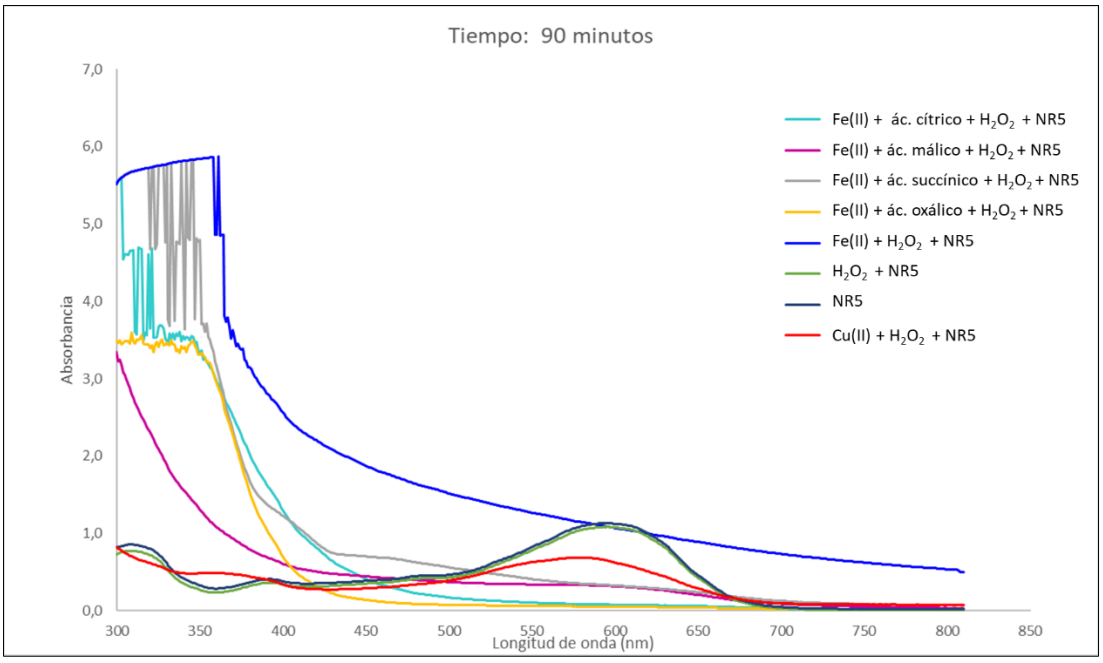


Figura 50. Espectros UV-Visible, correspondiente al rango de absorción 400-800 nm, obtenidos para el colorante Negro Reactivo 5 en presencia de los sistemas catalíticos: Fe (II) + H_2O_2, Fe (II) + H_2O_2 + ácido cítrico/ácido málico/ácido succínico/ácido oxálico y Cu (II) + H_2O_2, comparados con el obtenidos para el colorante solo (NR5).

En el espectro correspondiente al sistema catalítico formado por Cu^{2+} y H_2O_2, con el cual se alcanzó un 40% de decoloración a los 90 minutos de incubación, se observó una disminución del pico de máxima absorción, además de registrarse un corrimiento hacia menores longitudes de onda. Este corrimiento también fue advertido durante la degradación biológica de este colorante llevada a cabo por *T. akiyoshidainum* HP-2023 (CAPÍTULO 1).

La similitud entre los espectros obtenidos durante la degradación del colorante Negro Reactivo 5 por *T. akiyoshidainum* HP-2023 con los obtenidos durante la degradación de dicho colorante por la acción de radicales hidroxilos, afirman la hipótesis resultante del análisis proteómico, en la cual se propuso la participación de un mecanismo de degradación no enzimático, que involucró la formación de radicales hidroxilos, durante la decoloración del colorante Negro Reactivo 5 llevada a cabo por *T. akiyoshidanum* HP-2023.

3.2. Identificación de ácidos orgánicos y otros metabolitos de bajo peso molecular por espectrometría de masas

3.2.1. Identificación de ácidos orgánicos

Mediante espectrometría de masas se confirmó la presencia de ácidos orgánicos en el medio de cultivo de *T. akiyoshidainum* HP-2023, tanto en presencia como en ausencia del colorante textil. La producción de estos ácidos en ambas condiciones de cultivo no resulta extraña, ya que se ha reportado que en levaduras, a diferencia de lo que ocurre en hongos filamentosos, la producción de ácidos orgánicos no se encuentra inducida por una determinada condición de estrés ambiental o estímulo, sino que está determinada por otros factores, como por ejemplo limitación de nitrógeno (Behrens *et al*., 1987; Anastassiadis *et al*., 2002).

En la Figura 51 se detalla el espectro obtenido correspondiente al sobrenadante de cultivo de *T. akiyoshidainum* HP-2023 con colorante Negro Reactivo 5 (12 horas de cultivo).

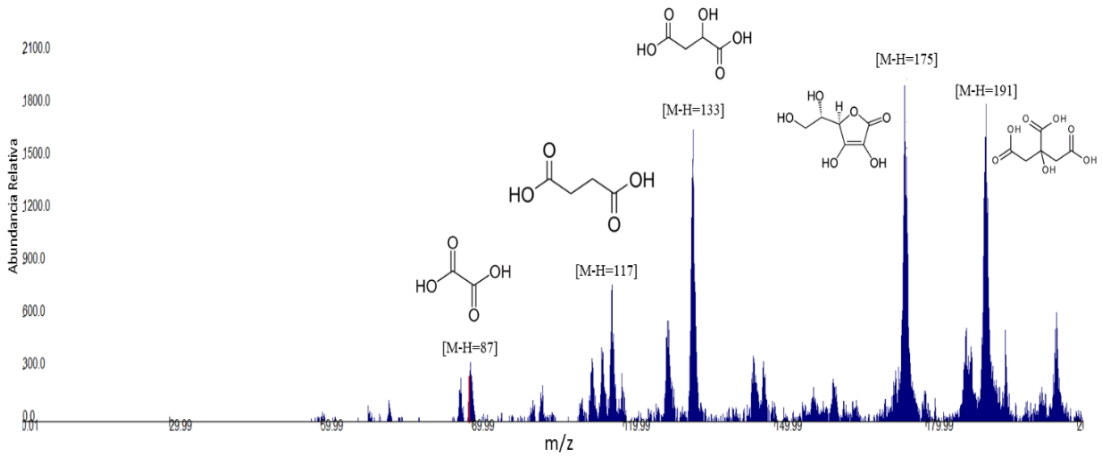


Figura 51. Espectro de masa del sobrenadante de cultivo de 12 horas de *T. akiyoshidainum* HP-2023 en presencia del colorante Negro Reactivo 5.

Se detectaron picos cuya m/z corresponde a los iones moleculares del ácido cítrico [M-H=191] y del ácido ascórbico [M-H=175], picos compatibles con la presencia de ácido málico [M-H=133], ácido succínico [M-H=117] y ácido oxálico [M-H=87]. Sin embargo, no fue posible demostrar la presencia de estos ácidos, ya que sus m/z coinciden con las de productos de degradación de los ácidos de mayor peso molecular.

La acumulación extracelular de ácidos orgánicos en los medios de cultivos de hongos, como así también su participación en los procesos de degradación y/o biorremediación se encuentra ampliamente reportada. Por ejemplo, en *Ceriporiopsis subvermispora* se informó la producción extracelular de ácido oxálico y glioxálico, los cuales participan en la degradación de la lignina mediante la estabilización de los iones Mn^{3+}, además de reducir el pH fuera de las hifas fúngicas y participar en la generación de H_2O_2, factores importantes para el óptimo rendimiento de las peroxidasas que degradan la lignina (Urzúa *et al*., 1998).

Se demostró que los ácidos orgánicos participan en procesos de degradación que involucran reacciones de tipo Fenton. Por ejemplo, Martinez y colaboradores (2009) reportaron que en *P. placenta* la acumulación de oxalato afecta la disponibilidad del ion férrico y por lo tanto tiene un impacto directo en la formación de radicales hidroxilos implicados en la degradación de la madera.

Se sabe que las levaduras también acumulan ácidos orgánicos en el medio extracelular. Por ejemplo, *Yarrowia lipolytica* y algunas cepas de *Candida* son conocidas por producir ácido cítrico (Goldberg *et al*., 2006), *R. mucilaginosa* sp. demostró producir

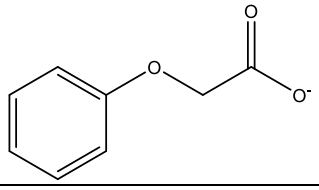
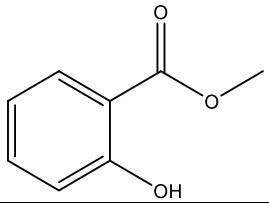
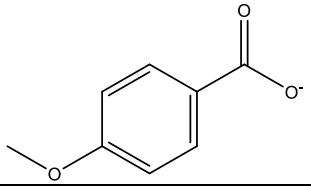
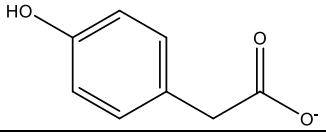
ácido oxálico y málico (Rajpert *et al*., 2013). Sin embargo, su producción ha sido principalmente asociada a procesos de biorremediación de metales pesados mediante su solubilización, quelación y posterior remoción (Devevre *et al*., 1996; Gadd, 2004).

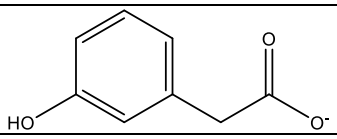
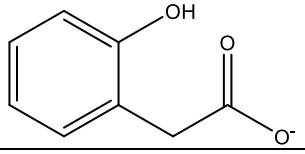
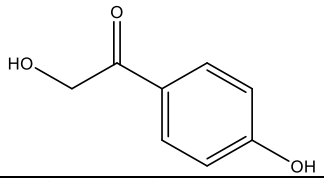
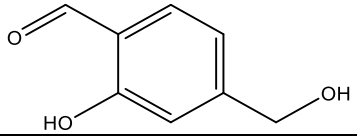
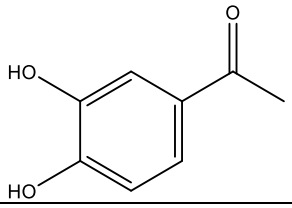
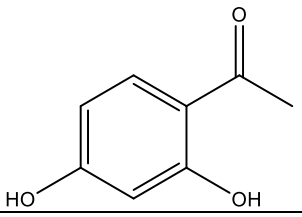
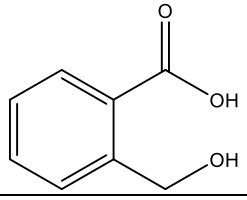
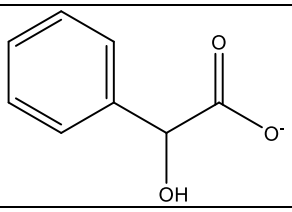
Particularmente en el contexto en estudio, los ácidos orgánicos producidos participarían en las reacciones de generación de radicales hidroxilos, mediante la solubilización del Fe^{3+} formado durante las reacciones Fenton, manteniéndolo disponible para su recirculación. De otra manera, como se comprobó en los ensayos biomiméticos, se produciría la precipitación de este metal en el medio de cultivo.

3.2.2. Identificación de otros metabolitos de bajo peso molecular

Diversos hongos de la pudrición parda de la madera como *Wolfiporia cocos y Perenniporia medulla-panis*, producen compuestos derivados de fenolatos que intervienen en reacciones de tipo Fenton (Arantes *et al*., 2011). De manera similar, al analizar los espectros de los metabolitos obtenidos por LDTD-MS en los cultivos de *T. akiyoshidainum* HP-2023, se detectó únicamente en las muestras de cultivos con colorante, la aparición de un un pico (m/z = 151), compatible con la presencia de estos derivados de fenolatos (Tabla 15).

Tabla 15. Probables fenolatos identificado en los sobrenadantes de cultivo de *T. akiyoshidainum* HP-2023.

Compuesto	Estructura	Masa Molecular
Fenoxiacetato		151.14
Metil-salicilato		152.15
4-metoxibenzoato		152.14
4-hidroxifenilacetato		151.14

3-hidroxifenilacetato		151.14
2-hidroxifenilacetato		151.14
4-hidroxifenacil alcohol		152.14
4-hidroximethilsalicilaldehído		152.14
3´, 4´-dihidroxiacetofenona		152.14
2´, 4´-dihidroxiacetofenona		152.15
Ácido 2-(hidroximetil)benzoico		152.15
2-hidroxi-2-fenilacetato		151.14

Si bien la identificación de estos compuestos es preliminar, todos ellos tienen la capacidad de reducir Fe^{3+}, potenciando la generación de radicales hidroxilos en reacciones de tipo Fenton, tanto en presencia como en ausencia de ácidos orgánicos (Arantes *et al*., 2011), por lo que juegan un papel importante en la decoloración de Negro reactivo 5 por *T. akiyoshidainum* HP-2023.

4. CONCLUSIONES PARCIALES

- Los resultados descriptos en este Capítulo apoyan la hipótesis de la participación de un mecanismo no enzimático de degradación por radicales libres llevado a cabo por *T.akiyoshidainum* HP-2023 sobre el colorante textil Negro Reactivo 5.

- Los espectros obtenidos de las soluciones de Negro Reactivo 5 tratadas con los sistemas catalíticos compuestos por Fe^{2+}, H_2O_2 y ácidos orgánicos demostraron que la decoloración podría explicarse por este mecanismo.

- Los ensayos biomiméticos demostraron la necesidad de la presencia ácidos orgánicos u otros quelantes, que eviten la precipitación del Fe^{3+} durante las reacciones de tipo Fenton.

- La identificación de los ácidos orgánicos en los sobrenadantes de cultivo de *T.akiyoshidainum* HP-2023, demuestró la existencia de un medio ácido adecuado para que ocurran reacciones de tipo Fenton.

- La presencia de fenolatos reductores de Fe^{+3} sólo en los sobrenadantes de medios con el colorante de cultivo afirman la teoría de una degradación no enzimática, sumando un elemento más para sostener este tipo de sistemas en el medio extracelular.

Conclusiones Finales

CONCLUSIONES

- Los mecanismos de remoción del colorante Negro Reactivo 5 varían entre los miembros del género *Trichosporon*. Dependen de la especie y las condiciones de cultivo.

- La degradación del colorante Negro Reactivo 5 por *T. akiyoshidainum* HP-2023, *T. chairellii* y *T. porosum* 4029, es un proceso co-metabólico en el que intervienen mecanismos de bioadsorción y/o degradación del colorante. No produce la acumulación de aminas aromáticas.

- La presencia del colorante en los medios de cultivo de *T. akiyoshidainum* HP-2023, *T. chairellii* y *T. porosum* 4029, induce actividades enzimáticas oxidativas, relacionadas a la degradación de lignocelulosa

- La inducción de actividades enzimáticas lignocelulolíticas por mediadores redox, iones metálicos o compuestos de degradación de la lignina no afectan significativamente ni la velocidad del proceso ni el porcentaje final de la decoloración de Negro Reactivo 5.

- Las técnicas colorimétricas empleadas para la determinación de actividades enzimáticas ligninolíticas clásicas (lacasa, manganeso peroxidasa, etc.) producen falsos positivos y/o falsos negativos. Esto depende de las condicione de cultivo y de la especie involucrada.

- Las limitaciones de las técnicas colorimétricas explican los resultados obtenidos previamente en estudios de decoloración de Negro Reactivo 5 por *T. akiyoshidainum* HP-2023.

- La secuenciación del genoma de *T. akiyoshidainum* HP-2023 reveló la presencia de genes de hemo-peroxidasas, hemotiolato-peroxidasas, lacasas y enzimas involucradas en la modulación de reacciones de tipo fenton: hierro reductasas, ferroxidasas, quinonas reductasas, transportadores de sideróforos, permeasas de hierro y enzimas involucradas en la producción de peróxido de hidrógeno extracelular.

- En el genoma de *T. akiyoshidainum* HP-2023 no se encontraron genes que codifiquen proteínas azo-reductasas o DCIP reductasas tradicionales, por lo que el proceso de degradación es estrictamente oxidativo.

- La identificación masiva de proteínas expresadas durante la decoloración de Negro Reactivo 5 demostró la participación de un mecanismo no enzimático de degradación mediado por radicales hidroxilos.

- Los resultados obtenidos no permiten descartar la participación conjunta de un mecanismo enzimático.

- El análisis de las proteínas intracelulares demostró que los metabolitos de la degradación del colorante son captados por la levadura y metabolizados principalmente por la vía de degradación de xenobióticos mediadas por citocromos P450.

- La presencia del colorante textil en el medio de cultivo causa la inducción de sistemas de defensa contra el estrés oxidativo.

- La sobre-regulación de las vías de las pentosas fosfatos, confirman la actividad de muchas de las enzimas implicadas en la degradación y detoxificación del colorante reactivo.

- La identificación de ácidos orgánicos en los sobrenadantes de cultivo de *T. akiyoshidainum* HP-2023 ratifican la existencia de un medio ambiente extracelular adecuado para la degradación del colorante Negro Reactivo 5 mediante un mecanismo no enzimático de generación de radicales hidroxilos.

- Los ensayos biomiméticos reprodujeron los espectros de absorbancia obtenidos durante la degradación biológica del colorante Negro Reactivo 5.

Los resultados de este trabajo demuestran que T. akiyoshidainum HP-2023 puede ser empleada para el tratamiento de otros contaminantes orgánicos debido a la naturaleza inespecífica del mecanismo de degradación empleado.

Esta Tesis Doctoral representan un importante aporte al conocimiento de los mecanismos moleculares de degradación de colorantes textiles con levaduras y aporta nuevos conocimientos para la optimización de los procesos de biodecoloración con levaduras del género Trichosporon.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Abadulla, E., Tzanov, T., Costa, S., Robra, K. H., Cavaco-Paulo, A., & Gübitz, G. M. (2000). Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. Applied and environmental microbiology, 66(8), 3357-3362.
- Ahmad, M., Roberts, J. N., Hardiman, E. M., Singh, R., Eltis, L. D., & Bugg, T. D. (2011). Identification of DypB from Rhodococcus jostii RHA1 as a lignin peroxidase. Biochemistry, 50(23), 5096-5107.
- Ahmed, E., & Holmström, S. J. (2014). Siderophores in environmental research: roles and applications. Microbial biotechnology, 7(3), 196-208.
- Altelaar, A. M., Munoz, J., & Heck, A. J. (2013). Next-generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics. Nature Reviews Genetics, 14(1), 35.
- Anastassiadis, S., Aivasidis, A., & Wandrey, C. (2002). Citric acid production by *Candida strains* under intracellular nitrogen limitation. Applied Microbiology and Biotechnology, 60(1-2), 81-87.
- Andlar, M., Rezić, T., Marđetko, N., Kracher, D., Ludwig, R., & Šantek, B. (2018). Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. Engineering in Life Sciences, 18(11), 768-778.
- Aracagok, Y. D., & Cihangir, N. (2013). Decolorization of reactive black 5 by *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658. Am J Microbiol Res, 1(2), 16-20.
- Aranda, E. (2016). Promising approaches towards biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons with *Ascomycota fungi*. Current opinion in biotechnology, 38, 1-8.
- Arantes, V., & Goodell, B. (2014). Current understanding of brown-rot fungal biodegradation mechanisms: a review. Deterioration and protection of sustainable biomaterials, 1158, 3-21.
- Arantes, V., & Milagres, A. M. F. (2007a). The effect of a catecholate chelator as a redox agent in Fenton-based reactions on degradation of lignin-model substrates and on COD removal from effluent of an ECF kraft pulp mill. Journal of hazardous materials, 141(1), 273-279.
- Arantes, V., & Milagres, A. M. F. (2007b). The synergistic action of ligninolytic enzymes (MnP and Laccase) and Fe^{3+}-reducing activity from white-rot fungi for degradation of Azure B. Enzyme and microbial technology, 42(1), 17-22.
- Arantes, V., Milagres, A. M., Filley, T. R., & Goodell, B. (2011). Lignocellulosic polysaccharides and lignin degradation by wood decay fungi: the relevance of nonenzymatic Fenton-based reactions. Journal of industrial microbiology & biotechnology, 38(4), 541-555.
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., *et al*. (2000). Gene Ontology: tool for the unification of biology. Nature genetics, 25(1), 25.
- Askwith, C., Eide, D., Van Ho, A., Bernard, P. S., Li, L., Davis-Kaplan, S., *et al*. (1994). The FET3 gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. Cell, 76(2), 403-410.

- Ayed, L., Mahdhi, A., Cheref, A., & Bakhrouf, A. (2011). Decolorization and degradation of azo dye Methyl Red by an isolated *Sphingomonas paucimobilis*: biotoxicity and metabolites characterization. Desalination, 274(1-3), 272-277.
- Ayeronfe, F., Kassim, A., Ishak, N., Aripin, A., Hung, P., & Abdulkareem, M. (2018). A Review on Microbial Degradation of Lignin. Advanced Science Letters, 24(6), 4407-4413.
- Bafana, A., Devi, S. S., & Chakrabarti, T. (2011). Azo dyes: past, present and the future. Environmental Reviews, 19(NA), 350-371.
- Baldrian P (2006). Fungal laccases: occurrence and properties. FEMS Microbiology Reviews, 30:215-242.
- Baldrian, P. (2003). Interactions of heavy metals with white-rot fungi. Enzyme and Microbial technology, 32(1), 78-91.
- Baldrian, P., & Valášková, V. (2008). Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. FEMS microbiology reviews, 32(3), 501-521.
- Baminger, U., Nidetzky, B., Kulbe, K. D., & Haltrich, D. (1999). A simple assay for measuring cellobiose dehydrogenase activity in the presence of laccase. Journal of microbiological methods, 35(3), 253-259.
- Barcia-Vieitez, R., & Ramos-Martínez, J. I. (2014). The regulation of the oxidative phase of the pentose phosphate pathway: new answers to old problems. IUBMB life, 66(11), 775-779.
- Bedekar, P. A., Saratale, R. G., Saratale, G. D., & Govindwar, S. P. (2014). Oxidative stress response in dye degrading bacterium *Lysinibacillus* sp. RGS exposed to Reactive Orange 16, degradation of RO16 and evaluation of toxicity. Environmental Science and Pollution Research, 21(18), 11075-11085.
- Behrens, U., Thierrsch, A., Weissbrodt, E., & Stottmeister, U. (1987). Particularities in the kinetics of growth and citric-acid accumulation by *saccharomycoposis lipolytica*. Acta biotechnologica, 7(2), 179-183.
- Bellenger, J.P., Wichard, T., Kustka, A.B., & Kraepiel, A.M.L. (2008) Uptake of molybdenum and vanadium by a nitrogen-fixing soil bacterium using siderophores. Nature Geoscience 1: 243–246.
- Bendtsen, J. D., Jensen, L. J., Blom, N., Von Heijne, G., & Brunak, S. (2004a). Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. Protein Engineering Design and Selection, 17(4), 349-356.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von Heijne, G., & Brunak, S. (2004b). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. Journal of molecular biology, 340(4), 783-795.
- Bergmeyer, H. U. (1974). Methoden der enzymatischen analyse. Verlag Chemie.
- Bezalel, L., Hadar, Y., & Cerniglia, C. E. (1997). Enzymatic mechanisms involved in phenanthrene degradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology, 63(7), 2495-2501
- Bibi, I., & Bhatti, H. N. (2012). Biodecolorization of Reactive Black 5 by laccase mediator system. African Journal of Biotechnology, 11(29).

- Bibi, I., & Bhatti, H. N. (2012). Enhanced biodecolorization of reactive dyes by basidiomycetes under static conditions. Applied biochemistry and biotechnology, 166(8), 2078-2090.
- Birhanlı, A., & Ozmen, M. (2005). Evaluation of the toxicity and teratogenity of six commercial textile dyes using the frog embryo teratogenesis assay–Xenopus. Drug and chemical toxicology, 28(1), 51-65.
- Blake, J. A. (2013). Ten quick tips for using the gene ontology. PLoS computational biology, 9(11), e1003343.
- Blümel, S., & Stolz, A. (2003). Cloning and characterization of the gene coding for the aerobic azoreductase from *Pigmentiphaga kullae* K24. Applied microbiology and biotechnology, 62(2-3), 186-190.
- Blümel, S., Knackmuss, H. J., & Stolz, A. (2002). Molecular cloning and characterization of the gene coding for the aerobic azoreductase from *Xenophilus azovorans* KF46F. Applied and environmental microbiology, 68(8), 3948-3955.
- Bollag, J. M., & Leonowicz, A. (1984). Comparative studies of extracellular fungal laccases. Applied and environmental microbiology, 48(4), 849-854.
- Bourbonnais, R., & Paice, M. G. (1992). Demethylation and delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor* laccase in the presence of 2, 2′-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). Applied Microbiology and Biotechnology, 36(6), 823-827.
- Braud, A., Jézéquel, K., Bazot, S., & Lebeau, T. (2009a). Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr- and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophore-producing bacteria. Chemosphere 74: 280–286.
- Braud, A., Hoegy, F., Jezequel, K., Lebeau, T., & Schalk, I.J. (2009b) New insights into the metal specificity of the *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine–iron uptake pathway. Environmental Microbiology 11: 1079–1091.
- Burke M. & Cairney J.W.G. (2002). Laccases and other polyphenol oxidases in ecto- and ericoid mycorrhizal fungi. Mycorrhiza, 12:106-116.
- Burner, U., Krapfenbauer, G., Furtmüller, P. G., Regelsberger, G., & Obinger, C. (2000). Oxidation of hydroquinone, 2, 3-dimethylhydroquinone and 2, 3, 5-trimethylhydroquinone by human myeloperoxidase. Redox Report, 5(4), 185-190.
- Bustard, M., McMullan, G., & McHale, A. P. (1998). Biosorption of textile dyes by biomass derived from *Kluyveromyces marxianus* IMB3. Bioprocess Engineering, 19(6), 427-430.
- Camarero S, Sarkar S, Ruiz-Dueñas FJ, Martinez M.J. & Martinez AT (1999). Description of a Versatile Peroxidase Involved in the Natural Degradation of Lignin That Has Both Manganese Peroxidase and Lignin Peroxidase Substrate Interaction Sites. The Journal of Biological Chemistry, 274:10324-10330.
- Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, M. J., & Martínez, Á. T. (2005). Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. Applied and environmental microbiology, 71(4), 1775-1784.
- Campbell, M. S., Law, M., Holt, C., Stein, J. C., Moghe, G. D., Hufnagel, D. E., *et al*. (2014). MAKER-P: a tool kit for the rapid creation, management, and quality control of plant genome annotations. Plant physiology, 164(2), 513-524.

- Campoy, S., Alvarez-Rodriguez, M.L., Recio, E., Rumbero, A., & Coque, J.J. (2009) Biodegradation of 2,4,6-TCA by the white-rot fungus *Phlebia radiata* is initiated by a phase I (O-demethylation)-phase II (O-conjugation) reactions system: implications for the chlorine cycle. Environmental Microbiology 11: 99–110.
- Carro, J., Serrano, A., Ferreira, P., & Martínez, A. T. (2016). Fungal aryl-alcohol oxidase in lignocellulose degradation and bioconversion. In: Microbial Enzymes in Bioconversions of Biomass (pp. 301-322). Springer, Cham.
- Castaño, J. D., Zhang, J., & Schilling, J. S. (2018). Evaluation of colorimetric assays for determination of H_2O_2 in planta during fungal wood decomposition. Journal of Microbiological Methods, 145, 10–13.
- Castillo, M. D., Stenstrom, J., & Ander, P. (1994). Determination of manganese peroxidase activity with 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone and 3-(dimethylamino) benzoic acid. Analytical Biochemistry, 218(2), 399-404.
- Chacko, J. T., & Subramaniam, K. (2011). Enzymatic degradation of azo dyes-a review. International Journal of Environmental Sciences, 1(6), 1250.
- Chagas, E. P., & Durrant, L. R. (2001). Decolorization of azo dyes *by Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajorcaju*. Enzyme and microbial technology, 29(8-9), 473-477.
- Chander, M., & Arora, D. S. (2007). Evaluation of some white-rot fungi for their potential to decolourise industrial dyes. Dyes and Pigments, 72(2), 192-198.
- Chang, J. S., & Lin, C. Y. (2001). Decolorization kinetics of a recombinant *Escherichia coli* strain harboring azo-dye-decolorizing determinants from *Rhodococcus* sp. Biotechnology letters, 23(8), 631-636.
- Chauhan, P. S., Goradia, B., & Saxena, A. (2017). Bacterial laccase: recent update on production, properties and industrial applications. 3 Biotech, 7(5), 323.
- Chen BY (2002). Understanding decolorization characteristics of reactive azo dyes by *Pseudomonas luteola*: toxicity and kinetics. Process Biochemistry, 3:347-446.
- Chen, H. (2006). Recent advances in azo dye degrading enzyme research. Current Protein and Peptide Science, 7(2), 101-111.
- Chen, H., Hopper, S. L., & Cerniglia, C. E. (2005). Biochemical and molecular characterization of an azoreductase from *Staphylococcus aureus*, a tetrameric NADPH-dependent flavoprotein. Microbiology, 151(5), 1433-1441.
- Chen, H., Wang, R. F., & Cerniglia, C. E. (2004). Molecular cloning, overexpression, purification, and characterization of an aerobic FMN-dependent azoreductase from *Enterococcus faecalis*. Protein expression and purification, 34(2), 302-310.
- Chen, S. H., & Ting, A. S. Y. (2015). Biodecolorization and biodegradation potential of recalcitrant triphenylmethane dyes by *Coriolopsis* sp. isolated from compost. Journal of environmental management, 150, 274-280.
- Chung, K. T., & Stevens, S. E. (1993). Degradation azo dyes by environmental microorganisms and helminths. Environmental Toxicology and Chemistry, 12(11), 2121-2132.

- Cifuentes Triana, Y. A. Secuenciación y caracterización del genoma de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* 202-3 con potencial para la producción de etanol de segunda generación. 2016. (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá).
- Clarke, E. A., & Anliker, R. (1980). Handbook of environmental chemistry. Organic Dyes and Pigments, Springer-Verlag, Heidelberg, 181-215.
- Clasquin, M. F., Melamud, E., & Rabinowitz, J. D. (2012). LC-MS data processing with MAVEN: a metabolomic analysis and visualization engine. Current protocols in bioinformatics, 37(1), 14-11.
- Claus, H. (2003). Laccases and their occurrence in prokaryotes. Archives of microbiology, 179(3), 145-150.
- Cohen, R., Persky, L., & Hadar, Y. (2002). Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. Applied microbiology and biotechnology, 58(5), 582-594.
- Cohen, R., Yarden, O., & Hadar, Y. (2002). Lignocellulose affects Mn^{2+} regulation of peroxidase transcript levels in solid-state cultures of *Pleurotus ostreatus*. Applied and environmental microbiology, 68(6), 3156-3158.
- Collins P.J., Dobson A.D.W. & Field J.A. (1998). Reduction of the 2,2′-Azinobis (3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonate) Cation Radical by Physiological Organic Acids in the Absence and Presence of Manganese. Applied and Environmental Microbiology, 64(6):2026- 2031.
- Collins, P. J., & Dobson, A. (1997). Regulation of laccase gene transcription in *trametes versicolor*. Applied and Environmental Microbiology, 63(9), 3444-3450.
- Colpa, D. I., Fraaije, M. W., & van Bloois, E. (2014). DyP-type peroxidases: a promising and versatile class of enzymes. Journal of industrial microbiology & biotechnology, 41(1), 1-7.
- Conesa, A., & Götz, S. (2009). Blast2Go tutorial. Interface.
- Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Talón, M., & Robles, M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. Bioinformatics, 21(18), 3674-3676.
- Copete, L. S., Chanagá, X., Barriuso, J., López-Lucendo, M. F., Martínez, M. J., & Camarero, S. (2015). Identification and characterization of laccase-type multicopper oxidases involved in dye-decolorization by the fungus *Leptosphaerulina sp*. BMC biotechnology, 15(1), 74.
- Cortazar-Martínez, A., González-Ramírez, C. A., Coronel-Olivares, C., Escalante-Lozada, J. A., Castro-Rosas, J., & Villagómez-Ibarra, J. R. (2012). Biotecnología aplicada a la degradación de colorantes de la industria textil. Universidad y ciencia, 28(2), 187-199.
- Črešnar, B., & Petrič, Š. (2011). Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 1814(1), 29-35.

- Dashtban, M., Maki, M., Leung, K. T., Mao, C., & Qin, W. (2010). Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. Critical reviews in biotechnology, 30(4), 302-309.
- Dashtban, M., Schraft, H., Syed, T. A., & Qin, W. (2010). Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. International journal of biochemistry and molecular biology, 1(1), 36.
- Dawley RM, Flurkey WH (1993). Differentiation of tyrosinase and laccase using 4-hexyl-resorcinol, a tyrosinase inhibitor. Phytochemistry, 33(2):281–284.
- Del Angel, V. D., Hjerde, E., Sterck, L., Capella-Gutierrez, S., Notredame, C., Pettersson, O. V., *et al*. (2018). Ten steps to get started in Genome Assembly and Annotation. F1000Research, 7.
- Deshmukh, R., Khardenavis, A. A., & Purohit, H. J. (2016). Diverse metabolic capacities of fungi for bioremediation. Indian journal of microbiology, 56(3), 247-264.
- Devevre, O., Garbaye, J., & Botton, B. (1996). Release of complexing organic acids by rhizosphere fungi as a factor in Norway spruce yellowing in acidic soils. Mycological Research, 100(11), 1367-1374.
- Ding, L., Sabo, A., Berkowicz, N., Meyer, R. R., Shotland, Y., Johnson, M. R., *et al*. (2004). EAnnot: A genome annotation tool using experimental evidence. Genome research, 14(12), 2503-2509.
- Dönmez, G. (2002). Bioaccumulation of the reactive textile dyes by *Candida tropicalis* growing in molasses medium. Enzyme and Microbial Technology, 30(3), 363-366.
- Durairaj, P., Hur, J. S., & Yun, H. (2016). Versatile biocatalysis of fungal cytochrome P450 monooxygenases. Microbial cell factories, 15(1), 125.
- Edwards, R., Del Buono, D., Fordham, M., Skipsey, M., Brazier, M., Dixon, D.P., & Cummings, I. (2005) Differential induction of glutathione transferases and glucosyltransferases in wheat, maize and *Arabidopsis thaliana* by herbicide safeners. Z Naturforsch [C] 60: 307–316.
- Eichlerová, I., Homolka, L., Lisá, L., & Nerud, F. (2006). The influence of extracellular H_2O_2 production on decolorization ability in fungi. Journal of Basic Microbiology, 46(6), 449–455. doi:10.1002/jobm.200610064
- El-Metwally, S., Hamza, T., Zakaria, M., & Helmy, M. (2013). Next-generation sequence assembly: four stages of data processing and computational challenges. PLoS computational biology, 9(12), e1003345.
- Enayatizamir N., Tabandeh F., Rodriguez-Couto S., Yakhchali B., Alikhani H.A. & Mohammadi L. (2011) Biodegradation pathway and detoxification of the diazo dye Reactive Black 5 by *Phanerochaete chrysosporium*. Bioresource Technology, 102:10359-10362.
- Ertuğrul, S., Bakır, M., & Dönmez, G. (2008). Treatment of dye-rich wastewater by an immobilized thermophilic cyanobacterial strain: *Phormidium* sp. ecological engineering, 32(3), 244-248.
- Fairhead, M., & Thöny-Meyer, L. (2012). Bacterial tyrosinases: old enzymes with new relevance to biotechnology. New biotechnology, 29(2), 183-191.

- Faison, B. D., & Kirk, T. K. (1985). Factors involved in the regulation of a ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology, 49(2), 299-304.
- Fayeulle, A., Veignie, E., Slomianny, C., Dewailly, E., Munch, J. C., & Rafin, C. (2014). Energy-dependent uptake of benzo [a] pyrene and its cytoskeleton-dependent intracellular transport by the telluric fungus *Fusarium solani*. Environmental Science and Pollution Research, 21(5), 3515-3523.
- Fekete, F. A. (1993). Assays for microbial siderophores (pp. 399-417). New York: Academic Press.
- Fekete, F. A., Chandhoke, V., & Jellison, J. (1989). Iron-binding compounds produced by wood-decaying basidiomycetes. Applied and environmental microbiology, 55(10), 2720-2722.
- Ferreira, P., Carro, J., Serrano, A., & Martínez, A. T. (2015). A survey of genes encoding H_2O_2-producing GMC oxidoreductases in 10 Polyporales genomes. Mycologia, 107(6), 1105-1119.
- Forgacs, E., Cserhati, T., & Oros, G. (2004). Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. Environment international, 30(7), 953-971.
- Gadd, G. M. (1999). Fungal production of citric and oxalic acid: importance in metal speciation, physiology and biogeochemical processes. In Advances in microbial physiology (Vol. 41, pp. 47-92). Academic Press.
- Gadd, G. M. (2004). Mycotransformation of organic and inorganic substrates. Mycologist, 18(2), 60-70.
- Galhaup, C., Wagner, H., Hinterstoisser, B., & Haltrich, D. (2002). Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. Enzyme and Microbial Technology, 30(4), 529-536.
- Garay, M. B., & Gómez, O. T. (2016). Remoción de colorantes de efluente sintético de industria textil aplicando tecnología avanzada. Industrial Data, 19(2), 91-95.
- Garrigues, F. (2017). NGS: Secuenciación de Segunda Generación. Genética Médica.
- Gasperskaja, E., & Kučinskas, V. (2017). The most common technologies and tools for functional genome analysis. Acta medica Lituanica, 24(1), 1.
- Gaudet P., Škunca N., Hu J.C., Dessimoz C. (2017) Primer on the Gene Ontology. In: Dessimoz C., Škunca N. (eds) The Gene Ontology Handbook. Methods in Molecular Biology, vol 1446. Humana Press, New York, NY.
- Gettemy, J. M., Ma, B., Alic, M., & Gold, M. H. (1998). Reverse transcription-PCR analysis of the regulation of the manganese peroxidase gene family. Applied and environmental microbiology, 64(2), 569-574.
- Gharahdaghi, F., Weinberg, C. R., Meagher, D. A., Imai, B. S., & Mische, S. M. (1999). Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. ELECTROPHORESIS: An International Journal, 20(3), 601-605.

- Ghosh, D. K., Mandal, A., & Chaudhuri, J. (1992). Purification and partial characterization of two azoreductases from *Shigella dysenteriae* type 1. FEMS microbiology letters, 98(1-3), 229-233.
- Gianfreda, L., Xu, F., & Bollag, J. M. (1999). Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. Bioremediation Journal, 3(1), 1-26.
- Gil, N. M. B., Pajot, H. F., Soro, M. D. M. R., de Figueroa, L. I. C., & Kurth, D. (2018). Genome-wide overview of *Trichosporon akiyoshidainum* HP-2023, new insights into its mechanism of dye discoloration. 3 Biotech, 8(10), 440.
- Gingell, R., & Walker, R. (1971). Mechanisms of azo reduction by *Streptococcus faecalis* II. The role of soluble flavins. Xenobiotica, 1(3), 231-239.
- Golan-Rozen, N., Chefetz, B., Ben-Ari, J., Geva, J., & Hadar, Y. (2011). Transformation of the recalcitrant pharmaceutical compound carbamazepine by *Pleurotus ostreatus*: role of cytochrome P450 monooxygenase and manganese peroxidase. Environmental science & technology, 45(16), 6800-6805.
- Gold M.H., Youngs H.L. & Gelpke M.D.S. (2000). Manganese peroxidase. In: Sigel A, Sigel H (Eds). Metal ions in biological systems. Marcel Dekker Inc., New York, pp 559–586.
- Gold, T. Mass Spectrometry Grade. Technical Bulletin# TB309, Promega.
- Goldberg, I., Rokem, J. S., & Pines, O. (2006). Organic acids: old metabolites, new themes. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 81(10), 1601–1611. doi:10.1002/jctb.1590
- Gómez-Toribio, V., García-Martín, A. B., Martínez, M. J., Martínez, Á. T., & Guillén, F. (2009). Induction of extracellular hydroxyl radical production by white-rot fungi through quinone redox cycling. Applied and Environmental Microbiology, 75(12), 3944-3953.
- Goodell, B. (2003). Wood deterioration and preservation advances in our changing world. In ACS symposium series (Vol. 845, pp. 378-398).
- González-Labrada, K., Quesada-Peñate, I., Julcour-Lebigue, C., Delmas, H., Cruz González, G., & Jáuregui-Haza, U. J. (2010). El empleo del ultrasonido en el tratamiento de aguas residuales. Revista CENIC. Ciencias Químicas, 41.
- Gottlieb, A., Shaw, C., Smith, A., Wheatley, A., & Forsythe, S. (2003). The toxicity of textile reactive azo dyes after hydrolysis and decolourisation. Journal of Biotechnology, 101(1), 49-56.
- Grabski, A. C., Grimek, H. J., & Burgess, R. R. (1998). Immobilization of manganese peroxidase from *Lentinula edodes* and its biocatalytic generation of MnIII-chelate as a chemical oxidant of chlorophenols. Biotechnology and bioengineering, 60(2), 204-215.
- Grigoriev, I. V., Nikitin, R., Haridas, S., Kuo, A., Ohm, R., Otillar, R., *et al*., T. (2013). MycoCosm portal: gearing up for 1000 fungal genomes. Nucleic acids research, 42(D1), D699-D704.
- Grinhut, T., Salame, T. M., Chen, Y., & Hadar, Y. (2011). Involvement of ligninolytic enzymes and Fenton-like reaction in humic acid degradation by *Trametes sp*. Applied microbiology and biotechnology, 91(4), 1131-1140.

- Guillén, F., Gómez-Toribio, V., Martınez, M. J., & Martínez, A. T. (2000). Production of hydroxyl radical by the synergistic action of fungal laccase and aryl alcohol oxidase. Archives of Biochemistry and Biophysics, 383(1), 142-147.
- Guivarch, E., Trevin, S., Lahitte, C., & Oturan, M. A. (2003). Degradation of azo dyes in water by electro-Fenton process. Environmental Chemistry Letters, 1(1), 38-44.
- Guo, H., Wang, X.-D., & Lee, D.-J. (2018). Proteomic researches for lignocellulose-degrading enzymes: A mini-review. Bioresource Technology, 265, 532–541.
- Hao, O. J., Kim, H., & Chiang, P. C. (2000). Decolorization of wastewater. Critical reviews in environmental science and technology, 30(4), 449-505
- Harreither, W., Sygmund, C., Augustin, M., Narciso, M., Rabinovich, M. L., Gorton, L., *et al*. (2011). Catalytic properties and classification of cellobiose dehydrogenases from ascomycetes. Applied and environmental microbiology, 77(5), 1804-1815.
- Harwood, C. S., & Parales, R. E. (1996). The β-ketoadipate pathway and the biology of self-identity. Annual Reviews in Microbiology, 50(1), 553-590.
- Heinzkill M, Bech L, Halkier T, Schneider P, Anke T (1998). Characterization of Laccases and Peroxidases from Wood-Rotting Fungi (Family *Coprinaceae*). Applied and Environmental Microbiology, 64:1601-1606.
- Hoegger, P. J., Kilaru, S., James, T. Y., Thacker, J. R., & Kües, U. (2006). Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. The FEBS journal, 273(10), 2308-2326.
- Hofrichter, M., & Ullrich, R. (2006). Heme-thiolate haloperoxidases: versatile biocatalysts with biotechnological and environmental significance. Applied microbiology and biotechnology, 71(3), 276.
- Hofrichter, M., Kellner, H., Pecyna, M. J., & Ullrich, R. (2015). Fungal unspecific peroxygenases: heme-thiolate proteins that combine peroxidase and cytochrome P450 properties. In: Monooxygenase, peroxidase and Peroxygenase properties and mechanisms of cytochrome P450 (pp. 341-368). Springer, Cham.
- Hofrichter, M., Ullrich, R., Pecyna, M. J., Liers, C., & Lundell, T. (2010). New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. Applied microbiology and biotechnology, 87(3), 871-897.
- Holt, C., & Yandell, M. (2011). MAKER2: an annotation pipeline and genome-database management tool for second-generation genome projects. BMC bioinformatics, 12(1), 491.
- Hoopes, J. T., & Dean, J. F. (2004). Ferroxidase activity in a laccase-like multicopper oxidase from *Liriodendron tulipifera*. Plant Physiology and Biochemistry, 42(1), 27-33.
- Horitsu, H., Takada, M., Idaka, E., Tomoyeda, M., & Ogawa, T. (1977). Degradation of p-Aminoazobenzene by *Bacillus subtilis*. European journal of applied microbiology and biotechnology, 4(3), 217-224.
- Hundt, K., Martin, D., Hammer, E., Jonas, U., Kindermann, M.K., & Schauer, F. (2000) Transformation of triclosan by *Trametes versicolor* and *Pycnoporus cinnabarinus*. Applied Environmental Microbiology 66: 4157–4160.

- Husain, Q. (2006). Potential applications of the oxidoreductive enzymes in the decolorization and detoxification of textile and other synthetic dyes from polluted water: a review. Critical reviews in biotechnology, 26(4), 201-221.
- Husain, Q. (2010). Peroxidase mediated decolorization and remediation of wastewater containing industrial dyes: a review. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 9(2), 117-140.
- Hyde, S. M., & Wood, P. M. (1997). A mechanism for production of hydroxyl radicals by the brown-rot fungus Coniophora puteana: Fe (III) reduction by cellobiose dehydrogenase and Fe (II) oxidation at a distance from the hyphae. Microbiology, 143(1), 259-266.
- Ikehata, K., Buchanan, I. D., & Smith, D. W. (2004). Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. Journal of Environmental Engineering and Science, 3(1), 1-19.
- Jadhav, J.P., Parshetti, G.K., Kalme, S.D., & Govindwar, S.P., Decolorization of azo dye methyl red by *Saccharomyces cerevisiae* MTC 463, Chemosphere, 2007, vol. 68, pp. 394–400.
- Jadhav, S.U., Kalme, S.D., & Govindwar, S.P., Biodegradation of methyl red by *Galactomyces geotrichum* MTCC 1360, International Biodeterioration & Biodegradation, 2008, vol. 62, pp. 135–142.
- Jadhav, U. U., Dawkar, V. V., Telke, A. A., & Govindwar, S. P. (2009). Decolorization of Direct Blue GLL with enhanced lignin peroxidase enzyme production in *Comamonas sp* UVS. Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology, 84(1), 126-132.
- Jafari, N., Soudi, M. R., & Kasra-Kermanshahi, R. (2014a). Biodegradation perspectives of azo dyes by yeasts. Microbiology, 83(5), 484-497.
- Jafari, N., Soudi, M. R., & Kasra-Kermanshahi, R. (2014b). Biodecolorization of textile azo dyes by isolated yeast from activated sludge: *Issatchenkia orientalis* JKS6. Annals of microbiology, 64(2), 475-482.
- James, P. (1997). Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. Quarterly reviews of biophysics, 30(4), 279-331.
- Javed, A., Ali, S., Abid, W., & Ali, N. (2017). A review on the potential industrial applications of microbial laccases. Organic Synthesis, 14, 15.
- Jensen, K. A., Houtman, C. J., Ryan, Z. C., & Hammel, K. E. (2001). Pathways for extracellular Fenton chemistry in the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. Applied and Environmental Microbiology, 67(6), 2705-2711.
- Joshi, G., Vyas, G., & Bhojak, N. (2018). Biological Decolorization of Synthetic Dyes: A Review. International Journal of Scientific Research in Science &Technology, 4:372-376.
- Kakuta, T., Tateno, Y., Koizumi, T., Kodama, K., Yoshizawa, K., & Nojiro, K., Azo dye wastewater treatment with immobilized yeast, Journal of Fermentation Technology, 1992, vol. 70, pp. 387–393.

- Kalme, S., Jadhav, S., Jadhav, M., & Govindwar, S. (2009). Textile dye degrading laccase from *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 2112. Enzyme and Microbial Technology, 44(2), 65-71.
- Kalyani, D. C., Patil, P. S., Jadhav, J. P., & Govindwar, S. P. (2008). Biodegradation of reactive textile dye Red BLI by an isolated bacterium *Pseudomonas* sp. SUK1. Bioresource Technology, 99(11), 4635-4641.
- Kalyani, D. C., Telke, A. A., Dhanve, R. S., & Jadhav, J. P. (2009). Ecofriendly biodegradation and detoxification of Reactive Red 2 textile dye by newly isolated Pseudomonas sp. SUK1. Journal of Hazardous Materials, 163(2-3), 735-742.
- Kalyani, D., Dhiman, S. S., Kim, H., Jeya, M., Kim, I. W., & Lee, J. K. (2012). Characterization of a novel laccase from the isolated *Coltricia perennis* and its application to detoxification of biomass. Process biochemistry, 47(4), 671-678.
- Kameshwar, A. K. S., & Qin, W. (2018). Analyzing *Phanerochaete chrysosporium* gene expression patterns controlling the molecular fate of lignocellulose degrading enzymes. Process Biochemistry, 64, 51-62.
- Kameshwar, A. K. S., & Qin, W. (2018). Molecular Networks of *Postia placenta* Involved in Degradation of Lignocellulosic Biomass Revealed from Metadata Analysis of Open Access Gene Expression Data. International journal of biological sciences, 14(3), 237.
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y., & Morishima, K. (2016). KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. Nucleic acids research, 45(D1), D353-D361.
- Kaneko, S., Yoshitake, K., Itakura, S., Tanaka, H., & Enoki, A. (2005). Relationship between production of hydroxyl radicals and degradation of wood, crystalline cellulose, and a lignin-related compound or accumulation of oxalic acid in cultures of brown-rot fungi. Journal of wood science, 51(3), 262-269.
- Keck, A., Klein, J., Kudlich, M., Stolz, A., Knackmuss, H. J., & Mattes, R. (1997). Reduction of azo dyes by redox mediators originating in the naphthalenesulfonic acid degradation pathway of *Sphingomonas* sp. strain BN6. Applied and Environmental Microbiology, 63(9), 3684-3690.
- Kerem, Z., Jensen, K. A., & Hammel, K. E. (1999). Biodegradative mechanism of the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*: evidence for an extracellular hydroquinone-driven fenton reaction. FEBS letters, 446(1), 49-54.
- Kersten, P. J. (1990). Glyoxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: its characterization and activation by lignin peroxidase. Proceedings of the National Academy of Sciences, 87(8), 2936-2940.
- Kersten, P. J., & Kirk, T. K. (1987). Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H_2O_2 production by *Phanerochaete chrysosporium*. Journal of Bacteriology, 169(5), 2195-2201.
- Kersten, P., & Cullen, D. (2014). Copper radical oxidases and related extracellular oxidoreductases of wood-decay Agaricomycetes. Fungal Genetics and Biology, 72, 124-130.

- Khan, R., Bhawana, P., & Fulekar, M. H. (2013). Microbial decolorization and degradation of synthetic dyes: a review. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 12(1), 75-97.
- Khataee, A. R., & Dehghan, G. (2011). Optimization of biological treatment of a dye solution by macroalgae *Cladophora sp*. using response surface methodology. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 42(1), 26-33.
- Kim, S. J., & Shoda, M. (1999). Purification and characterization of a novel peroxidase from *Geotrichum candidum* Dec 1 involved in decolorization of dyes. Applied and Environmental Microbiology, 65(3), 1029-1035.
- Kim, S.J., Ishikawa, K., Hirai, M., & Shoda, M., Characteristics of a newly isolated fungus, *Geotrichum candidum* Dec1, which decolorizes various dyes, Journal of Fermentation & Bioengineering, 1995, vol. 79, pp. 601–607.
- Kirk, T. K., & Cullen, D. (1998). Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry. Wiley, New York, 273-307.
- Kirk, T. K., Tien, M., Kersten, P. J., Mozuch, M. D., & Kalyanaraman, B. (1986). Ligninase of *Phanerochaete chrysosporium*. Mechanism of its degradation of the non-phenolic arylglycerol β-aryl ether substructure of lignin. Biochemical Journal, 236(1), 279-287.
- Koonin, E. V. (2001). Computational genomics. Current Biology, 11(5), R155-R158.
- Koonin, E. V., Makarova, K. S., & Aravind, L. (2001). Horizontal gene transfer in prokaryotes: quantification and classification. Annual Reviews in Microbiology, 55(1), 709-742.
- Korf, I. (2004). Gene finding in novel genomes. BMC bioinformatics, 5(1), 59.
- Korripally, P., Timokhin, V. I., Houtman, C. J., Mozuch, M. D., & Hammel, K. E. (2013). Evidence from *Serpula lacrymans* that 2, 5-dimethoxyhydroquinone is a lignocellulolytic agent of divergent brown-rot basidiomycetes. Applied and environmental microbiology, AEM-03880.
- Kosman, D. J. (2003). Molecular mechanisms of iron uptake in fungi. Molecular microbiology, 47(5), 1185-1197.
- Kourist, R., Bracharz, F., Lorenzen, J., Kracht, O. N., Chovatia, M., Daum, C., *et al*. (2015). Genomics and transcriptomics analyses of the oil-accumulating basidiomycete yeast *Trichosporon oleaginosus*: insights into substrate utilization and alternative evolutionary trajectories of fungal mating systems. MBio, 6(4), e00918-15.
- Krčmář, P., & Ulrich, R. (1998). Degradation of polychlorinated biphenyl mixtures by the lignin-degrading fungus *Phanerochæte chrysosporium*. Folia microbiologica, 43(1), 79-84.
- Kremer, S. M., & Wood, P. M. (1992). Evidence that cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* is primarily an Fe (III) reductas: Kinetic comparison with neutrophil NADPH oxidase and yeast flavocytochrome b2. European journal of biochemistry, 205(1), 133-138.

- Kremer, S. M., & Wood, P. M. (1992). Production of Fenton's reagent by cellobiose oxidase from cellulolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. European journal of biochemistry, 208(3), 807-814.
- Krueger, M. C., Hofmann, U., Moeder, M., & Schlosser, D. (2015). Potential of wood-rotting fungi to attack polystyrene sulfonate and its depolymerisation by *Gloeophyllum trabeum* via hydroquinone-driven Fenton chemistry. PloS one, 10(7), e0131773.
- Kudlich, M., Keck, A., Klein, J., & Stolz, A. (1997). Localization of the enzyme system involved in anaerobic reduction of azo dyes by *Sphingomonas sp*. Strain BN6 and effect of artificial redox mediators on the rate of azo dye reduction. Applied and Environmental Microbiology, 63(9), 3691-3694.
- Kües, U. (2015). Fungal enzymes for environmental management. Current opinion in biotechnology, 33, 268-278.
- Kuhad, R. C., Sood, N., Tripathi, K. K., Singh, A., & Ward, O. P. (2004). Developments in microbial methods for the treatment of dye effluents. Advances in applied microbiology, 56, 185.
- Kurek, B., & Kersten, P. J. (1995). Physiological regulation of glyoxal oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* by peroxidase systems. Enzyme and Microbial Technology, 17(41), 465-505.
- Laemmli, U. K. (1970). Reagent and gel preparation for SDS-PAGE slab gel. Nature, 227, 680.
- Lafuente, S. V. L., Azcárate, M. I. B., & Benito, B. A. (1997). Introducción a la química orgánica (Vol. 6). Publicacions de la Universitat Jaume I.
- Lamb, D. C., Kaderbhai, N. N., Venkateswarlu, K., Kelly, D. E., Kelly, S. L., & Kaderbhai, M. A. (2001). Human sterol 14α-demethylase activity is enhanced by the membrane-bound state of cytochrome b5. Archives of biochemistry and biophysics, 395(1), 78-84.
- Lamb, D. C., Warrilow, A. G., Venkateswarlu, K., Kelly, D. E., & Kelly, S. L. (2001). Activities and kinetic mechanisms of native and soluble NADPH–cytochrome P450 reductase. Biochemical and biophysical research communications, 286(1), 48-54.
- Lan, J., Huang, X., Hu, M., Li, Y., Qu, Y., Gao, P., & Wu, D. (2006). High efficient degradation of dyes with lignin peroxidase coupled with glucose oxidase. Journal of biotechnology, 123(4), 483-490.
- Landvick, S., Ostergaard, L. H., Kalum, L. (2016a). Polypeptides having peroxygenase activity. Patent (International) WO2014056916A3
- Landvick, S., Ostergaard, L. H., Kalum, L. (2016b). Polypeptides having peroxygenase activity and polynucleotides encoding same. Patent (USA) US20160244731A1.
- Larrondo, L. F., Salas, L., Melo, F., Vicuña, R., & Cullen, D. (2003). A novel extracellular multicopper oxidase *from Phanerochaete chrysosporium* with ferroxidase activity. Applied and environmental microbiology, 69(10), 6257-6263.
- Laxminarayana, E., Chary, M. T., Kumar, M. R., & Singara Charya, M. A. (2010). Decolourisation and biodegradation of sulphonated azo dyes by fungi to clean dye contaminated soil environments. Journal of Natural and Environmental Sciences, 1(1), 35-42.

- Le Marechal, A. M., Križanec, B., Vajnhandl, S., & Valh, J. V. (2012). Textile finishing industry as an important source of organic pollutants. In Organic pollutants ten years after the Stockholm convention-environmental and analytical update. InTech, ISBN: 978-953-307-917-2.
- Leisola, M. S., Thanei-Wyss, U., & Fiechter, A. (1985). Strategies for production of high ligninase activities by *Phanerochaete chrysosporium*. Journal of biotechnology, 3(1-2), 97-107.
- Leisola, M. S., Ulmer, D. C., Waldner, R., & Fiechter, A. (1984). Role of veratryl alcohol in lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. Journal of Biotechnology, 1(5-6), 331-339.
- Lesuisse, E., Casteras-Simon, M., & Labbe, P. (1997). Cytochrome P-450 reductase is responsible for the ferrireductase activity associated with isolated plasma membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS microbiology letters, 156(1), 147-152.
- Levin, L., Herrmann, C., & Papinutti, V. L. (2008). Optimization of lignocellulolytic enzyme production by the white-rot fungus *Trametes trogii* in solid-state fermentation using response surface methodology. Biochemical Engineering Journal, 39(1), 207-214.
- Liers, C., Bobeth, C., Pecyna, M., Ullrich, R., & Hofrichter, M. (2010). DyP-like peroxidases of the jelly fungus *Auricularia auricula-judae* oxidize nonphenolic lignin model compounds and high-redox potential dyes. Applied microbiology and biotechnology, 85(6), 1869-1879.
- Liers, C., Pecyna, M. J., Kellner, H., Worrich, A., Zorn, H., Steffen, K. T., *et al*. (2013). Substrate oxidation by dye-decolorizing peroxidases (DyPs) from wood-and litter-degrading agaricomycetes compared to other fungal and plant heme-peroxidases. Applied microbiology and biotechnology, 97(13), 5839-5849.
- Linde, D., Ruiz-Dueñas, F. J., Fernández-Fueyo, E., Guallar, V., Hammel, K. E., Pogni, R., & Martínez, A. T. (2015). Basidiomycete DyPs: Genomic diversity, structural–functional aspects, reaction mechanism and environmental significance. Archives of biochemistry and biophysics, 574, 66-74.
- Liu, X., Du, Q., Wang, Z., Zhu, D., Huang, Y., Li, N., *et al*. (2011). Crystal structure and biochemical features of EfeB/YcdB from *Escherichia coli* O157 ASP235 plays divergent roles in different enzyme-catalyzed processes. Journal of Biological Chemistry, *286*(17), 14922-14931.
- Liu, G., Zhou, J., Wang, J., Zhou, M., Lu, H., & Jin, R. (2009). Acceleration of azo dye decolorization by using quinone reductase activity of azoreductase and quinone redox mediator. Bioresource technology, 100(11), 2791-2795.
- Liu, W., Chao, Y., Yang, X., Bao, H., & Qian, S. (2004). Biodecolorization of azo, anthraquinonic and triphenylmethane dyes by white-rot fungi and a laccase-secreting engineered strain. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 31(3), 127-132.
- Lomsadze, A., Ter-Hovhannisyan, V., Chernoff, Y. O., & Borodovsky, M. (2005). Gene identification in novel eukaryotic genomes by self-training algorithm. Nucleic acids research, 33(20), 6494-6506.
- Lucas, M. S., Amaral, C., Sampaio, A., Peres, J. A., & Dias, A. A. (2006). Biodegradation of the diazo dye Reactive Black 5 by a wild isolate of *Candida oleophila*. Enzyme and Microbial Technology, 39(1), 51-55.

- MacDonald, J., Doering, M., Canam, T., Gong, Y., Guttman, D.S., Campbell, M.M., & Master, E.R. (2011) Transcriptomic responses of the softwood-degrading white-rot fungus *Phanerochaete carnosa* during growth on coniferous and deciduous wood. Applied and Environmental Microbiology, 77: 3211–3218.
- Maier, J., Kandelbauer, A., Erlacher, A., Cavaco-Paulo, A., & Gübitz, G. M. (2004). A new alkali-thermostable azoreductase from *Bacillus sp*. strain SF. Applied and environmental microbiology, 70(2), 837-844.
- Majcherczyk, A., Johannes, C., & Hüttermann, A. (1998). Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*. Enzyme and Microbial Technology, 22(5), 335-341.
- Mäkelä, M. R., Lundell, T., Hatakka, A., & Hildén, K. (2013). Effect of copper, nutrient nitrogen, and wood-supplement on the production of lignin-modifying enzymes by the white-rot fungus *Phlebia radiata*. Fungal biology, 117(1), 62-70.
- Mansour, H. B., Mosrati, R., Corroler, D., Ghedira, K., Barillier, D., & Chekir, L. (2009). In vitro mutagenicity of Acid Violet 7 and its degradation products by *Pseudomonas putida* mt-2: correlation with chemical structures. Environmental toxicology and pharmacology, 27(2), 231-236.
- Marco-Urrea, E.; Perez-Trujillo, M.; Vicent, T.; Caminal, G. Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. (2009a) Chemosphere, 74 (6), 765–772.
- Marco-Urrea, E.; Radjenovic, J.; Caminal, G.; Petrovic, M.; Vicent, T.; Barcelo, D. Oxidation of atenolol, propranolol, carbamazepine and clofibric acid by a biological Fenton-like system mediated by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. (2009b) Water Reserch, 44, 521–532
- Martínez de Bartolomé Izquierdo, S. (2013). Métodos de validación de identificaciones a gran escala de proteínas y desarrollo e implementación de estándares en Proteómica. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología Molecular.
- Martinez, A. T., Ruiz-Duenas, F. J., Camarero, S., Serrano, A., Linde, D., Lund, H., *et al*. (2017). Oxidoreductases on their way to industrial biotransformations. Biotechnology advances, 35(6), 815-831.
- Martinez, D., Challacombe, J., Morgenstern, I., Hibbett, D., Schmoll, M., Kubicek, C. P., *et al*. (2009). Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus *Postia placenta* supports unique mechanisms of lignocellulose conversion. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106(6), 1954-1959.
- Martínez, A. T., Camarero, S., Ruiz-Dueñas, F. J., & Martínez, M. J. (2018). Biological lignin degradation. Lignin Valorization: Emerging Approaches, 19, 199.
- Martins, M. A. M., Cardoso, M. H., Queiroz, M. J., Ramalho, M. T., & Campus, A. M. O. (1999). Biodegradation of azo dyes by the yeast *Candida zeylanoides* in batch aerated cultures. Chemosphere, 38(11), 2455-2460.
- Martorell, M. M., Pajot, H. F., & de Figueroa, L. I. (2012). Dye-decolourizing yeasts isolated from Las Yungas rainforest. Dye assimilation and removal used as selection criteria. International biodeterioration & biodegradation, 66(1), 25-32.

- Martorell, M. M., Pajot, H. F., & de Figueroa, L. I. (2017). Biological degradation of Reactive Black 5 dye by yeast *Trichosporon akiyoshidainum*. Journal of Environmental Chemical Engineering, 5(6), 5987-5993.
- Martorell, M. M., Pajot, H. F., Rovati, J. I., & Figueroa, L. I. (2012). Optimization of culture medium composition for manganese peroxidase and tyrosinase production during Reactive Black 5 decolourization by the yeast *Trichosporon akiyoshidainum*. Yeast, 29(3-4), 137-144.
- Martorell, M.M. (2015) Participación de mecanismos enzimáticos en biodecoloración con levaduras aisladas de ambientes naturales. Aspectos básicos y aplicación biotecnológica. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Tucumán, Argentina.
- Mazmanci MA, Unyayar A (2010). Decolorization efficiency of *Funalia trogii* under static condition: Effect of C: N ratios. African Journal of Biotechnology, 9(39):6539-6544.
- McMullan, G., Meehan, C., Conneely, A., Kirby, N., Robinson, T., Nigam, P., *et al*. (2001). Microbial decolourisation and degradation of textile dyes. Applied microbiology and biotechnology, 56(1-2), 81-87.
- Meehan, C., Banat, I. M., McMullan, G., Nigam, P., Smyth, F., & Marchant, R. (2000). Decolorization of Remazol Black-B using a thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* IMB3. Environment international, 26(1-2), 75-79.
- Milagres, A. M. F., Arantes, V., Medeiros, C. L., & Machuca, A. (2002). Production of metal chelating compounds by white and brown-rot fungi and their comparative abilities for pulp bleaching. Enzyme and microbial Technology, 30(4), 562-565.
- Mohorčič M, Friedrich J, Pavkob A (2004). Decoloration of the diazo dye Reactive Black 5 by immobilized *Bjerkandera adusta* in a stirred tank bioreactor. Acta Chimica Slovenica, 51:619−628.
- Moreira, P. R., Bouillenne, F., Almeida-Vara, E., Malcata, F. X., Frere, J. M., & Duarte, J. C. (2006). Purification, kinetics and spectral characterisation of a new versatile peroxidase from a *Bjerkandera sp*. isolate. Enzyme and microbial technology, 38(1-2), 28-33.
- Morel, M., Meux, E., Mathieu, Y., Thuillier, A., Chibani, K., Harvengt, L., *et al*., (2013). Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi. Microbial biotechnology, 6(3), 248-263.
- Morris, P. J., & Travis, A. S. (1992). A history of the international dyestuff industry. American Dyestuff Reporter, 81, 59-59.
- Myung, K., Narciso, J.A., & Manthey, J.A. (2008) Removal of furanocoumarins in grapefruit juice by edible fungi. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56: 12064–12068.
- Nakanishi, M., Yatome, C., Ishida, N., & Kitade, Y. (2001). Putative ACP phosphodiesterase gene (acpD) encodes an azoreductase. Journal of Biological Chemistry, 276: 46394-46399.
- Neamtu, M., Yediler, A., Siminiceanu, I., Macoveanu, M., & Kettrup, A. (2004). Decolorization of disperse red 354 azo dye in water by several oxidation processes—a comparative study. Dyes and pigments, 60(1), 61-68.

- Neamtu, M., Zaharia, C., Catrinescu, C., Yediler, A., Macoveanu, M., & Kettrup, A. (2004). Fe-exchanged Y zeolite as catalyst for wet peroxide oxidation of reactive azo dye Procion Marine H-EXL. Applied Catalysis B: Environmental, 48(4), 287-294.
- Newcombe, D., Paszczynski, A., Gajewska, W., Kröger, M., Feis, G., & Crawford, R. (2002). Production of small molecular weight catalysts and the mechanism of trinitrotoluene degradation by several *Gloeophyllum species*. Enzyme and Microbial Technology, 30(4), 506-517.
- Ning, D., Wang, H., & Zhuang, Y. (2010) Induction of functional cytochrome P450 and its involvement in degradation of benzoic acid by *Phanerochaete chrysosporium*. Biodegradation 21: 297–308.
- Nouren, S., Bhatti, H. N., Iqbal, M., Bibi, I., Nazar, N., Iqbal, D. N., *et al.* (2017). Redox Mediators Assisted-degradation of Direct Yellow 4. Polish Journal of Environmental Studies, 26(6), 2885-2890.
- Ogola HJ, Kamiike T, Hashimoto N, Ashida H, Ishikawa T, Shibata H, Sawa Y (2009). Molecular characterization of a novel peroxidase from the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. Applied and Environmental Microbiology, 75:7509–7518
- Omar, H. H. (2008). Algal decolorization and degradation of monoazo and diazo dyes. Pakistan Journal of Biological Science, 11(10), 1310-1316.
- Oren A, Guverich P, Henys Y (1991). Reduction of nitrosubstituted aromatic compounds by the halophilic anaerobic eubacteria Haloanaerobium praevalens and *Sporohalobacter marismortui*. Applied and Environmental Microbiology, 57: 3367-3370.
- Pagnocca, F. C., Legaspe, M. F., Rodrigues, A., Ruivo, C. C., Nagamoto, N. S., Bacci Jr, M., & Forti, L. C. (2010). Yeasts isolated from a fungus-growing ant nest, including the description of *Trichosporon chiarellii* sp. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 60(6), 1454-1459.
- Pajot HF (2009). Biodecoloración de colorantes textiles reactivos con aislamientos de levaduras de ecosistemas vírgenes y ambientes contaminados. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Tucumán. Tucumán, Argentina.
- Pajot HF, Figueroa LIC, Spencer JF, Fariña JI (2008) Phenotypical and genetic characterization of *Trichosporon sp*. HP-2023. A yeast isolate from Las Yungas rainforest (Tucumán, Argentina) with dye-decolorizing ability. Antonie Van Leeuwenhoek, 94(2):233-244.
- Pajot, H. F., de Figueroa, L. I., & Fariña, J. I. (2007). Dye-decolorizing activity in isolated yeasts from the ecoregion of Las Yungas (Tucumán, Argentina). Enzyme and Microbial Technology, 40(6), 1503-1511.
- Pajot, H. F., Delgado, O. D., de Figueroa, L. I., & Fariña, J. I. (2011). Unraveling the decolourizing ability of yeast isolates from dye-polluted and virgin environments: an ecological and taxonomical overview. Antonie van Leeuwenhoek, 99(3), 443-456.
- Pajot, H. F., Figueroa, L. I., Spencer, J. F., & Fariña, J. I. (2008). Phenotypical and genetic characterization of *Trichosporon sp*. HP-2023. A yeast isolate from Las Yungas rainforest (Tucumán, Argentina) with dye-decolorizing ability. Antonie van Leeuwenhoek, 94(2), 233-244.

- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B., & Sannia, G. (2000). Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. Applied and environmental microbiology, 66(3), 920-924.
- Pandey, A. V., & Fluck, C. E. (2013) NADPH P450 oxidoreductase: structure, € function, and pathology of diseases. Pharmacology Therapeutics, 138, 229–254.
- Pandey, A., Singh, P., & Iyengar, L. (2007). Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. International biodeterioration & biodegradation, 59(2), 73-84.
- Parikka, K., Master, E., & Tenkanen, M. (2015). Oxidation with galactose oxidase: multifunctional enzymatic catalysis. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 120, 47-59.
- Pearce CI, Christie R, Boothman C, von Canstein H, Guthrie JT, Lloyd JR (2006). Reactive azo dye reduction by Shewanella strain J18 143. Biotechnology and Bioengineering, 95(4):692-703.
- Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. Nature methods, 8(10), 785.
- Pointing, S. B., & Vrijmoed, L. L. P. (2000). Decolorization of azo and triphenylmethane dyes by *Pycnoporus sanguineus* producing laccase as the sole phenoloxidase. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 16(3), 317-318.
- Pompeu, G. B., Pietrobon, V. C., Andreote, C. C. F., Ferreira, L. F. R., Aguiar, M., Sartori, S. B., *et al*. (2018). Role of the antioxidant defense system during the production of lignocellulolytic enzymes by fungi. International Microbiology. doi:10.1007/s10123-018-00045-1
- Poul, M., Jarry, G., Elhkim, M. O., & Poul, J. M. (2009). Lack of genotoxic effect of food dyes amaranth, sunset yellow and tartrazine and their metabolites in the gut micronucleus assay in mice. Food and chemical toxicology, 47(2), 443-448.
- Purnomo, A. S., Kamei, I., & Kondo, R. (2008). Degradation of 1, 1, 1-trichloro-2, 2-bis (4-chlorophenyl) ethane (DDT) by brown-rot fungi. Journal of bioscience and bioengineering, 105(6), 614-621.
- Purnomo, A. S., Mori, T., & Kondo, R. (2010). Involvement of Fenton reaction in DDT degradation by brown-rot fungi. International Biodeterioration & Biodegradation, 64(7), 560-565.
- Purnomo, A. S., Mori, T., Takagi, K., & Kondo, R. (2011a). Bioremediation of DDT contaminated soil using brown-rot fungi. International Biodeterioration & Biodegradation, 65(5), 691-695.
- Purnomo, A. S., Mori, T., Kamei, I., & Kondo, R. (2011b). Basic studies and applications on bioremediation of DDT: a review. International Biodeterioration & Biodegradation, 65(7), 921-930.
- Puvaneswari, N., Muthukrishnan, J., & Gunasekaran, P. (2006). Toxicity assessment and microbial degradation of azo dyes. Indian Journal of Experimental Biology, 44: 618-626.
- Rafii, F., Hall, J. D., & Cerniglia, C. E. (1997). Mutagenicity of azo dyes used in foods, drugs and cosmetics before and after reduction by *Clostridium* species from the human intestinal tract. Food and chemical Toxicology, 35(9), 897-901.

- Rahouti M., Benoit-Guyod J.L., Murandi F.S., Guiraud P. (1995). Sensitivity and specificity of phenoloxidase reactions of 1059 strains and species of *Mycromycetes* cultivated on malt/agar medium. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 11:497-501.
- Rajpert, L., Skłodowska, A., & Matlakowska, R. (2013). Biotransformation of copper from Kupferschiefer black shale (Fore-Sudetic Monocline, Poland) by yeast *Rhodotorula mucilaginosa* LM9. Chemosphere, 91(9), 1257-1265.
- Ramalho P.A., Cardoso M.H., Cavaco-Paulo A., Ramalho M.T. (2004). Characterization of azo reduction activity in a novel ascomycete yeast strain. Applied and Environmental Microbiology, 70:2279-2288.
- Ramalho P.A., Paiva S., Cavaco-Paulo A., Casal M. Cardoso M.H., Ramalho M.T. (2005). Azo reductse activity in intact *Saccharomyces cerevisiae* cells is dependent on the Fre1p component of the plasma membrane ferric reductase. Applied and Environmental Technology, 848-854.
- Ramalho, P. A., Scholze, H., Cardoso, M. H., Ramalho, M. T., & Oliveira-Campos, A. M. (2002). Improved conditions for the aerobic reductive decolourisation of azo dyes by *Candida zeylanoides*. Enzyme and Microbial Technology, 31(6), 848-854.
- Ramsay J.A., Nguyen T. (2002). Decoloration of textile dyes by *Trametes versicolor* and its effect on dye toxicity. Biotechnology Letters, 24(21):1757-1761.
- Rancano, G., Lorenzo, M., Molares, N., Couto, S. R., & Sanromán, M. Á. (2003). Production of laccase by *Trametes versicolor* in an airlift fermentor. Process Biochemistry, 39(4), 467-473.
- Rao, M. A., Scelza, R., Acevedo, F., Diez, M. C., & Gianfreda, L. (2014). Enzymes as useful tools for environmental purposes. Chemosphere, 107, 145-162.
- Rapisarda, V. A., Montelongo, L. R., Farías, R. N., & Massa, E. M. (1999). Characterization of an NADH-linked cupric reductase activity from the *Escherichia coli* respiratory chain. Archives of biochemistry and biophysics, 370(2), 143-150.
- Rashid, G. M. M., Zhang, X., Wilkinson, R. C., Fülöp, V., Cottyn, B., Baumberger, S., & Bugg, T. D. H. (2018). *Sphingobacterium* sp. T2 manganese superoxide dismutase catalyses the oxidative demethylation of polymeric lignin via generation of hydroxyl radical. ACS Chemical Biology. doi:10.1021/acschembio.8b00557
- Ravichandran, A., & Sridhar, M. (2016). Versatile peroxidase: Super peroxidases with potential biotechnological applications. Journal of Diary, Veterinary & Animal Research, 4(2), 00116.
- Reddy, G.V., & Gold, M.H. (2000) Degradation of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: intermediates and reactions involved. Microbiology 146 (Part 2): 405–413.
- Reid, T. M., Morton, K. C., Wang, C. Y., & King, C. M. (1984). Mutagenicity of azo dyes following metabolism by different reductive/oxidative systems. Environmental mutagenesis, 6(5), 705-717.
- Reyes, P., Pickard, M. A., & Vazquez-Duhalt, R. (1999). Hydroxybenzotriazole increases the range of textile dyes decolorized by immobilized laccase. Biotechnology Letters, 21(10), 875-880.

- Rezaei, S., Shahverdi, A. R., & Faramarzi, M. A. (2017). Isolation, one-step affinity purification, and characterization of a polyextremotolerant laccase from the halophilic bacterium *Aquisalibacillus elongatus* and its application in the delignification of sugar beet pulp. Bioresource technology, 230, 67-75.
- Rizqi, H. D., & Purnomo, A. S. (2017). The ability of brown-rot fungus *Daedalea dickinsii* to decolorize and transform methylene blue dye. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 33(5), 92.
- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R., & Nigam, P. (2001). Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. Bioresource technology, 77(3), 247-255.
- Rodríguez-Bustamante E., Maldonado-Robledo G., Arreguín-Espinosa R., Mendoza-Hernández G., Rodríguez-Sanoja R. & Sánchez S. (2009). Glucose exerts a negative effect over a peroxidase from *Trichosporon asahii*, with carotenoid cleaving activity. Applied Microbiology and Biotechnolgy, 84(3):499-510.
- Rodríguez-López J.N., Escribano J. & García-Cánovas F. (1994). A continuous spectrophotometric method for the determination of monophenolase activity of tyrosinase using 3-methyl-2- benzothiazolinone hydrazone. Analytical Biochemistry, 216(1):205-12.
- Rodríguez-Rincón, F., Suarez, A., Lucas, M., Larrondo, L. F., de la Rubia, T., Polaina, J., & Martínez, J. (2010). Molecular and structural modeling of the *Phanerochaete flavido-alba* extracellular laccase reveals its ferroxidase structure. Archives of microbiology, 192(11), 883-892.
- Rosenkranz, H. S., & Klopman, G. (1990). Structural basis of carcinogenicity in rodents of genotoxicants and non-genotoxicants. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 228(2), 105-124.
- Rosenkranz, H. S., & Klopman, G. (1990). The structural basis of the mutagenicity of chemicals in *Salmonella typhimirium*: The National Toxicology Program data base. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 228(1), 51-80.
- Ruiz-Dueñas, F. J., Fernández, E., Martínez, M. J., & Martínez, A. T. (2011). *Pleurotus ostreatus* heme peroxidases: an in silico analysis from the genome sequence to the enzyme molecular structure. Comptes rendus biologies, 334(11), 795-805.
- Salokhe, M. D., & Govindwar, S. P. (1999). Effect of carbon source on the biotransformation enzymesin *Serratia marcescens*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 15(2), 259-263.
- Sang, H., Hulvey, J. P., Green, R., Xu, H., Im, J., Chang, T., & Jung, G. (2018). A xenobiotic detoxification pathway through transcriptional regulation in filamentous fungi. mBio, 9(4), e00457-18.
- Santana, C. S., & Aguiar, A. (2015). Effect of biological mediator, 3-hydroxyanthranilic acid, in dye decolorization by Fenton processes. International Biodeterioration & Biodegradation, 104, 1-7.
- Saratale, R. G., Saratale, G. D., Chang, J. S., & Govindwar, S. P. (2009). Decolorization and biodegradation of textile dye Navy blue HER by *Trichosporon beigelii* NCIM-3326. Journal of Hazardous Materials, 166(2-3), 1421-1428.

- Sato, T., Hara, S., Matsui, T., Sazaki, G., Saijo, S., Ganbe, T., *et al*. (2004). A unique dye-decolorizing peroxidase, DyP, from *Thanatephorus cucumeris* Dec 1: heterologous expression, crystallization and preliminary X-ray analysis. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 60(1), 149-152.
- Schägger, H., & Von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Analytical biochemistry, 166(2), 368-379.
- Schlosser, D., & Höfer, C. (2002). Laccase-catalyzed oxidation of Mn^{2+} in the presence of natural Mn^{3+} chelators as a novel source of extracellular H_2O_2 production and its impact on manganese peroxidase. Applied and Environmental Microbiology, 68(7), 3514-3521.
- Sen, S. K., Raut, S., Bandyopadhyay, P., & Raut, S. (2016). Fungal decolouration and degradation of azo dyes: a review. Fungal Biology Reviews, 30(3), 112-133.
- Shah, V., & Nerud, F. (2002). Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye decolorization. Canadian Journal of Microbiology, 48(10), 857–870. doi:10.1139/w02-090
- Shah, V., Verma, P., Stopka, P., Gabriel, J., Baldrian, P., & Nerud, F. (2003). Decolorization of dyes with copper (II)/organic acid/hydrogen peroxide systems. Applied Catalysis B: Environmental, 46(2), 287-292.
- Shah, V., Dobiášová, P., Baldrian, P., Nerud, F., Kumar, A., & Seal, S. (2010). Influence of iron and copper nanoparticle powder on the production of lignocellulose degrading enzymes in the fungus *Trametes versicolor*. Journal of hazardous materials, 178(1-3), 1141-1145.
- Shimada, M., Akamtsu, Y., Tokimatsu, T., Mii, K., & Hattori, T. (1997). Possible biochemical roles of oxalic acid as a low molecular weight compound involved in brown-rot and white-rot wood decays. Journal of Biotechnology, 53(2-3), 103-113.
- Shin, J., Kim, J. E., Lee, Y. W., & Son, H. (2018). Fungal cytochrome P450s and the P450 complement (CYPome) of *Fusarium graminearum*. Toxins, 10(3), 112.
- Siaha, M., Farzaeia, M. H., Ashrafi-Kooshka, M. R., Adibib, H., & Khodarahmi, R. (2017). A Spectrophotometric Method for the Determination of Aldehyde Oxidase Activity Using 3-Methyl-2-Benzothiazolinone Hydrazine: A Preliminary Study. Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences, 6(1), 23-33.
- Singh, P. K., & Singh, R. L. (2017). Bio-removal of Azo dyes: a review. International Journal of Applied Sciences and Biotechnology, 5(2), 108-126.
- Singh, R. L., Khanna, S. K., & Singh, G. B. (1987). Safety evaluation studies on metanil yellow, (I) Acute and subchronic exposure response. Bev Food World, 74, 9-13.
- Singh, R. L., Khanna, S. K., & Singh, G. B. (1988). Acute and short-term toxicity of a popular blend of metanil yellow and orange II in albino rats. Indian journal of experimental biology, 26(2), 105.
- Singh, R. L., Singh, P. K., & Singh, R. P. (2015). Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes–A review. International Biodeterioration & Biodegradation, 104, 21-31.
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, P. K. (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. 3 Biotech, 6(2), 174.

- Sinitcyn, P., Rudolph, J. D., & Cox, J. (2018). Computational methods for understanding mass spectrometry–based shotgun proteomics data. Annual Review of Biomedical Data Science, 1, 207-234.
- Sista Kameshwar, A. K., & Qin, W. (2018). Comparative study of genome-wide plant biomass-degrading CAZymes in white rot, brown rot and soft rot fungi. Mycology, 9(2), 93-105.
- Sklenar, J., Niku-Paavola, M. L., Santos, S., Man, P., Kruus, K., & Novotny, C. (2010). Isolation and characterization of novel pI 4.8 MnP isoenzyme from white-rot fungus *Irpex lacteus*. Enzyme and Microbial Technology, 46(7), 550-556.
- Sláviková, E., Košíková, B., & Mikulášová, M. (2002). Biotransformation of waste lignin products by the soil-inhabiting yeast *Trichosporon pullulans*. Canadian journal of microbiology, 48(3), 200-203.
- Soares, G. M., de Amorim, M. P., & Costa-Ferreira, M. (2001). Use of laccase together with redox mediators to decolourize Remazol Brilliant Blue R. Journal of Biotechnology, 89(2-3), 123-129.
- Sondhi, S., Sharma, P., Saini, S., Puri, N., & Gupta, N. (2014). Purification and characterization of an extracellular, thermo-alkali-stable, metal tolerant laccase from *Bacillus tequilensis* SN4. PloS one, 9(5), e96951.
- Song S, Ju L, He Z, Chen J (2007). Mechanism of the Photocatalytic Degradation of C.I. Reactive Black 5 at pH 12.0 Using SrTiO3/CeO2 as the Catalyst. Environmental Science and Technology, 41(16): 5846-5853.
- Srinivasan, A., & Viraraghavan, T. (2010). Decolorization of dye wastewaters by biosorbents: A review. Journal of Environmental Management, 91(10), 1915–1929.
- Stanke, M., Schöffmann, O., Morgenstern, B., & Waack, S. (2006). Gene prediction in eukaryotes with a generalized hidden Markov model that uses hints from external sources. BMC bioinformatics, 7(1), 62.
- Stein, L. (2001). Genome annotation: from sequence to biology. Nature reviews genetics, 2(7), 493.
- Stolz, A. (2001). Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. Applied microbiology and biotechnology, 56(1-2), 69-80.
- Strasser, K., McDonnell, E., Nyaga, C., Wu, M., Wu, S., Almeida, H., *et al*. (2015). mycoCLAP, the database for characterized lignocellulose-active proteins of fungal origin: resource and text mining curation support. Database, 2015.
- Subramanian, V., & Yadav, J.S. (2009) Role of P450 monooxygenases in the degradation of the endocrine-disrupting chemical nonylphenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Appl Environ Microbiol 75: 5570–5580.
- Sugano, Y. (2009). DyP-type peroxidases comprise a novel heme peroxidase family. Cellular and Molecular Life Sciences, 66(8), 1387-1403.
- Sugano, Y., Matsushima, Y., Tsuchiya, K., Aoki, H., Hirai, M., & Shoda, M. (2009). Degradation pathway of an anthraquinone dye catalyzed by a unique peroxidase DyP from *Thanatephorus cucumeris* Dec 1. Biodegradation, 20(3), 433-440.

- Sugano, Y., Nakano, R., Sasaki, K., & Shoda, M. (2000). Efficient Heterologous Expression in *Aspergillus oryzae* of a Unique Dye-Decolorizing Peroxidase, DyP, of *Geotrichum candidum* Dec 1. Applied and environmental microbiology, 66(4), 1754-1758.
- Sugano, Y., Sasaki, K., & Shoda, M. (1999). cDNA cloning and genetic analysis of a novel decolorizing enzyme, peroxidase gene dyp from *Geotrichum candidum* Dec 1. Journal of bioscience and bioengineering, 87(4), 411-417.
- Sun, S., Xie, S., Chen, H., Cheng, Y., Shi, Y., Qin, X., *et al*. (2016). Genomic and molecular mechanisms for efficient biodegradation of aromatic dye. Journal of hazardous materials, 302, 286-295.
- Sun, S., Xie, S., Cheng, Y., Yu, H., Zhao, H., Li, M., *et al*. (2017). Enhancement of Environmental Hazard Degradation in the Presence of Lignin: a Proteomics Study. Scientific Reports, 7(1), 11356.
- Supaka N., Juntongjin K., Damronglerd S., Delia M.L. & Strehaiano P. (2004). Microbial decolorization of reactive azo dyes in a sequential anaerobic-aerobic system. Chemical Engineering Journal, 99:169-176.
- Sutherland, J.B., Selby, A.L., Freeman, J.P., Evans, F.E., & Cerniglia, C.E. (1991) Metabolism of phenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology, 57: 3310–3316.
- Svobodová, K., Senholdt, M., Novotný, Č., & Rehorek, A. (2007). Mechanism of Reactive Orange 16 degradation with the white rot fungus *Irpex lacteus*. Process Biochemistry, 42(9), 1279-1284.
- Swamy, J., & Ramsay, J. A. (1999). Effects of glucose and NH_4^+ concentrations on sequential dye decoloration by *Trametes versicolor*. Enzyme and Microbial Technology, 25(3-5), 278-284.
- Syed, K., Doddapaneni, H., Subramanian, V., Lam, Y.W., & Yadav, J.S. (2010) Genome-to-function characterization of novel fungal P450 monooxygenases oxidizing polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Biochemical and Biophysical Research. Communications, 399: 492–497.
- Szczesna-Skorupa, E., & Kemper, B. (2011). The signal-anchor sequence of CYP2C1 inserts into the membrane as a hairpin structure. Biochemical and biophysical research communications, 415(2), 405-409.
- Telke, A. A., Ghodake, G. S., Kalyani, D. C., Dhanve, R. S., & Govindwar, S. P. (2011). Biochemical characteristics of a textile dye degrading extracellular laccase from a *Bacillus sp*. ADR. Bioresource technology, 102(2), 1752-1756.
- Telke, A., Kalyani, D., Jadhav, J., & Govindwar, S. (2008). Kinetics and Mechanism of Reactive Red 141 Degradation by a Bacterial Isolate *Rhizobium radiobacter* MTCC 8161. Acta Chimica Slovenica, 55(2).
- Ter-Hovhannisyan, V., Lomsadze, A., Chernoff, Y. O., & Borodovsky, M. (2008). Gene prediction in novel fungal genomes using an ab initio algorithm with unsupervised training. Genome research, gr-081612.

- Thuillier, A., Ngadin, A.A., Thion, C., Billard, P., Jacquot, J.P., Gelhaye, E., & Morel, M. (2011) Functional diversification of fungal glutathione transferases from the ure2p class. International Journal of Evolutionary Biology, 2011: 938308.
- Tien, M. (1987). Properties of ligninase from *Phanerochaete chrysosporium* and their possible applications. CRC Critical reviews in microbiology, 15(2), 141-168.
- Tien, M., & Tu, C. P. D. (1987). Cloning and sequencing of a cDNA for a ligninase from *Phanerochaete chrysosporium*. Nature, 326(6112), 520.
- Ulmer, D. C., Leisola, M. S., & Fiechter, A. (1984). Possible induction of the ligninolytic system of *Phanerochaete chrysosporium*. Journal of Biotechnology, 1(1), 13-24.
- Urzúa, U., Kersten, P. J., & Vicuña, R. (1998). Manganese peroxidase-dependent oxidation of glyoxylic and oxalic acids synthesized by *Ceriporiopsis subvermispora* produces extracellular hydrogen peroxide. Applied and Environmental Microbiology, 64(1), 68-73.
- Van der Zee, F. P., & Villaverde, S. (2005). Combined anaerobic–aerobic treatment of azo dyes—a short review of bioreactor studies. Water research, 39(8), 1425-1440.
- Vanden Wymelenberg, A., Gaskell, J., Mozuch, M., Sabat, G., Ralph, J., Skyba, O., *et al*. (2010) Comparative transcriptome and secretome analysis of wood decay fungi *Postia placenta* and *Phanerochaete chrysosporium*. Applied and Environmental Microbiology, 76: 3599–3610.
- Vitor, V. & Corso, C.R., Decolorization of textile dye by *Candida albicans* isolated from industrial effluents, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2008, vol. 35, pp. 1353–1357.
- Vrsanska, M., Voberkova, S., Langer, V., Palovcikova, D., Moulick, A., Adam, V., & Kopel, P. (2016). Induction of laccase, lignin peroxidase and manganese peroxidase activities in white-rot fungi using copper complexes. Molecules, 21(11), 1553.
- Vyas, B. R., & Molitoris, H. P. (1995). Involvement of an extracellular H_2O_2-dependent ligninolytic activity of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in the decolorization of Remazol brilliant blue R. Applied and environmental microbiology, 61(11), 3919-3927.
- Waghmode, T. R., Kurade, M. B., & Govindwar, S. P. (2011). Time dependent degradation of mixture of structurally different azo and non azo dyes by using *Galactomyces geotrichum* MTCC 1360. International biodeterioration & biodegradation, 65(3), 479-486.
- Wang, C. J., Hagemeier, C., Rahman, N., Lowe, E., Noble, M., Coughtrie, M., *et al*. (2007). Molecular cloning, characterisation and ligand-bound structure of an azoreductase from *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of molecular biology, 373(5), 1213-1228.
- Wang, W., & Gao, P. J. (2003). Function and mechanism of a low-molecular-weight peptide produced by *Gloeophyllum trabeum* in biodegradation of cellulose. Journal of Biotechnology, 101(2), 119-130.
- Wang, X., Ullrich, R., Hofrichter, M., & Groves, J. T. (2015). Heme-thiolate ferryl of aromatic peroxygenase is basic and reactive. Proceedings of the National Academy of Sciences, 112(12), 3686-3691.

- Wesenberg, D., Kyriakides, I., & Agathos, S. N. (2003). White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. Biotechnology advances, 22(1-2), 161-187.
- Washburn, M. P., Wolters, D., & Yates III, J. R. (2001). Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. Nature biotechnology, 19(3), 242.
- Watanabe, T., Koller, K., & Messner, K. (1998). Copper-dependent depolymerization of lignin in the presence of fungal metabolite, pyridine. Journal of biotechnology, 62(3), 221-230.
- Weisburger, J. H. (2002). Comments on the history and importance of aromatic and heterocyclic amines in public health. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 506, 9-20.
- Wesenberg, D., Kyriakides, I., & Agathos, S. N. (2003). White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. Biotechnology advances, 22(1-2), 161-187.
- Wijetunga, S., Li, X. F., & Jian, C. (2010). Effect of organic load on decolourization of textile wastewater containing acid dyes in upflow anaerobic sludge blanket reactor. Journal of Hazardous Materials, 177(1-3), 792-798.
- Wilkins, M. R., Pasquali, C., Appel, R. D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J. C., *et al.* (1996). From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and arnino acid analysis. Nature Biotechnology, 14(1), 61.
- Wong, C. K., Liu, X. J., Lee, A. O. K., & Wong, P. K. (2006). Effect of azo dyes on survivorship, oxygen consumption rate, and filtration rate of the freshwater cladoceran *Moina macrocopa*. Human and Ecological Risk Assessment, 12(2), 289-300.
- Wong, Y., & Yu, J. (1999). Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. Water research, 33(16), 3512-3520.
- Wünschmann, J., Krajewski, M., Letzel, T., Huber, E. M., Ehrmann, A., Grill, E., & Lendzian, K. J. (2010). Dissection of glutathione conjugate turnover in yeast. Phytochemistry, 71(1), 54-61.
- Xu, G., & Goodell, B. (2001). Mechanisms of wood degradation by brown-rot fungi: chelator-mediated cellulose degradation and binding of iron by cellulose. Journal of biotechnology, 87(1), 43-57.
- Yamada, Y., Makimura, K., Merhendi, H., Ueda, K., Nishiyama, Y., Yamaguchi, H., & Osumi, M. (2002). Comparison of different methods for extraction of mitochondrial DNA from human pathogenic yeasts. Japanese journal of infectious diseases, 55(4), 122-125.
- Yandell, M., & Ence, D. (2012). A beginner's guide to eukaryotic genome annotation. Nature Reviews Genetics, 13(5), 329.
- Yang, Q., Yang, M., Pritsch, K., Yediler, A., Hagn, A., Schloter, M., Kettrup, A., (2003). Decolorization of synthetic dyes and production of manganese-dependent peroxidase by new fungal isolates. Biotechnology Letters. Lett. 25, 709–713.
- Yang, Q., Yediler, A., Yang, M., & Kettrup, A. (2005). Decolorization of an azo dye, Reactive Black 5 and MnP production by yeast isolate: Debaryomyces polymorphus. Biochemical engineering journal, 24(3), 249-253.

- Yang, Q., Zhang, H., Li, X., Wang, Z., Xu, Y., Ren, S., *et al*. (2013). Extracellular enzyme production and phylogenetic distribution of yeasts in wastewater treatment systems. Bioresource technology, 129, 264-273.
- Yin, Y., Mao, X., Yang, J., Chen, X., Mao, F., & Xu, Y. (2012). dbCAN: a web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. Nucleic acids research, 40(W1), W445-W451.
- Yu, Z. & Wen, X., Screening and identification of yeasts for decolorizing synthetic dyes in industrial wastewater, International Biodeterioration and Biodegradation, 2005, vol. 5, pp. 109–114.
- Yuen C.W.M., Ku S.K.A., Choi P.S.R., Kan C.W., Tsang S.Y. (2005). Determining functional groups of commercially available Ink-Jet printing reactive dyes using infrared spectroscopy. Research Journal of Textile and Apparel, 9(2):26-38.
- Zhang, J., & Schilling, J. S. (2017). Role of carbon source in the shift from oxidative to hydrolytic wood decomposition by Postia placenta. Fungal Genetics and Biology, 106, 1-8.
- Zille, A., Gornacka, B., Rehorek, A., & Cavaco-Paulo, A. (2005). Degradation of azo dyes by *Trametes villosa* laccase over long periods of oxidative conditions. Applied and environmental microbiology, 71(11), 6711-6718.
- Zollinger, H. (2003). Color chemistry: syntheses, properties, and applications of organic dyes and pigments. John Wiley & Sons.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Parte de los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral dieron lugar a las siguientes publicaciones:

Trabajos Publicados:

- **"Genome-wide overview of *T. akiyoshidainum* HP-2023, a dye decolorizing yeast".** Bulacio Gil1, N; Pajot, H.; Rosales Soro, M; Castellanos de Figueroa, LIC.; Kurth, D. **3 Biotech (2018). DOI: 10.1007/s13205-018-1465-y**

- "**Fungal decomposers of leaf litter from an invaded and native mountain forest of NW Argentina**". Romina Daiana Fernandez, Natalia Bulacio, Analía Alvarez, Hipólito Pajot, Roxana Aragón. **Antonie van Leeuwenhoek (2017)** 110:1207–1218. DOI 10.1007/s10482-017-0893-8 **http://dx.doi.org/10.1007/s10482-017-0893-8**

Presentaciones a Congresos:

- **"Efecto de Inductores Enzimáticos en el Proceso de Decoloración de Negro Reactivo 5 por T. akiyoshidainum".** Alvaro M. Navarro, Natalia M. Bulacio Gil, María M. Rosales Soro, Lucía I. Castellanos, Hipólito F. Pajot.
  Trabajo Presentado bajo la modalidad de Póster en las XIX Jornadas de Jóvenes Investigadores Augusto Palavecino. Tucumán, Argentina. 2018.
  Primer Premio del área Biotecnología.

- **"Metabolic pathways involved in aromatic azo dyes degradation by *T. akiyoshidainum".*** Natalia M. Bulacio Gil, María M. Rosales Soro, Daniel Kurth, Carlos G. Nieto Peñalver, Lucía I. Castellanos de Figueroa and Hipólito F. Pajot.
  Trabajo presentado bajo la modalidad de Comunicación Oral en el Congreso Internacional "INTERNATIONAL SPECIALIZED SYMPOSIUM ON YEASTS". Bariloche, Argentina. 2018

- **"Expresión diferencial de proteínas asociadas a estrés oxidativo durante la decoloración de Negro Reactivo 5 por *Trichosporon akiyoshidainum*".** Bulacio Gil N.M., Kurt D., Pajot H. F., Catellanos de Figueroa L.I., Powlowski J.
  Trabajo presentado bajo la modalidad de Póster en el XLVI Congreso Argentino de Genética, Catamarca, Argentina. 2017.

- **"Validation of culture media for decolorization of effluents".** Bulacio Gil N., Pajot H., Figueroa L.
  Trabajo presentado bajo la modalidad de Comunicación Oral en el "II Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología Ambiental, II Congreso Nacional de la Sociedad Argentina de Ciencia y Tecnología Ambiental". Diciembre 2015. CABA, Argentina.

- **"Evaluación del potencial decolorante de levaduras aisladas de ambientes naturales para la biorremediación de efluentes coloreados".** Rosales Soro M., Bulacio Gil N., Pajot H., Figueroa L.
  Trabajo presentado bajo la modalidad de Póster en REDBIO 2015. Septiembre 2015. San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina.

- **"Biodegradación de colorantes con levaduras aisladas de muestras de efluentes y suelos contaminados".** Bulacio Gil N., Rosales Soro M., Martorell M., Pajot H., Figueroa L.
  Trabajo presentado bajo la modalidad de Póster en las "I Jornadas en investigación, docencia y extensión en Ciencias Naturales Dr. José Busnelli". Noviembre de 2014, San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina.

- **"Aislamiento y caracterización de levaduras con potencial actividad ligninolítica a partir de muestras de efluentes textiles industriales".** Bulacio Gil N., Rosales Soro M., Martorell M., Pajot H., Figueroa L.
  Trabajo presentado bajo la modalidad de e-Póster en las "XXIII Jornadas Argentinas de Micología. 1° Reunión de la Asociación Micológica Carlos Spegazzini". 24 al 27 de agosto de 2014, Buenos Aires, Argentina.