



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO
División Académica de Ciencias Biológicas



**“BIOPROSPECCIÓN ENZIMÁTICA DE HONGOS COLECTADOS
EN LA REGIÓN SIERRA DE TABASCO, MÉXICO”**

Trabajo recepcional, en la modalidad de:

Tesis Doctorado

Para obtener el grado en:

Doctorado en Ciencias en Ecología y
Manejo de Sistemas Tropicales

Presenta:

M. en C. Karla Alicia del Sagrario Corazón Peraza Jiménez

Directora:

Dra. Susana del Carmen de la Rosa García

Villahermosa, Tabasco, México

Mayo, 2022



**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



**DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCIÓN**

Villahermosa, Tab., a 02 de Mayo de 2022

ASUNTO: Autorización de Modalidad de Titulación

**C. LIC. MARIBEL VALENCIA THOMPSON
JEFE DEL DEPTO. DE CERTIFICACIÓN Y TITULACION
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES
P R E S E N T E**

Por este conducto y de acuerdo a la solicitud correspondiente por parte del interesado, informo a usted, que en base al reglamento de titulación vigente en esta Universidad, ésta Dirección a mi cargo, autoriza a la **C. KARLA ALICIA DEL SAGRARIO CORAZÓN PERAZA JIMÉNEZ** egresada del Doctorado en **CIENCIAS EN ECOLOGÍA Y MANEJO DE SISTEMAS TROPICALES** de la División Académica de **CIENCIAS BIOLÓGICAS** la opción de titularse bajo la modalidad de Tesis de Doctorado denominado: **"BIOPROSPECCIÓN ENZIMÁTICA DE HONGOS COLECTADOS EN LA REGIÓN SIERRA DE TABASCO MÉXICO"**.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para saludarle afectuosamente.

A T E N T A M E N T E


**DR. ARTURO GARRIDO MORA
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN ACADÉMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**U.J.A.T.
DIVISIÓN ACADÉMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



C.c.p.- Expediente Alumno de la División Académica
C.c.p.- Interesado





UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



PRECURSOR DE LA REVOLUCIÓN MEXICANA

DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCIÓN

MAYO 02 DE 2022

**C. KARLA ALICIA DEL SAGRARIO CORAZÓN PERAZA
JIMÉNEZ
PAS. DEL DOCTORADO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA Y
MANEJO DE SISTEMAS TROPICALES
P R E S E N T E**

En virtud de haber cumplido con lo establecido en los Arts. 80 al 85 del Cap. III del Reglamento de titulación de esta Universidad, tengo a bien comunicarle que se le autoriza la impresión de su Trabajo Recepcional, en la Modalidad de Tesis de Doctorado en Ciencias en Ecología y Manejo de Sistemas Tropicales titulado: **"BIOPROSPECCIÓN ENZIMÁTICA DE HONGOS COLECTADOS EN LA REGIÓN SIERRA DE TABASCO MÉXICO"**, asesorado por la Dra. Susana del Carmen de la Rosa García, sobre el cual sustentará su Examen de Grado, cuyo jurado está integrado por el Dr. Carlos Alfonso Álvarez González, Dra. Erika Escalante Espinosa, Dra. Susana del Carmen de la Rosa García, Dra. Nelly del Carmen Jiménez Pérez, Dr. Sergio Alberto Gómez Cornelio, Dr. Carlos Manuel Burelo Ramos y Dr. Rodolfo Gómez Cruz.

Por lo cual puede proceder a concluir con los trámites finales para fijar la fecha de examen.

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE

**DR. ARTURO GARRIDO MORA
DIRECTOR**

C.c.p.- Expediente del Alumno.
C.c.p.- Archivo

U.J.A.T.
DIVISIÓN ACADÉMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DIRECCIÓN



CARTA AUTORIZACIÓN

El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente el Trabajo Recepcional en la modalidad de Tesis de doctorado denominado: **"BIOPROSPECCIÓN ENZIMÁTICA DE HONGOS COLECTADOS EN LA REGIÓN SIERRA DE TABASCO MÉXICO"**, de la cual soy autor y titular de los Derechos de Autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco el Trabajo Recepcional antes mencionada, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa más no limitativa para subirla a la Red Abierta de Bibliotecas Digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la Universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en este documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco a los 16 días del mes de Mayo de dos mil veintidós.

AUTORIZO

KARLA ALICIA DEL SAGRARIO CORAZÓN PERAZA JIMÉNEZ



UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



División
Académica
de Ciencias
Biológicas

Jefatura de Posgrado



2022 Ricardo
Flores
Magón
PRECURSOR DE LA REVOLUCIÓN MEXICANA

Villahermosa, Tabasco a 6 de abril de 2022.

M. EN C. KARLA ALICIA DEL SAGRARIO CORAZÓN PERAZA JIMÉNEZ

EST. DEL DOCTORADO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA

Y MANEJO DE SISTEMAS TROPICALES

PRESENTE

En cumplimiento de los lineamientos de la Universidad, y por instrucciones de la Dirección de Posgrado, se implementó la revisión de los documentos recepcionales (tesis), a través de la plataforma Turnitin iThenticate para evitar el plagio e incrementar la calidad en los procesos académicos y de investigación en esta División Académica. Esta revisión se realizó en correspondencia con el Código de Ética de la Universidad, el Reglamento General de Estudios de Posgrado, el Código Institucional de Ética para la Investigación y con los requerimientos para los posgrados en el PNPC-CONACyT.

Por este conducto, hago de su conocimiento las observaciones y el reporte de originalidad de su documento de tesis. Con el objetivo de fortalecer y enriquecer el programa de posgrado, la Coordinadora Académica del DEMST, realizó la revisión del documento en la plataforma iThenticate, obteniendo el reporte de originalidad, el índice de similitud y emitió las siguientes sugerencias y recomendaciones para dar seguimiento en el documento de tesis del proyecto de investigación: ***"Bioprospección Enzimática de Hongos Colectados en la región sierra de Tabasco México"***.

OBSERVACIONES:

1. Existe un índice de similitud del 10% de coincidencias, considerado bajo. Lo que demuestra el nivel de originalidad del documento y la investigación.
2. El índice de similitud se integra de porcentajes de 1 y <1% que corresponden con las fuentes primarias de citación de internet, específicamente, Springer link,

KM. 0.5 CARR. VILLAHERMOSA-CÁRDENAS ENTRONQUE A BOSQUES DE SALOYA

Tel. (993) 358-1500 Ext. 6407. Correo e: posgrado.dacbiol@ujat.mx





UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



**División
Académica
de Ciencias
Biológicas**

Jefatura de Posgrado



**2022 Flores
Magón**
PRECURSOR DE LA REVOLUCIÓN MEXICANA

Repositorio Institucional de la Universidad Veracruzana, Open Global Trusted, Repositorio del Centro de Investigación de Estudios Avanzados del IPN, entre otros más.

3. Se adjunta, el reporte de revisión de la tesis a través de la herramienta Turnitin iThenticate.
4. Finalmente, se le solicita a la M. en C. Peraza Jiménez, integrar en la versión final de tesis, este oficio e informe de originalidad, realizado por el Turnitin iThenticate

Sin otro particular al cual referirme, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"

DR. ALLAN KEITH CRUZ RAMÍREZ
JEFATURA DE POSGRADO

UJAT



**DIVISION ACADEMICA
CIENCIAS BIOLOGICAS
JEFATURA DE POSGRADO**

C.C.P. Dra. Susana del Carmen de la Rosa García. Director de Tesis.

Archivo

Bioprospección Enzimática de Hongos Colectados en la región sierra de Tabasco México

INFORME DE ORIGINALIDAD

10%

ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	link.springer.com Internet	103 palabras — 1%
2	cdigital.uv.mx Internet	93 palabras — 1%
3	doaj.org Internet	62 palabras — < 1%
4	afirse.ie.ul.pt Internet	56 palabras — < 1%
5	repositorio.cinvestav.mx Internet	50 palabras — < 1%
6	annalsmicrobiology.biomedcentral.com Internet	48 palabras — < 1%
7	Chavarría-Aguilar, Luis M., Ricardo A. García-Herrera, Rosario Salazar-Cuytun, Alfonso J. Chay-Canul, Fernando Casanova-Lugo, Angel T. Piñeiro-Vázquez, and Armando J. Aguilar-Caballero. "Relationship between body fat depots and body mass index in Pelibuey ewes", Small Ruminant Research, 2016. Crossref	46 palabras — < 1%

Dedicatoria

En memoria de mi Madre

Paulina Jiménez Manrique (†)

Por todos tus consejos, enseñanzas y amor incondicional, Gracias por hacerme una mujer valiente y guerrera igual que tú.

CONTENIDO

TABLAS Y FIGURAS	III
1.1 INTRODUCCIÓN	2
1.3 Antecedentes.....	5
1.3.4 Enzimas de estudio.....	8
1.3.4.1. Lacasas.....	8
1.3.4.2 Amilasas.....	10
1.3.4.3 Xilanasas.....	10
1.3.4.4 Proteasas	12
1.3.4.5 Lipasas.....	13
1.4 Interacciones fúngicas (co-cultivos)	15
1.5 Trabajos previos con enzimas en ambientes tropicales.....	16
1.6 Objetivos	17
1.6.1 General	17
1.6.2 Objetivos específicos	17
1.7 Hipótesis	18
1.8 Referencias	19
CAPÍTULO II	27
2. Bioprospección enzimática de Hongos aislados de un bosque tropical de México.....	27
<i>Article</i>	27
<i>Abstract</i>	28
2.1 Introduction	29
2.2 Materials and Methods.....	30
2.2.1. Biological sampling.	30
2.2.2. Isolation of the microorganisms.....	30
2.2.3. Morphological identification.	30
2.2.4. Qualitative assay in solid medium.	31
2.2.5. Basal medium for enzyme production	31

2.2.6. Enzyme production by submerged fermentation	32
2.2.6.1. Quantitative assay Lacasse activity	32
2.2.6.2. Quantitative assay Amylase activity	32
2.2.6.3. Quantitative assay Xylanase activity	33
2.2.6.4. Quantitative assay Protease activity	33
2.2.6.5. Quantitative assay Lipase activity	33
2.2.7. Statistical analysis.....	34
2.3 Results	34
2.3.1 Qualitative plate test.....	37
2.3.2 Enzymatic activity quantification.....	39
2.4. Discussion.....	42
2.6 References.....	46
CAPÍTULO III.....	54
Co-cultivo de hongos lignocelulolíticos de ambientes tropicales como estrategia para potencializar la producción enzimática.	54
Resumen	54
Introducción.....	56
Materiales y métodos.....	57
Cepas fúngicas	57
Co-cultivo en medio sólido	57
Co-cultivos en medio líquido.	58
Cuantificación de actividad lacasa	59
Cuantificación de actividad amilasa y xilanasa	59
Cuantificación de actividad proteasa.....	60
Análisis estadísticos.....	60
Resultados	61
Interacción en placa en medio sólido.....	61
Interacciones en medio líquido y evaluación enzimática.....	61
Discusión	64
Conclusiones.....	67
Referencias	¡Error! Marcador no definido.
CAPÍTULO IV.....	74
Conclusiones Generales	74

ANEXOS	77
--------------	----

Tablas y figuras

Tabla 1.1 Ejemplos de algunos hongos productores de enzimas y sus aplicaciones	7
Table 2.1. Enzymatic capability on agar plate assay of strains positive fungal isolates from Sierra of Tabasco, México.....	36
Figure 2.1. Number of fungal strains isolated from different sources and their relationship with enzyme production.	37
Figure 2.2 Qualitative enzymatic plate assay on solid medium with visible enzymatic activity (A, B, C, D, E, F) and without activity (G, H, I, J, K).....	39
Figure 2.3 Enzymatic activity quantification of the ten selected fungi expressed in U/mg.....	41
Tabla 1 Matriz de combinaciones fúngicas en co-cultivos	58
Figura. 1 Interacciones duales.....	61
Figura. 2 Resultado de la cuantificación enzimática de cepas en cultivos duales .	63

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción

Los hongos son organismos eucariontes distribuidos en todo el globo terrestre, abarcando desde zonas desérticas hasta las gélidas. Se pueden encontrar colonizando sustratos orgánicos e inertes en descomposición (saprobios) como hojas, ramas, suelo, troncos, entre otros. Su papel es esencial para el funcionamiento, estructura y equilibrio de los ecosistemas; por lo tanto, son responsables de la nutrición mineral y de la supervivencia de muchas plantas; además, forman parte de la dieta de otros organismos como colémbolos, ácaros y lombrices (Dighton, 2003). El impacto de los hongos en el ambiente se debe a su papel central de degradadores de la materia orgánica y las asociaciones parasitarias o simbióticas que establecen con muchos organismos. Los hongos están muy bien representados en todos los ambientes, en especial en los trópicos donde podemos encontrar una gran variedad de especies y precisamente son estos ecosistemas los menos conocidos en cuanto a su potencial biotecnológico y los más afectados por el hombre (Cappello y Hernández-Trejo, 1990).

En este sentido, los hongos tropicales han sido objeto de estudio ya que poseen una amplia diversidad, resiliencia y nuevos metabolitos en comparación a sus homólogos de ambientes templados (Mtui, 2012). Los hongos secretan varias enzimas que les permiten degradar los sustratos orgánicos que colonizan, a éstas se les conoce como enzimas extracelulares, las enzimas extracelulares están ampliamente distribuidas entre plantas, hongos, insectos y algunas especies bacterianas las cuales se liberan al medio para captar su alimento, defender su sustrato y en respuesta a la presencia de otro hongo (Score *et al.*, 1997). Actualmente, las enzimas fúngicas extracelulares como las lacasas, amilasas, proteasas, lipasas, etc., están siendo estudiadas por su papel biotecnológico y sus múltiples aplicaciones industriales empleadas en agricultura, en la industria de la pulpa y papel, manejo de residuos, mejoramiento en la calidad de los detergentes, procesamiento de alimento, biocombustibles, fabricación de vinos y cervezas, procesamiento del cuero, farmacéutica, textiles, el bio-blanqueo y la biorremediación de aguas (Ahmed *et al.*, 2013; Meyer *et al.*, 2020).

Los hongos macroscópicos que pertenecen al género *Trametes* son los más estudiados en cuanto a su producción de enzimas siendo *T. versicolor* el organismo modelo. Otras especies fúngicas productoras de enzimas incluyen: *Bjerkandera adusta*, *Pycnoporus sanguineus*, *P. coccineus*, *Pleurotus ostreatus*, *P. dejamour*, *Ganoderma* sp, entre otros (Yang *et al.*, 2013). En cuanto a hongos microscópicos, las especies más estudiadas destacan *Aspergillus*, *Acremonium*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Verticillium*, *Fusarium*, *Emericella*, por mencionar algunos. (Krull *et al.*, 2013). En las últimas décadas se ha demostrado el potencial de los hongos para transformar compuestos contaminantes considerados peligrosos a moléculas más simples e inocuas, tal es el caso de xenobióticos, bifenilos policlorados, hidrocarburos policíclicos aromáticos, plaguicidas clorados, plaguicidas organofosforados, son todos efectivamente mineralizados a CO₂ por varias especies de hongos (Dávila y Vázquez- Dunhalt, 2006).

El Estado de Tabasco alberga una gran riqueza de especies fúngicas, especialmente en la Sierra del Estado donde el clima y vegetación predominante favorece el crecimiento de varias especies, por este motivo es necesario estudiar y conocer los tipos de hongos, sus enzimas y el tipo de interacciones que existen en esos ambientes del trópico, donde se tiene escasa o nula información al respecto. En la sierra del estado de Tabasco, se han elaborado trabajos en los cuales se reportan recolectas biológicas e inventarios de hongos macroscópicos (Hernández *et al.*, 2011), sin embargo, la mayoría de los estudios están enfocados en aspectos ecológicos de educación ambiental para la conservación de las áreas de la selva que aún perduran como lo son Poaná, Tapijulapa y el Madrigal.

El presente trabajo tuvo como propósito la bioprospección enzimática de 150 taxones de un estimado de 1,000 hongos aislados de tres sustratos (hoja, suelo y madera) de la sierra tropical del Estado de Tabasco, para conocer el potencial enzimático de los hongos de esta zona; la preselección estuvo basado en características como la morfología del micelio y tinción del medio en cepas raras, frecuentes y abundantes. Posteriormente se llevó a cabo la clasificación taxonómica y el screening enzimático en medio sólido para la selección de cepas activas; los

mejores hongos se llevaron a cuantificación enzimática en medio líquido y por último se seleccionó a las cinco mejores cepas y se pusieron en interacción dual para conocer el tipo de comportamiento que experimentaron, ya sea potenciando la producción de enzimas o tener un efecto antagonista entre ellos.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

1.3 Antecedentes

Desde tiempos remotos los hongos han jugado un papel importante en la vida del hombre incluyendo algunas especies en su alimentación, fermentación y en medicina tradicional (Mtui, 2012); a partir de los descubrimientos realizados por Fleming en 1928 con la enzima antimicrobiana lisozima y la penicilina (*Penicillium notatum*) los hongos adquirieron mayor interés económico y científico. Sin duda alguna, uno de los retos de la humanidad a principios de siglo XXI, es el empleo de la biotecnología para convertir los organismos vivos en un recurso rentable que ayuden de alguna manera al control, prevención y remediación de contaminantes ambientales (Dávila y Vázquez-Dunhalt, 2006). Una de las propiedades que se les atribuye a los organismos fúngicos, es su capacidad de secretar enzimas extracelulares, las cuales son liberadas para degradar los sustratos orgánicos que colonizan, y con ello captar su alimento, defender su sustrato y en respuesta a la presencia de otro hongo (Score *et al.*, 1997). Muchos factores favorecen a las enzimas de origen microbiano en comparación con aquellas derivadas de plantas o animales, incluyendo mayores rendimientos, facilidad de manipulación, mayor actividad catalítica, producción rápida en medios económicos; además de ser biodegradables y ser activos en condiciones de pH y temperatura adecuada (Lange *et al.*, 2020).

La aplicación de las enzimas extracelulares de origen microbiano inició cerca de 1980, primero en alimento para animales y después en alimentos para consumo humano (Bhat, 2000). También se emplean para favorecer la extracción y filtración de jugos de frutas o verduras, filtración de mostos, extracción de aceites comestibles, etc. (Raveendran *et al.*, 2018). La producción enzimática fúngica ha sido ampliamente explotada por sus múltiples aplicaciones de importancia industrial como son: en el área textil, industrialización de los detergentes, papelera, almidón, vinos, alimento animal, en la producción de compuestos bioquímicos, químicos, pigmentos y biorremediación, es debido a esto que ha ido creciendo en el campo de la biotecnología (Sukumaran *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2019; Kalra *et al.*, 2020).

Los hongos en particular son una fuente inagotable de enzimas con una amplia variedad en el mundo del mercado debido a los avances de la ingeniería de proteínas y en la tecnología de genes recombinantes lo cual ha revolucionado la producción y comercialización de las enzimas (Polizeli, 2014).

El mercado de la industria de las enzimas tiene previsto un alcance de \$ 8,636 mil millones de dólares en el 2019 y se proyecta que alcance \$ 14,507 millones en el 2027 (Global industrial Enzyme Market); dividida en tres secciones: la primera son las enzimas técnicas las cuales acaparan el 65% de ventas, aproximadamente US \$ 1.5 mil millones e incluyen a las proteasas, amilasas y celulasas, empleándose en la industria del detergente, el almidón, el textil, el cuero, la pulpa y papel y de cuidado personal. El segundo rubro es para las enzimas alimentarias (Lipasas y Pectinasas), las cuales abarcan industrias de lácteos, vino, cerveza, aceites y pastelería con un porcentaje de ventas del 25%. El último rubro es para enzimas para alimento animal que comprenden enzimas como fitasas, xilanasas y β - glucanasas con un porcentaje de ventas del 10% (Cherry and Fidantsef, 2003).

Además, el mercado de la producción de enzimas abarca principalmente 20 compañías de Europa, Japón y Estados Unidos, entre estas destacan Novozymes, DuPont, Koninklijke, BASF, Advanced Enzyme Technologies, AB Enzymes, entre otras (Polizeli, 2014; Chambergo, 2016).

Tabla 1.1 Ejemplos de algunos hongos productores de enzimas y sus aplicaciones

Hongo	Enzima	Aplicación	País	Referencia
<i>Trichocladium canadense</i>	Lacasas, MnP	Biodegradación de aguas residuales	Brasil	Silva <i>et al.</i> , 2009
<i>Ganoderma lucidum</i>	Lacasas, MnP	Biorremediación y alimento animal	Tailandia	Punnapayak <i>et al.</i> , 2009
<i>Pochonia chlamydosporia</i>	Lipasas, Esterasas y Proteasas	Biorremediación	Reino Unido	Esteves <i>et al.</i> , 2009
<i>Paecilomyces farinosus</i>	Lacasas	Detoxificación de fenoles	España	Sampedro <i>et al.</i> , 2009
<i>Penicillium echinulatum</i>	Celulasas y Xilanasas	Mejoramiento de alimento animal	Brasil	Camassola and Dillon, 2009
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Lacasas	Biorremediación	México	Pérez- Armendáriz, 2010
<i>Chaetomium sp</i>	Glucosidasas, Endoglucanasa	Mejoramiento de alimento animal	India	Ravindran <i>et al.</i> , 2010
<i>Nigrospora sp</i>	Quitinasas	Preservación de alimento	Canadá	El Hadrami <i>et al.</i> , 2010
<i>Melanocarpus albomyces</i>	Xilanasas	sacarificación	India	Biswas <i>et al.</i> , 2010
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Lacasas, LiP	Biorremediación	Reino Unido	Magan <i>et al.</i> , 2010
<i>Lentinus crinitus</i>	Lacasas, LiP	Decolorización y mejoramiento de alimento animal	Brasil	Niebisch <i>et al.</i> , 2010
<i>Trematosphaeria mangrovei</i>	Lacasas, MnP	Biorremediación	Egipto	Mabrouk <i>et al.</i> , 2010
<i>Pycnoporus coccineus</i>	Lacasas	Biopulpa	Malasia	Singh <i>et al.</i> , 2010
<i>Japonicus, A. terreus</i>	Xilanasas	Alimento animal	Malasia	Jahromi <i>et al.</i> , 2011
<i>Emericella varicolor</i>	Celulasas y Glucosidasas	Sacarificación	Brasil	Herkulano <i>et al.</i> , 2011
<i>Coriolus versicolor</i>	Manganeso peroxidasa (MnP)	Biopulpa	Malasia	Liew <i>et al.</i> , 2011
<i>Lentinus squarrosulus</i>	MnP, Oxidasas	biorremediación	India	Tripathi <i>et al.</i> , 2011
<i>Aspergillus niger</i>	Glucosidasas, Xilanasas	Tratamiento de aguas residuales.	India	Gautam <i>et al.</i> , 2011
<i>Macrocybe titans</i>	Beta-g alactosidasas	Mejoramiento de alimento animal	Brasil	Zilly <i>et al.</i> , 2011
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Xilanasas, Celulasa	Mejoramiento de alimento animal	India	Sharma and Aurora, 2011
<i>Pleurotus djamor</i>	Lacasas	biorremediación	Cuba	Manzano-Leon <i>et al.</i> , 2011
<i>Scytalidium thermophilum</i>	Catalasas	Estabilizadores industriales	México	Sánchez <i>et al.</i> , 2011
<i>Trichoderma reesei</i>	Celulasas, Xilanasas	biocombustibles	México	Quiroz-castañeda, 2011
<i>Geotrichum sp</i>	Lipasas	Biorremediación	Colombia	Aceves <i>et al.</i> , 2012
<i>Mortierella alpina</i>	Lipasas	Biorremediación	Hungría	Kotogán <i>et al.</i> , 2014
<i>Trametes gibbosa</i>	Lacasas	Biopulpa	India	Sudarson <i>et al.</i> , 2014
<i>Trametes hirsuta</i>	Lipasas	Biodiesel	Brasil	Villela <i>et al.</i> , 2015
<i>Trametes sp</i>	Celulasas	Industria de la pulpa y papel	México	Ayala-Mendivil <i>et al.</i> , 2016
<i>Trametes singulata</i>	Proteasas	Industria del detergente	Túnez	Benmrad <i>et al.</i> , 2016
<i>Trametes sp</i>	MnP, Lacasas	Biorreme(diación	Argentina	Fonseca <i>et al.</i> , 2016
<i>Penicillium</i>	Proteasa, Endoglucanasa	biocombustibles	Corea	Park <i>et al.</i> , 2016

Las enzimas degradadoras de lignina, son capaces de degradar compuestos xenobióticos, y entre las especies fúngicas probadas hasta ahora, sólo unos pocas son útiles para el suelo contaminado, la mayoría de los experimentos de biodegradación *in situ* han utilizado *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, o *Pleurotus ostreatus* (Bogan *et al.*,1999; Tuomela *et al.*,1999). Estas especies se caracterizan por su capacidad para colonizar el suelo que contiene un microbiota nativo (Paszczyński y Crawford, 2000; Baldrian *et al.*, 2000). También se ha reportado que el hongo de la madera *Trichoderma* sp. mejora la degradación de xenobióticos cuando se colocan en co-cultivo con los hongos del suelo (Freitag, C.M. y Morrell,1992; Green y Highley, 1997). Entre los hongos que se emplean en la industria por tener buenos rendimientos en condiciones de co-cultivos podemos mencionar a *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae* que son de los más importantes para aplicaciones biotecnológicas por su fácil manipulación y rápido crecimiento en laboratorio (Coutinho *et al.*, 2009).

1.3.4 Enzimas de estudio.

La selección de las enzimas de estudio se basó principalmente en las múltiples aplicaciones que estos tienen tanto en la industria, biotecnología, biorremediación y alimentos; además que son enzimas comúnmente encontradas en microorganismos fúngicos de ambientes tanto tropicales como templados.

1.3.4.1. Lacasas

Las lacasas (E.C. 1.10.3.2: p-difenil- dioxígeno oxidoreductasas) son una clase de enzimas oxidativas que pertenecen a la familia conocida como multicobre azul, que se caracterizan por tener dos dominios altamente conservados unidos a cuatro moléculas de cobre (un dominio monocobre y un dominio tricobre). La disponibilidad del cobre en el medio es indispensable en la actividad de las lacasas (Baldrian y Gabriel, 2002). Yoshida fue la primera persona en describir a las lacasas en 1883 de los exudados del árbol *Toxicodendron vernicifluum* llamado comúnmente árbol de la laca, mientras que Bertrand y Laborde (1896) demostraron que las lacasas provenían de enzimas fúngicas. Las lacasas son capaces de hidrolizar compuestos fenólicos como también reducir el oxígeno molecular del agua (Thurston, 1994). Las

lacasas están ampliamente distribuidas en plantas y hongos superiores, así como también en bacterias e insectos; sin embargo, la mayoría de las lacasas están descritas que provienen de hongos como Ascomicetos, Deuteromicetos y Basidiomicetos. La primera lacasa caracterizada a partir de un Ascomiceto fue la *Monocilium indicum* con actividad peroxidativa (Thakker *et al.*, 1992).

Dentro de las propiedades moleculares de las lacasas, estas presentan un monómero glicosilado o una proteína homodimérica generalmente con pocos compuestos sacáridos (10-25%) como hexoaminas, glucosa, manosa, galactosa, fucosa y arabinosa con un peso molecular de 60-100 kDa, una absorbancia de 330 nm, un rango de punto isoelectrico (pI) de 3 a 7 y un pH de 3.6 a 5.2. La glicosilación en lacasas es la responsable de la secreción, susceptibilidad proteolítica, actividad, retención de cobre y estabilidad térmica (Xu, 1999). Según el modo de acción, las lacasas solamente atacan subunidades fenólicas de lignina dando lugar a la oxidación del C α , ruptura de C α -C β y fragmentación del alquilo de arilo. Se considera que la catálisis de las lacasas involucra: 1) Reducción del cobre tipo I por reducción del sustrato. 2) Transferencia interna del electrón del tipo I al cobre tipo 2 y tipo 3 y 3) Reducción del oxígeno a agua al sitio cobre tipo 2 y tipo 3 (Xu, 1999). En la industria de la pulpa y papel, las enzimas lacasas son empleadas para el blanqueo, separación y degradación de la lignina evitando el uso convencional de oxidantes químicos basados en cloro (Viswanath *et al.*, 2014). En biorremediación se usan para el tratamiento de efluentes industriales contaminados con xenobióticos, tales como compuestos fenólicos y tintes textiles (Peralta-Zamora *et al.*, 2003). En la industria farmacéutica y cosmética se emplean las lacasas por su actividad antimicrobiana, desintoxicantes o agentes activos de cuidado personal, se emplean también en síntesis orgánica y en la industria de alimento, mejorando su calidad y rendimiento, disminuyendo costos de producción (Brijwani *et al.*, 2010; Osma *et al.*, 2010).

1.3.4.2 Amilasas

Las amilasas son enzimas hidrolíticas que catalizan la hidrólisis de los enlaces α -1,4 glucosídicos de alto peso molecular, tales como el almidón y el glucógeno liberando productos de bajo peso como glucosa, maltosa y maltotriosa, es decir, separa los enlaces glucosídicos, produciendo una reducción en el grado de polimerización del sustrato (Gupta *et al.*, 2003; Polizeli, 2014). De acuerdo con su modelo de acción las amilasas pueden clasificarse en dos categorías: endoamilasas y exoamilasas. Las endoamilasas hidrolizan los enlaces glucosídicos al azar dentro de la molécula de almidón liberando oligosacáridos y las exoamilasas hidrolizan sucesivamente los enlaces glucosídicos desde el extremo no reductor de la molécula de almidón liberando glucosa o maltosa (Guzmán-Maldonado y Paredes-López, 1995). En el grupo de las endoamilasas encontramos a la α -amilasa (E.C. 3.2.1.11, 4- α -glucano glucanohidrolasa) que son endoenzimas que hidrolizan los enlaces glucosídicos α -1,4 desde de la amilosa y amilopectina liberando oligosacáridos con diferentes longitudes de cadena. La especificidad de las α -amilasas para los enlaces glucosídicos α -1,4 no son absolutos, algunas α -amilasas también pueden degradar enlaces α -1,6, sin embargo, la velocidad de reacción es menor que los enlaces α -1,4. En las exoenzimas encontramos a las β -amilasas (E.C. 3.2.1.2 1,4 α -D-glucano maltohidrolasa). Son exoenzimas que hidrolizan el penúltimo enlace α -1,4 del extremo no reductor de la molécula de almidón, liberando unidades de β -maltosa. Entre otras exoenzimas podemos mencionar a las glucoamilasas, α -D glucosidasas, exo-(1,4)- α -D-glucanasas, pululanasa, isopululanasa, isoamilasas, ciclomaltodextrinas D-glucotransferasa (Polizeli, 2014).

1.3.4.3 Xilanasas

Las endo-1,4- β xilanasas (E.C. 3.2.1.8) son enzimas hidrolíticas que catalizan la degradación de los xilanos, rompiendo al azar los enlaces glicosídicos β -1,4 de las cadenas de xilosa; es decir separa los enlaces glucosídicos, produciendo una reducción en el grado de polimerización del sustrato, y los enlaces seleccionados para la hidrólisis dependen de la naturaleza de la molécula del sustrato, de acuerdo

a la longitud de la cadena, el grado de ramificación y la presencia de sustituyentes (Polizeli, 2014). Los productos principales de la hidrólisis en la reacción son oligómeros de β -D xilopiranosilo o moléculas pequeñas como mono, di y tri-sacáridos β -D xilanopiranosil (Reilly, 1981; Puls y Poutanen, 1989; Bhardwaj *et al.*, 2019). Entre sus características generales las xilanasas tienen aproximadamente un peso molecular entre 60 y 360 kDa, presentan un amplio rango de pH; sin embargo, el óptimo están entre 4.0 y 5.0. La temperatura óptima se encuentra alrededor de los 60 °C (Polizeli, 2014). Estas enzimas son producidas principalmente por microorganismos y participan en la descomposición de las paredes celulares vegetales. Entre las fuentes microbianas se ha visto que los hongos son los que segregan niveles de enzimas más altos que los encontrados en levaduras o bacterias (Li *et al.*, 2022).

Por otra parte, se ha visto que la termoestabilidad que presentan estas enzimas es altamente variable y depende de cada organismo. Un buen ejemplo de una enzima estable es la de *Aspergillus phoenicis*, que conservó el 100% de su actividad después de 4 h a 60 °C x 21 días a temperatura ambiente (Rizzatti *et al.*, 2001). Por otra parte, se ha notado que muchos microorganismos termófilos y extremófilos producen enzimas de mayor estabilidad (Haltrich *et al.*, 1996). Entre los hongos termofílicos se incluyen *Chaetomium thermophile*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Humicola grisea*, *Melanocarpus albomyces*, *Paecylomyces variotii*, *Talaromyces byssochlamydoides*, *Talaromyces emersonii*, *Thermomyces lanuginosus* y *Thermoascus aurantiacus* (Ahmed *et al.*, 2005; Ahmed *et al.*, 2012). Las xilanasas de estos hongos poseen temperaturas óptimas de entre 60 °C y 80 °C. Estas enzimas suelen ser glicoproteínas y la mayoría muestran mayor actividad a un pH ácido 4.5-6.5 (Hakulinen *et al.*, 2003).

Las xilanasas se comenzaron a usar en los años 80's con la preparación de alimento para animal y más tarde en la industria alimentaria, textil y papelera. El uso de enzimas en la producción de alimento animal es un sector importante de la agroindustria, con una producción mundial anual superior a 600 millones de

toneladas y una facturación de más de 50 mil millones de dólares (Twomey *et al.*, 2003). Entre los hongos empleados en la industria para obtener xilanasas se encuentran principalmente *Aspergillus niger*, *Trichoderma* sp. y *Humicola insolens* (Ahmed *et al.*, 2005).

Las xilanasas tienen aplicaciones potenciales en las industrias de los alimentos, procesos textiles, sacarificación enzimática de materiales lignocelulósicos y tratamiento de aguas (Kulkarni *et al.*, 1999). Otras de las aplicaciones son en la elaboración de la cerveza para aumentar la filtrabilidad del mosto. Sin embargo, la aplicación más amplia para las xilanasas es en la industria de la pulpa y papel, donde las regulaciones ambientales han puesto una restricción al uso del cloro en el proceso de bio-blanqueo, ya que los subproductos formados durante el procesamiento químico son tóxicos, mutagénicos y causan alteraciones perjudiciales en los sistemas biológicos, además reduce la turbidez del producto final para la extracción del café en la preparación del café soluble (Kavanagh, 2011).

1.3.4.4 Proteasas

Las Proteasas o Peptidasas (EC 3.4) son una clase de enzimas que hidrolizan el enlace peptídico (CO-NH) en una molécula de proteína. Representan el 2% del total de proteína presentes en todos los tipos de organismos (Savitha *et al.*, 2011). Las proteasas se dividen en dos grupos principales dependiendo su sitio de acción: exopeptidasas y endopeptidasas, estando distribuidas tanto en animales como en especies microbianas. Pueden dividirse en tres grupos basándose en la naturaleza del residuo del aminoácido en el sitio activo de la enzima: serina carboxipeptidasas, metalocarboxipeptidasas y carboxipeptidasas de serina (Rao *et al.*, 1998). El mecanismo básico de las proteasas de serina consiste en transferir la porción del acilo del sustrato al grupo funcional de la enzima (Alves *et al.*, 2005). La especificidad de una enzima hacia un sustrato es importante en los sistemas biológicos y la selección del sustrato dependerá de varios factores, incluyendo su ubicación dentro de la célula y la regulación de la expresión enzimática (Wildeboer *et al.*, 2009).

Las múltiples aplicaciones biotecnológicas de las proteasas han acaparado la atención en el empleo de los hongos, ya que poseen ciertas cualidades que los consideran una opción preferida, incluyendo su amplia diversidad bioquímica y susceptibilidad a la manipulación genética (Kavanagh, 2011). Las cepas fúngicas como las del género *Aspergillus* se han usado ampliamente para la producción industrial de proteasas con amplios rangos de diversidad de pH (Mohammad *et al.*, 2022).

La importancia de las proteasas en la industria ha sido ampliamente investigada y las aplicaciones han sido en las industrias del alimento, farmacéutica y química (Esteves *et al.*, 2009). Existe una amplia aplicación de enzimas proteolíticas en la industria de los detergentes debido a una serie de características atractivas como la estabilidad de un amplio intervalo de temperaturas y actividad óptima de pH alcalinos (Mohammad *et al.*, 2022). Las proteasas añadidas a los detergentes permiten la liberación de manchas proteínicas como queratina, sangre, leche y salsa. Con respecto a la industria lechera la principal aplicación de las proteasas es en el cuajo (*Penicillium roqueforti* y *Penicillium casei*) y elaboración de quesos (Polizeli, 2004). Para el cuajo actualmente y con la ayuda de la proteasa fúngica de *Mucor miehei* y *Mucor pusillus* (Alves *et al.*, 2005). Se sabe también que las enzimas proteolíticas de *Aspergillus oryzae* se han utilizado para corregir la hipotiroidemia; y que general la diversidad de las proteínas permite una mayor explotación de estas potencias microbianas (Souza *et al.*, 2015).

1.3.4.5 Lipasas

Las enzimas lipasas (EC 3.1.1.3) son una clase de enzimas hidrolíticas que catalizan la hidrólisis de triacilglicérols insolubles para generar ácidos grasos libres, diacilglicérols, monoacilglicérols y glicerol. Las enzimas pueden catalizar no sólo la hidrólisis si no también la síntesis de varias moléculas de acilglicérol de cadena larga de carbono (Sharma *et al.*, 2011). También pueden catalizar la esterificación, interesterificación y reacciones de transterificación en medios no acuosos (Maia *et*

al., 1999). Debido a estas propiedades catalíticas, las lipasas encuentran aplicaciones prometedoras en una amplia gama de procesos biotecnológicos e industriales incluyendo el mejoramiento del sabor en los alimentos, la producción del biodiesel y procesamiento farmacéutico (Jaeger y Eggert, 2002).

Las lipasas son producidas por varios organismos incluyendo plantas, animales y microorganismos como bacterias y hongos. La mayoría de las enzimas comerciales actuales se derivan de fuentes microbianas debido a la alta productividad, fácil manipulación genética, así como la disminución de los costos de operación (Treichel et al., 2010). Un gran número de lipasas de fuentes fúngicas se han caracterizado y se ha demostrado que cuentan con propiedades con respecto a la especificidad de posición, la especificidad de la grasa, la termoestabilidad y la actividad óptima. Las cepas de hongos que producen lipasas de interés comercial incluyen a *Rhizopus* sp., *Rhizomucor miehei*, *Geotrichum candidum*, *Pichia burtonii* y *Candida cylindracea* (Polizeli, 2014).

La primera lipasa comercial -Lipolase-, se originó del hongo *Thermomyces lanuginosus*; sin embargo, debido al bajo rendimiento, el gen que codifica para la proteína se clonó y posteriormente se expresó en *Aspergillus oryzae* el cual es empleado en la industria del detergente (Polizeli, 2014). La aplicación más significativa de las lipasas es su adición a detergentes tanto en productos domésticos como industriales, estos tienen la ventaja de ser biodegradables, no dejan residuos nocivos, por lo tanto, no representan un riesgo para la vida acuática (Kotogan et al., 2014).

Para lograr un mejor rendimiento para la producción de enzimas extracelulares, la selección apropiada de las condiciones de cultivo es esencial (Mateos-Díaz et al., 2006). Un gran número de factores es determinante para la producción de lipasas por hongos bajo condiciones de cultivo, entre los más importantes son el empleo de un inductor, parámetros fisiológicos como pH, temperatura y niveles de oxígeno (Treichel et al., 2010).

1.4 Interacciones fúngicas (co-cultivos)

Los hongos en la naturaleza y durante su ciclo de vida comparten hábitat con otros microorganismos en comunidades mixtas con interacciones complejas, como la simbiosis o la competencia por los recursos (Chi *et al.*, 2007). Las interacciones pueden ser sinérgicas; es decir, las hifas pueden actuar en conjunto para degradar al mismo sustrato, antagónicas como interacciones de remplazo, cuando un hongo ocupa el espacio de otro hongo; y de bloqueo cuando ninguno de los hongos gana territorio (Hiscox *et al.*, 2010). Las interacciones son importantes para el desarrollo de comunidades de hongos, se sabe que algunas actúan en la descomposición de la madera mediante estrés oxidativo que crea especies reactivas de oxígeno (ERO) y también en el reciclaje de carbono en ecosistemas boscosos (Hammel *et al.*, 2008).

Por otra parte, se sabe que las interacciones antagónicas entre hongos conducen a cambios morfológicos miceliales, cambios metabólicos, lo que conlleva a la producción y liberación de metabolitos secundarios y enzimas extracelulares (Boddy, 2000; Gómez-Cornelio *et al.*, 2016). Diversos estudios han demostrado que los cultivos duales o mixtos de hongos conllevan a una mayor producción de enzimas extracelulares, sin embargo, también se ha demostrado que esta producción depende de la combinación de especies en particular, el modo de interacción entre las especies y de las condiciones microambientales o nutricionales del sustrato (Gutierrez-Correa y Tengerdy, 1997). *Aspergillus niger* y *Trichoderma reesei* fueron co-cultivadas para la producción de celulasa (Hu *et al.*, 2011), mientras que *A. ellipticus* y *A. fumigatus* fueron cocultivados para la producción de celulasa y β -glucosidasa (Knowles *et al.*, 2022). El cultivo de *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete chrysosporium* produjo una mayor producción de enzimas lignolíticas (Verma y Madamwar, 2002), que también fue encontrado para una cepa de *Trametes* y *Trichoderma* (Zhang *et al.*, 2006).

1.5 Trabajos previos con enzimas en ambientes tropicales

En los últimos años se han publicado diversos estudios donde se emplean a los hongos como fuente prolífera de enzimas extracelulares. En este apartado destacaré las investigaciones realizadas en ambientes tropicales, los cuales han sido objeto de estudio debido a que disponen de una cobertura más amplia en cuanto a su diversidad, resiliencia y nuevos metabolitos, en comparación a sus homólogos de ambientes templados (Mtui, 2012).

En Chile, Chávez *et al.* (2006), reportan al género *Penicillium* con potencial para secretar Xilanasas empleadas en el bioblanqueamiento de la pulpa y papel. En Perú, Ramírez- Coha *et al.*, (2003), reportan a la especie *Streptomyces* sp. productoras de celulasas, endoglucanasa y β -glucosidasa con aplicación en el mejoramiento de alimento animal. En Brasil, Guimaraes *et al.*, (2006), realizan un análisis con el hongo *Rhizopus microsporus* en donde se observó actividad xylanasa, fosfatasa ácida, pectinasa, y amilasa, con aplicaciones en la industria textil y mejoramiento de alimentos. En Ecuador, Paredes *et al.*, (2010), encontraron que las especies *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus pulmonarius* poseen habilidad para secretar enzimas celulasas empleadas en la producción de bioetanol. En Cuba, Manzano-León *et al.*, (2011), aislaron enzimas capaces de secretar Lacasas a partir de *Pleurotus djamor* y *Ganoderma* sp. empleadas en biorremediación. Por otra parte, en Colombia, Rivera-Hoyos *et al.*, (2013), reportan basidiomicetos y ascomicetos productores de Lacasas con aplicaciones en biorremediación; y en Argentina, Fonseca *et al.*, (2016), reportan cepas de *Trametes* sp. con habilidad de producir Proteasas, MnP y Lacasas empleadas en biorremediación.

En México, entre los autores que reportan estudios sobre hongos productores de enzimas extracelulares con potencial para ser aplicados en la industria y la biotecnología podemos citar los siguientes: Rodríguez, 1999; Camarero *et al.*, 2005; Dzul-Puc *et al.*, 2005; Vázquez-Dunhalt *et al.*, 2005; Torres y Duarte 2009; Pérez-Armendáriz, 2010; Sánchez *et al.*, 2011; Quiroz-Castañeda, 2011; Cortés-Sánchez *et al.*, 2013; Chan- Cupul *et al.*, 2014; Téllez-Gutiérrez-Soto *et al.*, 2015; Ayala-Mendivil *et al.*, 2016; Téllez-Téllez y Díaz- Godínez, 2019; entre otros.

Con respecto al Estado de Tabasco solamente se reportan algunos trabajos de tesis, el más reciente emplean al hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri* con actividad enzimática extracelular de 1,3 (4)- β endoglucanasa (Sánchez, 2011). En particular para la sierra del Estado solamente se han reportan inventarios con hongos macroscópicos y otros relacionados con la flora y la fauna (López-Hernández *et al.*, 2011), por lo tanto, y dada la pérdida constante de la biodiversidad en el país, y particularmente en el trópico mexicano, es de gran relevancia determinar la producción enzimática que producen las comunidades fúngicas en estos ambientes, así como los tipos de interacciones que existen en donde la competición por alimento y espacio es reñido con posibilidad de incrementar dicha producción, por lo tanto se aporta nuevo conocimiento al estudio de los hongos tropicales con un enfoque biotecnológico y ambiental.

1.6 Objetivos

1.6.1 General

Evaluar el potencial enzimático producido por hongos aislados de la sierra de Tabasco y el efecto de cultivos duales en la expresión de las enzimas extracelulares.

1.6.2 Objetivos específicos

1. Identificar las 150 cepas fúngicas por taxonomía clásica.
2. Evaluar enzimáticamente las 150 cepas por el método cualitativo en placa.
3. Estandarizar los ensayos enzimáticos para cada una de las enzimas de estudio, mediante el control del pH, temperatura, agitación, concentración de inductores, etc., en los medios de cultivo.
4. Cuantificar la actividad enzimática y contenido de proteínas en medio líquido de las cepas seleccionadas.
5. Determinar el efecto de los cultivos duales en la actividad de las enzimas extracelulares en medio líquido.

1.7 Hipótesis

Los hongos lignocelulósicos aislados de la sierra de Tabasco podrían expresar un aumento de su actividad enzimática estando en co-cultivos que, en monocultivo, e interesantes para ser aplicados en la industria alimentaria y biotecnológica.

1.8 Referencias

- Abdel-Hamid, A. M., Solbiati, J. O., & Cann, I. K. O. (2013). Insights into Lignin Degradation and its Potential Industrial Applications. *Advances in Applied Microbiology*, 82, 1–28. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407679-2.00001-6>
- Ahmed, S., Imdad, S. S., & Jamil, A. (2012). Comparative study for the kinetics of extracellular xylanases from *Trichoderma harzianum* and *Chaetomium thermophilum*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 15(3). <https://doi.org/10.2225/vol15-issue3-fulltext-2>
- Ahmed, S., Imdad, S. S., & Jamil, A. (2012b). Comparative study for the kinetics of extracellular xylanases from *Trichoderma harzianum* and *Chaetomium thermophilum*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 15(3). <https://doi.org/10.2225/VOL15-ISSUE3>.
- Ahmed, S., Riaz, S., & Jamil, A. (2009). Molecular cloning of fungal xylanases: An overview. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 84, Issue 1, pp. 19–35). <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2079-4>
- Alves, M. H., De Campos-Takaki, G. M., Okada, K., Ferreira Pessoa, I. H., & Milanez, A. I. (2005). Detection of extracellular protease in *Mucor* species. *Revista Iberoamericana de Micologia*, 22(2), 114–117. [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(05\)70020-6](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(05)70020-6)
- Ayala-Mendivil, N., de los Angeles Calixto-Romo, M., Amaya-Delgado, L., Casas-Godoy, L., & Sandoval, G. (2016). High Throughput Screening: Developed Techniques for Cellulolytic and Xylanolytic Activities Assay. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 19(8), 627–635. <https://doi.org/10.2174/1386207319666160810105808>
- Azadi, M. A., Hemmati, R., Homaei, A., & Khalaji-Pirbalouty, V. (2022). A psychrophilic caseinolytic aspartic protease from the freshwater amphipod *Gammarus bakhteyaricus* for application in milk coagulation. *LWT*, 153, 112536. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.112536>
- Baldrian, P. (2009). Microbial enzyme-catalyzed processes in soils and their analysis. *Plant, Soil and Environment*, 55(9), 370–378. <https://doi.org/10.17221/134/2009-PSE>
- Baldrian, Petr, & Gabriel, J. (2002). Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiology Letters*, 206(1), 69–74. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.2002.TB10988.X>
- Bhat, M. K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology*

- Advances*, 18(5), 355–383. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(00\)00041-0](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(00)00041-0)
- Biswas, R., Sahai, V., Mishra, S., & Bisaria, V. S. (2010). Bioprocess strategies for enhanced production of xylanase by *Melanocarpus albomyces* IITD3A on agro-residual extract. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(6), 702–708. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOSEC.2010.07.013>
- Boddy, L. (2000). Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes. *FEMS Microbiology Ecology*, 31(3), 185–194. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6941.2000.TB00683.X>
- Bogan, B. W., Lamar, R. T., Burgos, W. D., & Tien, M. (1999). Extent of humification of anthracene, fluoranthene, and benzo[α]pyrene by *Pleurotus ostreatus* during growth in PAH-contaminated soils. *Letters in Applied Microbiology*, 28(4), 250–254. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2672.1999.00537.X>
- Brijwani, K., Rigdon, A., & Vadlani, P. V. (2010). Fungal laccases: Production, function, and applications in food processing. In *Enzyme Research* (Vol. 2010). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.4061/2010/149748>
- 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.1775-1784.2005>
- Camassola, M., & Dillon, A. J. P. (2009). Biological pretreatment of sugar cane bagasse for the production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum*. *Industrial Crops and Products*, 29(2–3), 642–647. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2008.09.008>
- Capello García, S., Díaz Contreras, A., & López-Hernández, E. S. (2011). La diversidad de los hongos de la sierra. In E. S. López-Hernández (Ed.), *Educación Ambiental para la conservación de la biodiversidad, Bases de información para la Sierra de Tabasco* (Primera ed, pp. 67–87).
- Chambergó, F. S., & Valencia, E. Y. (2016). Fungal biodiversity to biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100, 2567–2577. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7305-2>
- Chaurasia, P. K., Bharati, S. L., & Mani, A. (2019). Significances of Fungi in Bioremediation of Contaminated Soil. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Biotechnology in Agro-Environmental Sustainability*, 281–294. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64191-5.00020-1>
- Chávez, R., Bull, P., & Eyzaguirre, J. (2006). The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. *Journal of Biotechnology*, 123, 413–433. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.12.036>

- Torres-Duarte, C., Roman, R., Tinoco, R., & Vazquez-Duhalt, R. (2009). *Halogenated pesticide transformation by a laccase-mediator system Author's personal copy Halogenated pesticide transformation by a laccase-mediator system*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.07.039>
- Cherry, J. R., & Fidantsef, A. L. (2003). Directed evolution of industrial enzymes: An update. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 14, Issue 4, pp. 438–443). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(03\)00099-5](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00099-5)
- Chi, Y., Hatakka, A., & Maijala, P. (2007). Can co-culturing of two white-rot fungi increase lignin degradation and the production of lignin-degrading enzymes? *International Biodeterioration and Biodegradation*, 59(1), 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.06.025>
- Cortés-Sánchez, A. (2013). Una mirada a los organismos fúngicos: Fábricas versátiles de diversos metabolitos secundarios de interés biotecnológico. A look at fungal organisms: Versatile factories of diverse secondary metabolites of biotechnological interest. *Revista Química Viva*, 2, 64–90.
- Coutinho, P. M., Andersen, M. R., Kolenova, K., vanKuyk, P. A., Benoit, I., Gruben, B. S., Trejo-Aguilar, B., Visser, H., van Solingen, P., Pakula, T., Seiboth, B., Battaglia, E., Aguilar-Osorio, G., de Jong, J. F., Ohm, R. A., Aguilar, M., Henrissat, B., Nielsen, J., Stålbrand, H., & de Vries, R. P. (2009). Post-genomic insights into the plant polysaccharide degradation potential of *Aspergillus nidulans* and comparison to *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genetics and Biology*: FG & B, 46 Suppl 1. <https://doi.org/10.1016/J.FGB.2008.07.020>
- Chan-Cupul, W. C., Abarca, G. H., Carrera, D. M., & Vázquez, R. R. (2014). Enhancement of ligninolytic enzyme activities in a *Trametes maxima*-*Paecilomyces carneus* co-culture: Key factors revealed after screening using a Plackett-Burman experimental design. *Electronic Journal of Biotechnology*, 17(3), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.04.007>
- Dávila, G., & Vázquez-Duhalt, R. (2006). Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales AMBIENTALES Gustavo Dávila y Rafael Vázquez-Duhalt. *Mensaje Bioquímico*, XXX.
- Dighton, J. (2003). *Fungi in ecosystem processes*. 432.
- Dzul-Puc, J. D., Esparza-García, F., Barajas-Aceves, M., & Rodríguez-Vázquez, R. (2005). Benzo[a]pyrene removal from soil by *Phanerochaete chrysosporium* grown on sugarcane bagasse and pine sawdust. *Chemosphere*, 58(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.08.089>
- El Hadrami, A., Adam, L. R., El Hadrami, I., & Daayf, F. (2010). Chitosan in Plant Protection. *Marine Drugs*, 8(4), 968. <https://doi.org/10.3390/MD8040968>

- Esteves, I., Peteira, B., Atkins, S. D., Magan, N., & Kerry, B. (2009). Production of extracellular enzymes by different isolates of *Pochonia chlamydosporia*. *Mycological Research*, 113(8), 867–876. <https://doi.org/10.1016/J.MYCRES.2009.04.005>
- Fonseca, M. I., Tejerina, M. R., Sawostjanik-Afanasiuk, S. S., Giorgio, E. M., Barchuk, M. L., Zapata, P. D., & Villalba, L. L. (2016). Preliminary studies of new strains of *Trametes* sp. From Argentina for laccase production ability. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(2), 287–297. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.01.002>
- Freitag, M., & Morrell, J. J. (1992). Decolorization of the polymeric dye Poly R-478 by wood-inhabiting fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, 38(8), 811–822. <https://doi.org/10.1139/m92-133>
- García, S. C., & Trejo, H. H. (1990). Lista preliminar de los hongos (Macromicetos) y Myxomycetes de Tabasco, México. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 7(13). <https://doi.org/10.19136/ERA.A7N13.444>
- Gautam, S. P., Bundela, P. S., Pandey, A. K., Khan, J., Awasthi, M. K., & Sarsaiya, S. (2011). Access to. *Research Biotechnology Research International*, 2011. <https://doi.org/10.4061/2011/810425>
- Gómez-Cornelio, S., Ortega-Morales, O., Morón-Ríos, A., Reyes-Estebanez, M., & Rosa-García, S. de la. (2016). Changes in fungal community composition of biofilms on limestone across a chronosequence in Campeche, Mexico. *Acta Botanica Mexicana*, 117, 59–77. <https://doi.org/10.21829/abm117.2016.1168>
- Gonçalves, M. L. F. C., & Steiner, W. (1996). Purification and Characterization of Laccase from a Newly Isolated Wood-Decaying Fungus. *ACS Symposium Series*, 655, 257–266. <https://doi.org/10.1021/bk-1996-0655.ch020>
- Guimarães, L. H. S., Peixoto-Nogueira, S. C., Michelin, M., Rizzatti, A. C. S., Sandrim, V. C., Zanoelo, F. F., Aquino, A. C. M. M., Junior, A. B., & Polizeli, M. D. L. T. M. (2006). Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(4), 474–480. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000400014>
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., & Chauhan, B. (2003). Microbial α -amylases: A biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38(11), 1599–1616. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00053-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00053-0)
- Gutierrez-Correa, M., & Tengerdy, R. P. (1997). Production of cellulase on sugar cane bagasse by fungal mixed culture solid substrate fermentation. *Biotechnology Letters*, 19(7), 665–667. <https://doi.org/10.1023/A:1018342916095>
- Gutiérrez-Soto, G., Medina-González, G. E., Treviño-Ramírez, J. E., & Hernández-

- Luna, C. E. (2015). Native Macrofungi that Produce Lignin-Modifying Enzymes, Cellulases, and Xylanases with Potential Biotechnological Applications. *BioResources*, 10(4), 6676–6689. <https://doi.org/10.15376/BIORES.10.4.6676-6689>
- Guzmán-Maldonado, H., Paredes-López, O., & Biliaderis, C. G. (1995). Amylolytic Enzymes and Products Derived from Starch: A Review. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 35, Issue 5, pp. 373–403). <https://doi.org/10.1080/10408399509527706>
- Hakulinen, N., Turunen, O., Jänis, J., Leisola, M., & Rouvinen, J. (2003). Three-dimensional structures of thermophilic β -1,4-xylanases from *Chaetomium thermophilum* and *Nonomuraea flexuosa*. *European Journal of Biochemistry*, 270(7), 1399–1412. <https://doi.org/10.1046/J.1432-1033.2003.03496.X>
- Haltrich, D., Nidetzky, B., Kulbe, K. D., Steiner, W., & Župančič, S. (1996). Production of fungal xylanases. *Bioresource Technology*, 58(2), 137–161. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(96\)00094-6](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(96)00094-6)
- Hammel, K. E., Kapich, A. N., Jensen, K. A., & Ryan, Z. C. (2002). Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. In *Enzyme and Microbial Technology* (Vol. 30, Issue 4, pp. 445–453). [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00011-X](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00011-X)
- Herculano, P. N., Lima, D. M. M., Fernandes, M. J. S., Neves, R. P., Souza-Motta, C. M., & Porto, A. L. F. (2011). Isolation of cellulolytic fungi from waste of castor (*Ricinus communis* L.). *Current Microbiology*, 62(5), 1416–1422. <https://doi.org/10.1007/S00284-011-9879-3>
- Highley, T. L. (1997). Mechanism of Brown-Rot Decay: Paradigm or Paradox 1 Frederick Green III &. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 39(3), 113–124.
- Hiscox, J., Baldrian, P., Rogers, H. J., & Boddy, L. (2010). Changes in oxidative enzyme activity during interspecific mycelial interactions involving the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Fungal Genetics and Biology*, 47(6), 562–571. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.03.007>
- Hu, H. L., van den Brink, J., Gruben, B. S., Wösten, H. A. B., Gu, J. D., & de Vries, R. P. (2011). Improved enzyme production by co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with other fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65(1), 248–252. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.11.008>
- Irshad, M., Ahmed, S., Latif, F., & Rajoka, M. I. (2008). Regulation of endo- β -D-Xylanase and β -Xylosidase synthesis in *humicola lanuginosa*. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 30(6), 913–918.
- Jaeger, K. E., & Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. *Current Opinion in*

- Biotechnology*, 13(4), 390–397. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00341-5](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00341-5)
- Jahromi, M. F. (2011). *Efficiency of rice straw lignocelluloses degradability by Aspergillus terreus ATCC 74135 in solid state fermentation.*
- Kalra, R., Conlan, X. A., & Goel, M. (2020). Fungi as a Potential Source of Pigments: Harnessing Filamentous Fungi. *Frontiers in Chemistry*, 8, 369. <https://doi.org/10.3389/FCHEM.2020.00369/BIBTEX>
- Kavanagh, K. (2011). Fungi: Biology and Applications: Second Edition. *Fungi: Biology and Applications: Second Edition*, 1–366. <https://doi.org/10.1002/9781119976950>
- Knowles, S. L., Raja, H. A., Roberts, C. D., & Oberlies, N. H. (2022). Fungal–fungal co-culture: a primer for generating chemical diversity. *Natural Product Reports*. <https://doi.org/10.1039/D1NP00070E>
- Kotogán, A., Németh, B., Vágvölgyi, C., Papp, T., & Takó, M. (2014). Screening for extracellular lipase enzymes with transesterification capacity in Mucoromycotina strains. *Food Technology and Biotechnology*, 52(1), 73–82.
- Krull, R., Wucherpennig, T., Esfandabadi, M. E., Walisko, R., Melzer, G., Hempel, D. C., Kampen, I., Kwade, A., & Wittmann, C. (2013). Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. *Journal of Biotechnology*, 163(2), 112–123. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2012.06.024>
- Kulkarni, N., Shendye, A., & Rao, M. (1999). Molecular and biotechnological aspects of xylanases. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 23, Issue 4, pp. 411–456). [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(99\)00006-6](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(99)00006-6)
- Lange, L., Agger, J. W., & Meyer, A. S. (2020). Fungal Biotechnology: Unlocking the Full Potential of Fungi for a More Sustainable World. *Grand Challenges in Biology and Biotechnology*, 3–32. https://doi.org/10.1007/978-3-030-29541-7_1
- Li, H., Murtomäki, L., Leisola, M., & Turunen, O. (2012). The effect of thermostabilising mutations on the pressure stability of Trichoderma reesei GH11 xylanase. *Protein Engineering, Design and Selection*, 25(12), 821–826. <https://doi.org/10.1093/protein/gzs052>
- Li, Y., Liu, Z., Cui, F., Liu, Z., & Zhao, H. (2007). Application of Plackett-Burman experimental design and Doehlert design to evaluate nutritional requirements for xylanase production by Alternaria mali ND-16. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(2), 285–291. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1167-6>
- Liew, C. Y., Husaini, A., Hussain, H., Muid, S., Liew, K. C., & Roslan, H. A. (2011). Lignin biodegradation and ligninolytic enzyme studies during biopulping of

- Acacia mangium wood chips by tropical white rot fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(6), 1457–1468. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0598-x>
- Mabrouk, A. M., Kheiralla, Z. H., Hamed, E. R., Youssry, A. A., & Aty, A. A. A. El. (2012). Characterization and purification of the crude *Trematosphaeria mangrovei* laccase enzyme. *Egyptian Pharmaceutical Journal*, 11(2), 93. <https://doi.org/10.7123/01.EPJ.0000419801.40087.2A>
- Macedo, G. A., & Pio, T. F. (2005). A rapid screening method for cutinase producing microorganisms. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36(4), 388–394. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822005000400016>
- Magan, N., Fragoeiro, S., & Bastos, C. (2018). *Environmental Factors and Bioremediation of Xenobiotics Using White Rot Fungi*. <https://doi.org/10.4489/MYCO.2010.38.4.238>
- Maia, M. D. M. D., Camargo De Moraes, M. M., De Moraes, M. A., Melo, E. H. M., & De Lima Filho, J. L. (1999). Production of extracellular lipase by the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* Fs1. *Revista de Microbiologia*, 30(4), 304–309. <https://doi.org/10.1590/S0001-37141999000400003>
- Manzano-león, A. M., Ramos-leal, M., Domínguez-guilarte, O., Sánchez-, M. I., China-borrell, R., Batista-utria, A., Cabarroi-hernández, M., Jiménez-, L., & Guerra-rivera, M. A. G. (2011). Isolation and selection of white-rot fungi for decolourisation of industrial dyes. *Revista CENIC: Ciencias Biológicas*, 42(1), 17–23.
- Mateos Diaz, J. C., Rodríguez, J. A., Roussos, S., Cordova, J., Abousalham, A., Carriere, F., & Baratti, J. (2006). Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 1042–1050. <https://doi.org/10.1016/j.enzmitec.2006.02.005>
- Meyer, V., Basenko, E. Y., Benz, J. P., Braus, G. H., Caddick, M. X., Csukai, M., de Vries, R. P., Endy, D., Frisvad, J. C., Gunde-Cimerman, N., Haarmann, T., Hadar, Y., Hansen, K., Johnson, R. I., Keller, N. P., Kraševac, N., Mortensen, U. H., Perez, R., Ram, A. F. J., ... Wösten, H. A. B. (2020). Growing a circular economy with fungal biotechnology: a white paper. *Fungal Biology and Biotechnology* 2020 7:1, 7(1), 1–23. <https://doi.org/10.1186/S40694-020-00095-Z>
- Mtui G., Y. S. (2012). Lignocellulolytic enzymes from tropical fungi: Types, substrates and applications. *Scientific Research and Essays*, 7(15), 1544–1555. <https://doi.org/10.5897/sre11.1812>

- Niebisch, C. H., Malinowski, A. K., Schadeck, R., Mitchell, D. A., Kava-Cordeiro, V., & Paba, J. (2010). Decolorization and biodegradation of reactive blue 220 textile dye by *Lentinus crinitus* extracellular extract. *Journal of Hazardous Materials*, 180(1–3), 316–322. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2010.04.033>
- Omrane Benmrâd, M., Moujehed, E., Ben Elhoul, M., Zarái Jaouadi, N., Mechri, S., Rekik, H., Kourdali, S., El Hattab, M., Badis, A., Sayadi, S., Bejar, S., & Jaouadi, B. (2016). A novel organic solvent- and detergent-stable serine alkaline protease from *Trametes cingulata* strain CTM10101. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 961–972. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2016.06.025>
- Osma, J. F., Toca-Herrera, J. L., & Rodríguez-Couto, S. (2010). Access to. *Research Enzyme Research*, 2010. <https://doi.org/10.4061/2010/918761>
- Paredes Medina, D., Álvarez Núñez, M., & Silva Ordoñez, M. (2010). Obtención de Enzimas Celulasas por Fermentación Sólida de Hongos para ser Utilizadas en el Proceso de Obtención de Bioalcohol de Residuos del Cultivo de Banano. *Revista Tecnológica ESPOL-RTE*, 23, 81–88. https://redib.org/Record/oai_articulo2828237-obtención-de-enzimas-celulasas-por-fermentación-sólida-de-hongos-para-ser-utilizadas-en-el-proceso-de-obtención-de-bioalcohol-de-residuos-del-cultivo-de-banano
- Park, M. S., Lee, S., Oh, S. Y., Cho, G. Y., & Lim, Y. W. (2016). Diversity and enzyme activity of *Penicillium* species associated with macroalgae in Jeju Island. *Journal of Microbiology*, 54(10), 646–654. <https://doi.org/10.1007/s12275-016-6324-0>
- Paszczyński, A., Biochem, R. C.-S., & 2000, U. (2000). Recent advances in the use of fungi in environmental remediation and biotechnology. *Soil Biochemistry*. https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=VI9N7b16CRoC&oi=fnd&pg=PA379&dq=Paszczyński,+A.+y+Crawford,+R.L.+2000&ots=ctIBcWTwML&sig=Sa5DE6D3_fnZjYTtJz8ZrHE7Zjg#v=onepage&q&f=false
- Peralta-Zamora, P., Pereira, C. M., Tiburtius, E. R. L., Moraes, S. G., Rosa, M. A., Minussi, R. C., & Durán, N. (2003). Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase. In *Applied Catalysis B: Environmental* (Vol. 42).
- Pérez-Armendáriz, B., Martínez-Carrera, D., Calixto-Mosqueda, M., Alba, J., & Rodríguez-Vázquez, R. (2010). Filamentous fungi remove weathered hydrocarbons from polluted soil of tropical México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 26, 193–199. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=37014384002>
- Polgár, L. (2005). The catalytic triad of serine peptidases. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 62, Issues 19–20, pp. 2161–2172). <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5160-x>

- Polizeli, M. D. L. T. M., & Rai, M. (2014). *Fungal enzymes*. In *Fungal Enzymes*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b15247>
- Puls, J., & Poutanen, K. (1989). *Mechanisms of enzymic hydrolysis of hemicelluloses (xylans) and procedures for determination of the enzyme activities involved* (pp. 151–165). Elsevier.
- Punnapayak, H., Prasongsuk, S., Messner, K., Danmek, K., & Lotrakul, P. (2011). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation by laccase from a tropical white rot fungus *Ganoderma lucidum*. *African Journal of Biotechnology*, 8(21), 5897–5900. <https://doi.org/10.4314/ajb.v8i21.66070>
- Quiroz-Castañeda, R. E., Pérez-Mejía, N., Martínez-Anaya, C., Acosta-Urdapilleta, L., & Folch-Mallol, J. (2011). Evaluation of different lignocellulosic substrates for the production of cellulases and xylanases by the basidiomycete fungi *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus*. *Biodegradation*, 22(3), 565–572. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9428-y>
- Ramírez, P., & Coha, J. M. (2003). Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. *Revista Peruana de Biología*, 10(1), 67–77. <https://doi.org/10.15381/rpb.v10i1.2481>
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 62(3), 597–635. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9729602>
- Raveendran, S., Parameswaran, B., Ummalyima, S. B., Abraham, A., Mathew, A. K., Madhavan, A., Rebello, S., & Pandey, A. (2018). Applications of microbial enzymes in food industry. In *Food Technology and Biotechnology* (Vol. 56, Issue 1, pp. 16–30). University of Zagreb. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.01.18.5491>
- Ravindran, C., Naveenan, T., Varatharajan, G., & Biotechnology, M. (2010). *Optimisation of alkaline cellulase production from marine derived fungi, Chaetomium sp., using agricultural and industrial wastes as substrates*. 53(3), 275–282.
- Reilly, P. J. (1981). Xylanases: structure and function. *Basic Life Sciences*, 18, 111–129. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-3980-9_8
- Rivera-Hoyos, C. M., Morales-Álvarez, E. D., Poutou-Piñales, R. A., Pedroza-Rodríguez, A. M., Rodríguez-Vázquez, R., & Delgado-Boada, J. M. (2013). Fungal laccases. *Fungal Biology Reviews*, 27(3–4), 67–82. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2013.07.001>

- Rizzatti, A. C. S., Jorge, J. A., Terenzi, H. F., Rechia, C. G. V., & Polizeli, M. L. T. M. (2001). Purification and properties of a thermostable extracellular β -D-xylosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 26(3), 156–160. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000107>
- Rodríguez-Cruz, M., Sánchez González, R., Sánchez García, A. M., & Lòpez-Alarcòn, M. (2012). Coexisting role of fasting or feeding and dietary lipids in the control of gene expression of enzymes involved in the synthesis of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids. *Gene*, 496(1), 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.12.022>
- Rodríguez, E., Pickard, M. A., & Vazquez-Duhalt, R. (1999). Industrial Dye Decolorization by Laccases from Ligninolytic Fungi. *Correspondence to: R. Vazquez-Duhalt CURRENT MICROBIOLOGY*, 38, 27–32.
- Rodríguez, R. D., Heredia, G., Siles, J. A., Jurado, M., Saparrat, M. C. N., García-Romera, I., & Sampedro, I. (2019). Enhancing laccase production by white-rot fungus *Funalia floccosa* LPSC 232 in co-culture with *Penicillium commune* GHAE86. *Folia Microbiologica*, 64(1), 91–99. <https://doi.org/10.1007/s12223-018-0635-y>
- Sanchez, S., & Demain, A. L. (2011). Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical, and biotechnological significance. *Organic Process Research and Development*, 15(1), 224–230. <https://doi.org/10.1021/op100302x>
- Score, A. J., Palfreyman, J. W., & White, N. A. (1997). Extracellular phenoloxidase and peroxidase enzyme production during interspecific fungal interactions. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 39(2–3), 225–233. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(97\)00012-7](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(97)00012-7)
- Sharma, D., Sharma, B., & Shukla, A. K. (2011). Biotechnological approach of microbial lipase: A review. In *Biotechnology* (Vol. 10, Issue 1, pp. 23–40). <https://doi.org/10.3923/biotech.2011.23.40>
- Sharma, R. K., & Arora, D. S. (2011). Biodegradation of paddy straw obtained from different geographic locations by means of *Phlebia* spp. for animal feed. *Biodegradation*, 22(1), 143–152. <https://doi.org/10.1007/S10532-010-9383-7/FIGURES/4>
- Silva, I. S., Grossman, M., & Durrant, L. R. (2009). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (2-7 rings) under microaerobic and very-low-oxygen conditions by soil fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 63(2), 224–229. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2008.09.008>
- Singh Arora, D., & Kumar Sharma, R. (2010). Ligninolytic fungal laccases and their

- biotechnological applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(6), 1760–1788. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8676-y>
- Sudarson, J., Ramalingam, S., Kishorekumar, P., & Venkatesan, K. (2014). Expeditious Quantification of Lignocellulolytic Enzymes from Indigenous Wood Rot and Litter Degrading Fungi from Tropical Dry Evergreen Forests of Tamil Nadu. *Biotechnology Research International*, 2014, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2014/127848>
- Sukumaran, R. K., Singhania, R. R., & Pandey, A. (2005). Microbial cellulases □ Production, applications and challenges. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 64, 832–844.
- Téllez-Téllez, M., & Díaz-Godínez, G. (2019). Omic tools to study enzyme production from fungi in the pleurotus genus. *BioResources*, 14(1), 2420–2457. <https://doi.org/10.15376/BIORES.14.1.2420-2457>
- Thakker, G. D., Evans, C. S., & Rao, K. K. (1992). Purification and characterization of laccase from *Monocillium indicum* Saxena. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37(3), 321–323. <https://doi.org/10.1007/BF00210986>
- Thurston, C. F. (1994). The structure and function of fungal laccases. In *Microbiology* (Vol. 140, Issue 1, pp. 19–26). <https://doi.org/10.1099/13500872-140-1-19>
- Treichel, H., de Oliveira, D., Mazutti, M. A., Di Luccio, M., & Oliveira, J. V. (2010). A review on microbial lipases production. In *Food and Bioprocess Technology* (Vol. 3, Issue 2, pp. 182–196). <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0202-2>
- Tripathi, A., Upadhyay, R. C., & Singh, S. (2011). Mineralization of mononitrophenols by *Bjerkandera adusta* and *Lentinus squarrosulus* and their extracellular ligninolytic enzymes. *Journal of Basic Microbiology*, 51(6), 635–649. <https://doi.org/10.1002/jobm.201000436>
- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A., & Itävaara, M. (2000). Biodegradation of lignin in a compost environment: A review. *Bioresource Technology*, 72(2), 169–183. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00104-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00104-2)
- Twomey, L. N., Pluske, J. R., Rowe, J. B., Choct, M., Brown, W., McConnell, M. F., & Pethick, D. W. (2003). The effects of increasing levels of soluble non-starch polysaccharides and inclusion of feed enzymes in dog diets on faecal quality and digestibility. *Animal Feed Science and Technology*, 1–4(108), 71–82. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(03\)00161-5](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(03)00161-5)
- Vazquez-Duhalt, R., Marquez-Rocha, F., Ponce, E., Licea, A. F., & Viana, M. T. (2006). Nonylphenol, an integrated vision of a pollutant. Scientific review. *Applied Ecology and Environmental Research*, 4(1), 1–25. https://doi.org/10.15666/AEER/0401_001025

- Verma, P., & Madamwar, D. (2002). Production of ligninolytic enzymes for dye decolorization by cocultivation of white-rot fungi *Pleurotus ostreatus* and *Phanerochaete chrysosporium* under solid-state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, 102–103, 109–118. <https://doi.org/10.1385/ABAB:102-103:1-6:109>
- Wildeboer, D., Jeganathan, F., Price, R. G., & Abuknesha, R. A. (2009). Characterization of bacterial proteases with a panel of fluorescent peptide substrates. *Analytical Biochemistry*, 384(2), 321–328. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2008.10.004>
- Xu, F. (1999). "Recent progress in laccase study: properties, enzymology, production, and applications,." In *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, Bioseparation* (pp. 1545–1554). [https://www.scirp.org/\(S\(351jmbntvnsjt1aadkposzje\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=819832](https://www.scirp.org/(S(351jmbntvnsjt1aadkposzje))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=819832)
- Yang, Y., Wei, F., Zhuo, R., Fan, F., Liu, H., Zhang, C., Ma, L., Jiang, M., & Zhang, X. (2013). Enhancing the laccase production and laccase gene expression in the white-rot fungus *Trametes velutina* 5930 with great potential for biotechnological applications by different metal ions and aromatic compounds. *PloS One*, 8(11). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0079307>
- Yoshida, H. (1883). LXIII. - Chemistry of lacquer (Urushi) Part I: Communication from the Chemical Society of Tokio. In *Journal of the Chemical Society, Transactions* (Vol. 43, pp. 472–486). <https://doi.org/10.1039/CT8834300472>
- Zhang, M., Wu, F., Wei, Z., Xiao, Y., & Gong, W. (2006). Characterization and decolorization ability of a laccase from *Panus rudis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(1), 92–97. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.09.012>
- Zilly, A., Cristina, G., Bazanella, S., & Bracht, A. (2011). *Solid-State Bioconversion of Passion Fruit Waste by White-Rot Fungi for Production of Oxidative and Hydrolytic Enzymes Safety, efficacy and immunogenicity of therapeutic vaccines in the treatment of patients with high-grade cervical intraepithelial neoplasia associated with human papillomavirus: a systematic review and meta-analysis View project 5th SIPEQ-5th International Conference on Qualitative Studies and Research View project*. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0532-8>

Capítulo II

Bioprospección enzimática de hongos aislados de un bosque tropical de México.

Capítulo II

2. Bioprospección enzimática de Hongos aislados de un bosque tropical de México.



Article

Enzymatic bioprospecting of fungi isolated from a tropical rainforest in Mexico

Karla Peraza Jiménez¹, Susana De la Rosa García², Javier Huijara Vasconcelos³, Manuela Reyes Estebanez⁴ and Sergio Gómez Cornelio⁵

¹Laboratorio de Microbiología Aplicada, División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Km. 0.5 Carretera Villahermosa-Cárdenas, 86150, Villahermosa, Tabasco, México.

²División Académica de Ciencias Agropecuarias, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Km. 25 Carretera Federal Villahermosa-Teapa, R/a La Huasteca, 86298, Villahermosa, Tabasco, México.

³Laboratorio de Microbiología Ambiental y Biotecnología. Universidad Autónoma de Campeche. Av. Agustín Melgar s/n entre Juan de la Barrera y Calle 20. Col Buenavista, 24039, Campeche, Campeche, Mexico

⁴Universidad Politécnica del Centro. Km 22.5 Carretera Federal Villahermosa-Teapa, Tumbulushal, 86290, Villahermosa, Tabasco, México.

*Correspondence: sagomezcornelio@gmail.com

Recivido:10 de noviembre 2021 Aceptado: 23 de diciembre 2021 Publicado: 28 Diciembre 2021

Resumen

La sierra tropical húmeda en México propicia un lugar idóneo para el desarrollo de una alta diversidad de plantas, por ello es un sitio interesante para la bioprospección enzimática de los hongos, quienes se ocupan de un reciclaje eficiente y acelerado de la materia orgánica, y cuyas enzimas podrían presentar múltiples aplicaciones biotecnológicas. Para este estudio se colectaron un total 1000 cepas de morfotipos fúngicos tanto macroscópicos como microscópicos provenientes de sustratos como suelo, hojarasca y carpóforos. Para el cribado enzimático fueron seleccionadas 150 cepas (50 de cada sustrato) y 50 carpóforos. De esta primera fase se registraron 51 cepas con actividad positiva para una de las cinco enzimas evaluadas, de las cuales 20 fueron aisladas de la hojarasca, 16 del suelo y 12 de carpóforos; para la cuantificación enzimática fueron seleccionadas las 10 mejores cepas, tomando en cuenta el índice de potencia (IP) y la expresión de al menos dos enzimas. La

actividad sobresaliente se registró para la enzima lacasa con 1179 U/mg y 710.66 U/mg de *Trametes villosa* y *Marasmius sp.* respectivamente, mientras que *Daedalea flavida* mostró tanto actividad lacasa (521.85 U/mg) como proteasa (80.66 U/mg), y las especies del género *Fusarium spp.* PH-79 y FS-400 con actividad amilasa (14.0 U/mg, 49.23 U/mg) y xilanasa (40.05 U/mg, 36.03 U/mg), respectivamente. Estos resultados confirman que los hongos tropicales tienen un buen potencial enzimático para aplicaciones en la industria.

Abstract

The humid tropical provides an ideal place for the development of a high diversity of plants; this is why it is an interesting site for the enzymatic bioprospecting of fungi that are responsible for the recycling of organic matter in an efficient and accelerated way and whose enzymes could have multiple biotechnological applications. For this study, 1250 isolates of macroscopic and microscopic fungal morphotypes were collected from soil, leaf litter, and wood. For the enzymatic screening, 150 strains (50 from each source) were selected. From the first phase, 51 strains with positive activity for five enzymes were evaluated, of which 20 were isolated from leaf litter, 18 from the soil, and 13 from wood. The ten best strains were selected for the enzymatic quantification, considering the potency index and the production of at least two enzymes. High laccase activity was detected for *Trametes villosa* FE35 and *Marasmius sp.* CE25 (1179 and 710.66 U/mg of respectively), while *Daedalea flavida* PE47 showed laccase (521.85 U/mg) and protease activities (80.66 U/mg). *Fusarium spp.* PH79 and FS400 strains had amylase (14.0 U/mg, 49.23 U/mg) and xylanase activities (40.05 U/mg, 36.03 U/mg) respectively. These results confirm that tropical fungi have a good enzymatic potential for applications in the industry.

Keywords: hydrolases; oxidoreductases; enzyme extracellular; screening

2.1 Introduction

The geographical position of Mexico (Nearctic and Neotropical) favors a mountainous tropical climate with a great variety of ecosystems and diversity of species, occupying fifth place within the group of megadiverse countries in the world, hosting around 12% of the planet's biodiversity [1,2]. The humid tropics of Mexico are characterized by typical high jungle perennial vegetation and environmental conditions with high temperatures and annual rainfall, which generates an accelerated and continuous environment in the recycling of nutrients, decomposition of organic matter, and competition for substrates.

[3,4]. All these peculiarities make these environments optimal for developing a high diversity of fungi; therefore, in this area, it is possible to find fungi that produce hydrolytic and lignin-degrading enzymes with biotechnological potential that are still unexplored [5]. The physiological adaptability and multienzyme metabolic system of the fungi constitute the base of their amazing ability to develop under diverse environmental conditions, considered the drivers of the natural restoration of the ecosystems; they are natural decomposers of organic matter to absorb their nutrients, thus allowing recycling, mineralization, and compound release for the use of the community and the ecosystem [6,7].

Extracellular enzymes of fungal origin, both oxidoreductive and hydrolytic, have been reported for various industrial and biotechnological applications, like medicine [8], agriculture [9], in the pulp and paper industries [10], textiles [11], detergents [12], food processing [13], biofuels [14]; and bioremediation [15]. In addition, fungal enzymes have a more significant advantage over those derived from plants or animals due to their easy handling, rapid production at low-cost media, higher yields, and catalytic activity [16]. Although the tropics have the most remarkable diversity of fungal species, there are only a few enzymatic bioprospecting studies reported for the Mexican southeast [17–19]; Therefore, the objective of this work is to explore and evaluate qualitatively and quantitatively the types of enzymes secreted in fungi isolated from three sources (leaf litter, soil, and wood) of the humid tropical rainforest.

2.2 Materials and Methods

2.2.1. Biological sampling.

The samples were collected from three conserved tropical sites in the sierra region of the south of Mexico: Coconá (17°33'46.6"N, 92°55'31"W); Puyacatengo (17°31'34.2"N, 92°55'31"W) and La Florida biological station (17°27.8'33"N, 99°45'99"W). It is a mountainous area of tropical jungle with water bodies like rivers and streams where a humid climate prevails with rains all year round. The region registers the highest rainfall in Mexico, with an annual average between 2,214 and 3,382 mm in rainy seasons (from August to March), while there is a period of drought from April to July. The annual average temperature is between 22 and 26.8 °C.

2.2.2. Isolation of the microorganisms.

The medium for the isolates was potato dextrose agar (PDA) with chloramphenicol (15 µg/mL) to reduce bacterial growth. Soil fungi were isolated by washing and filtrating particles techniques using microsieves reported by [20]; after removing the moisture excess, five soil particles were inoculated on each plate. The sporocarps from wood debris and leaf litter collected were superficially washed with 2% sodium hypochlorite for 1 min, 70% ethanol for 1 min, and three washes were performed with sterile distilled water [21]. The sporocarps (MAF) were cut into small fragments and inoculated with a fine needle, while the leaf litter was cut into fragments of 1 cm², and five fragments were inoculated in the plate. The culture media plates were incubated at 28 °C, and periodic checks were carried out every third day for one month. Emerging cultures were transferred onto new plates with PDA until obtaining pure cultures.

2.2.3. Morphological identification.

1,250 macroscopic (MAF) and microscopic fungal (MIF) were isolated from soil, leaf litter, and decaying wood. The strains were grouped by source, morphotype, and percentage of occurrence (data not shown); later, 50 strains from each source were selected (soil, leaf litter, and decaying wood), excluding the typical morphologies of *Penicillium*, *Cladosporium*, and *Trichoderma*. Fungi were identified by macroscopic and microscopic characteristics using taxonomic keys and consulting specialized

references [22–28]. The MIF isolates from leaf litter and soil that did not show spores were inoculated in corn agar, oatmeal agar, potato carrot agar, V8 agar, humic acid agar, and leaf litter agar to promote sporulation, incubating them for six weeks under continuous black light at 28 °C [20]. All isolates were maintained in PDA slant tube and stored in 20 % glycerol at 80 °C, and mycelium plug was stored in sterile distilled water at room temperature (28-30 °C).

2.2.4. Qualitative assay in solid medium.

For the enzyme screening in the 150 selected strains, plates with minimal mineral medium (0.6 g/L NH_4NO_3 , 0.2 g/L KH_2PO_4 , 0.2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 g/L bacteriological agar) supplemented with specific substrates were used; 0.5 mM 2,2'-azino-bis 3-ethylbenthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), 0.9 mM guaiacol for laccases [29,30], 6% (v/v) olive oil, 0.2 % (v/v) Tween 80, and 0.001% rhodamine B solution, pH 7.0 for lipases [31], 1% soluble starch, pH 6.0 for amylases [32], 1% birch xylan for xylanases [33], and 1% skim milk powder for proteases [34]. All the media were sterilized for 15 min at 120 °C. An 0.5 cm² inoculum of the fungus was placed in the center of the Petri dishes and incubated at 28 °C for 15 days. All strains that showed a bluegreen oxidation halo for laccases were considered positive, as well as a clear area around the fungal growth product of the hydrolysis of starch, xylan, and casein, while an orange fluorescence halo was observed for lipase activity. All the tests were carried out in triplicate. The activity was reported as potency index (IP) measured every 24 h, as the halo diameter formed between the mycelial growth's diameter [35].

2.2.5. Basal medium for enzyme production

To evaluate laccase activity, the modified medium of Sivakumar et al., 2010 [36], was used (10 g/L fructose, 2.5 g/L malt extract, 2.5 g/L yeast extract, 1 g/L KH_2PO_4 , 0.05 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 g/L MgSO_4 , 0.01 g/L CaCl_2 , 0.001 g/L MnSO_4 , 0.001 g/L ZnSO_4 , and 0.2 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, adjusted at pH 4.8). For amylase and xylanase activity, was used 2.5 g/L yeast extract, 0.6 g/L NH_4NO_3 , 0.2 g/L KH_2PO_4 , 0.2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, supplement 10 g/L soluble starch for amylase and 10 g/L birch xylan, 5 g/L wheat bran for xylanase, both medium adjusted at pH

6.0. To evaluate protease and lipase activity the following medium was used: 2.0 g/L yeast extract, 0.02 g/L MgSO_4 , 2.0 g/L glucose, and 0.1 g/L KH_2PO_4 , supplemented with 20 g/L casein and 2% v/v olive oil, respectively

2.2.6. Enzyme production by submerged fermentation

The submerged fermentation medium for enzyme production was sterilized for 20 min at 120 °C; 100 mL of the sterile basal medium was prepared as earlier described with the appropriate carbon source in 250 mL flasks. Each fungus was grown for 2 at 7 days on PDA, and 8 mm agar plugs were then cut and transferred in flasks, keeping them in an orbital shaking at 140 rpm at 28 °C for 16 days.

For the enzymatic quantification, the protein content was measured according to the Lowry, 1951 method [37]. For this purpose, 5 mL of the supernatant were taken every second day, centrifuging at $1,487 \times g$ for 10 min, followed by filtration on Whatman filter paper number 1. The experiments were performed in triplicate for each fungal strain.

2.2.6.1. Quantitative assay Lacasse activity

Laccase (lignin peroxidase) activity was determined by oxidation of the ABTS. The reaction mixture contained 0.5 mM ABTS, 0.1 M sodium acetate buffer (pH 4.5), and 100 μL of supernatant. Substrate oxidation was monitored by increasing absorbance at 420 nm ($\epsilon_{420} = 3.6 \times 10^4 \text{ M cm}^{-1}$) for 5 min. The enzymatic activity was expressed as $U = 1 \mu\text{mol}$ of ABTS oxidized per-min at 25 °C [29].

2.2.6.2. Quantitative assay Amylase activity

Amylase activity was determined with the DNS method (3,5-dinitrosalicylic acid) [37] by quantifying the reducing sugars released during the assays using 1% soluble starch as substrate dissolved in 0.1 M sodium citrate buffer, at pH 5.6. The reaction mixture comprised 0.5 mL of the enzyme supernatant and 0.5 mL of pH buffer followed by incubation in a water bath at 40 °C for 30 min. The reaction was stopped with 2 mL of the DNS reagent followed by heating to 100 °C for 5 min. Optimum density was read at 540 nm against a blank without the enzyme, and a glucose standard curve (1 mg/mL) was performed under the same assay conditions.

Amylase activity was expressed in U/mL defined as the amount of enzyme that releases 1 μ mol of reducing sugar equivalent to glucose per-mL in one minute [38].

2.2.6.3. Quantitative assay Xylanase activity

The assays were carried out in triplicate. Xylanase activity was evaluated by the DNS method [37] to quantify the reducing sugars formed during the hydrolysis of the endo-1,4 β -D bonds of the xylan skeleton. The reaction mixture comprised 0.5 mL of the enzyme supernatant in 0.05 M of sodium acetate buffer, pH 5.3, and 0.5 mL of 1% of birch xylan followed by incubation at 40 °C for 30 min. The reaction was stopped by adding 2 mL of the DNS reagent; then, samples were heated at 80 °C for 5 min, then the absorbance was read at 540 nm. A xylose standard curve (1 mg/mL) was performed under the same test conditions. Xylanase activity was expressed as the amount of enzyme that releases 1 μ mol equivalent of xylose per-mL in one minute [39].

2.2.6.4. Quantitative assay Protease activity

Protease activity was quantified using the technique proposed by Cupp-Enyard et al., 2008 [40]. For this test, 0.65% of a casein solution was prepared in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5, 5 mL of the solution were added in test tubes and incubated in a water bath at 37 °C for 5 min. After incubation, 1 mL of the enzyme supernatant was added to the test tubes and vortexed for 10 min. The same procedure was carried out for the blank without the supernatant. The reaction was stopped with 5 mL of 110 mM trichloroacetic acid. Afterward, the samples were filtered, and 2 mL of the filtrate was added to 5 mL of 500 mM sodium carbonate and 1 mL of the 0.5 mM Folin's reagent; all this was mixed perfectly and incubated at room temperature in the dark for 30 min. The absorbance was measured at 660 nm, and a tyrosine standard curve (0.2 mg/mL) was developed under the same assay conditions. One unit of protease was defined as the amount of enzyme that releases 1 μ mol of tyrosine per minute under these conditions [34].

2.2.6.5. Quantitative assay Lipase activity

Lipase activity was quantified using p-nitrophenyl palmitate (p-NPP) as substrate, dissolved in 10% isopropanol (10 mL) and mixed with 50 mM potassium phosphate

buffer (90 mL) at pH 8.0, 207 mg of sodium deoxycholate, and 100 mg of gum arabic for a final concentration of 790 μ M of the p-NPP substrate solution, finally, 50 μ L of Triton X-100 were added for clarification. For the test, 2.4 mL of the substrate solution were incubated with 0.1 mL of the enzyme supernatant at 37 °C for 15 min. The samples were measured in a spectrophotometer at 410 nm with a standard curve for p-nitrophenol (30 μ g/ml). The enzymatic activity was expressed as U = 1 μ mol of p-nitrophenol released per-mL in for minute [41,42]. Total protein concentration was determined using the method of [43] with a calibration curve at a concentration of 1 mg/mL with bovine serum albumin as a protein standard with a linear response ($r^2 = 0.997$).

2.2.7. Statistical analysis.

Enzyme quantification results were analyzed with multiple comparisons of means, performing a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by a Tukey test. In the analyzes, a significance of $\alpha = 0.05$ was considered with the statistical package Sta-graphics 7.

2.3 Results

From the 1,250 fungi isolates of the humid tropical rainforest in Mexico, 150 (50 from soil, 50 from leaf litter, and 50 from sporocarps of wood) were selected and evaluated to determine their enzymatic potential. Regarding the taxonomic analysis, of the 51 active strains, five were identified at the species level, 32 at the genus level, four at the family level, and ten as *Mycelia sterilia*. The composition of the fungal strains selected for each source was first analyzed, finding *Auricularia*, *Trametes*, *Neonothopanus*, *Hexagonia*, *Marasmius*, *Marasmiellus*, *Daedalea*, *Panus*, *Rigidoporus* genera, and two Basidio-mycetes and one Ascomycete on fruiting bodies from decaying tree trunks. Regarding the leaf litter isolates, we identified *Acremonium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Nodulisporium*, *Drechslera*, *Monodictys* genera, a member of the *Xylariaceae* family, and eight *Mycelia sterilia*. In contrast, from the soil, *Acremonium*, *Cylindrocarpon*, *Graphium*, *Gliomastix*, *Paecilomyces* genera, a *Xylariaceae*, two *Mycelia sterilia*, besides *Aspergillus* and *Fusarium* genera were found (Table 1).

From the 150 strains evaluated, 51 fungal strains (13 from wood, 20 from leaf litter, and 18 from the soil) showed positive results in the qualitative plate method evidencing the presence of extracellular enzyme oxidoreductases (laccases), and hydrolases (amylase, lipase, proteases, and xylanases). A close relationship between the enzymatic activity and the isolation source was observed; 8% of the evaluated strains showed laccase activity, all isolated from wood and leaf litter. For hydrolytic enzymes, 4.6% expressed amylase activity (leaf litter and soil), while 9.3% of the strains evaluated showed lipase activity, 12% for proteases, and 7.2% for xylanases of the three sources (Table 1 and Figure 1). The collection sites were not significantly different ($p < 0.05$) regarding the number of strains and enzymatic activity of the fungi isolated on the three sources evaluated.

Table 2.1. Enzymatic capability on agar plate assay of strains positive fungal isolates from Sierra of Tabasco, México.

Sampling site	Source	Fungi	Potency index (PI)				
			Laccase	Protease	Amylase	Xylanase	Lipase
Cocona	Wood	Basidiomycete CE10		2.3			
Cocona	Wood	<i>Marasmius</i> sp. CE25*	1.7				2.3
Cocona	Wood	Basidiomycete CE34		3.0			
La florida	Wood	<i>Auricularia</i> sp. FE15					2.5
La florida	Wood	<i>Neonothopanus</i> sp. FE33*	1.2			1.6	
La florida	Wood	<i>Trametes villosa</i> FE35*	2.3				2.1
La florida	Wood	<i>Hexagonia</i> sp. FE40		2.0			
La florida	Wood	<i>Marasmiellus</i> sp. FE46	1.8				
La florida	Wood	<i>Rigidoporus</i> sp. FE55*	1.9			1.8	
Puyacatengo	Wood	Ascomycete PE37	1.8				
Puyacatengo	Wood	<i>Marasmius</i> sp. PE38					2.2
Puyacatengo	Wood	<i>Panus</i> sp. PE43	2.1				
Puyacatengo	Wood	<i>Daedalea flavida</i> PE47*	2.2	2.4			2.2
Cocona	Leaf litter	<i>Mycelia sterilia</i> CH464	1.6				
Cocona	Leaf litter	<i>Xylariaceae</i> sp. CH240	1.4				
Cocona	Leaf litter	<i>Mycelia sterilia</i> CH546		2.2			
Cocona	Leaf litter	<i>Monodictys</i> sp. CH616		2.6			
Cocona	Leaf litter	<i>Mycelia sterilia</i> CH630		2.3			
Cocona	Leaf litter	<i>Mycelia sterilia</i> CH631		2.1			
Cocona	Leaf litter	<i>Aspergillus</i> sp. CH665				3.5	
Cocona	Leaf litter	<i>Drechslera</i> sp. CH681	1.8				
Cocona	Leaf litter	<i>Aspergillus</i> sp. CH693*			2.5		2.3
La florida	Leaf litter	<i>Mycelia sterilia</i> FH175			2.4		
La florida	Leaf litter	<i>Mycelia sterilia</i> FH321		2.3			
La florida	Leaf litter	<i>Mycelia sterilia</i> FH338			2.2		
La florida	Leaf litter	<i>Fusarium</i> sp. FH676					2.3
La florida	Leaf litter	<i>Fusarium</i> sp. FH702				3.2	
Puyacatengo	Leaf litter	<i>Fusarium</i> sp. PH20		2.2			
Puyacatengo	Leaf litter	<i>Fusarium</i> sp. PH79*			1.9	1.8	
Puyacatengo	Leaf litter	<i>Xylariaceae</i> PH208*			1.9	1.9	
Puyacatengo	Leaf litter	<i>Nodulisporium</i> sp. PH223	1.4				
Puyacatengo	Leaf litter	<i>Nodulisporium</i> sp. PH225			1.8		
Puyacatengo	Leaf litter	<i>Mycelia sterilia</i> PH706				2.6	
Cocona	Soil	<i>Acremonium</i> sp. CS330				1.2	
Cocona	Soil	<i>Xylariaceae</i> CS708				1.4	
Cocona	Soil	<i>Aspergillus</i> sp. CS1022					2.1
Cocona	Soil	<i>Fusarium</i> sp. CS1053		2.2			
La florida	Soil	<i>Fusarium</i> sp. FS400*		3			2.1
La florida	Soil	<i>Paecilomyces</i> sp. FS446		2.3			
La florida	Soil	<i>Cylindrocarpon</i> sp. FS457				1.6	
La florida	Soil	<i>Paecilomyces</i> sp. FS470		2.1			
La florida	Soil	<i>Fusarium</i> sp. FS720*			2.5	1.7	
La florida	Soil	<i>Graphium</i> sp. FS835					2.3
La florida	Soil	<i>Fusarium</i> sp. FS903					2.2
La florida	Soil	<i>Mycelia sterilia</i> FS907					2.2
La florida	Soil	<i>Mycelia sterilia</i> FS943					2.3
Puyacatengo	Soil	<i>Acremonium</i> sp. PS595		2.8			
Puyacatengo	Soil	<i>Aspergillus</i> sp. PS948		2.7			

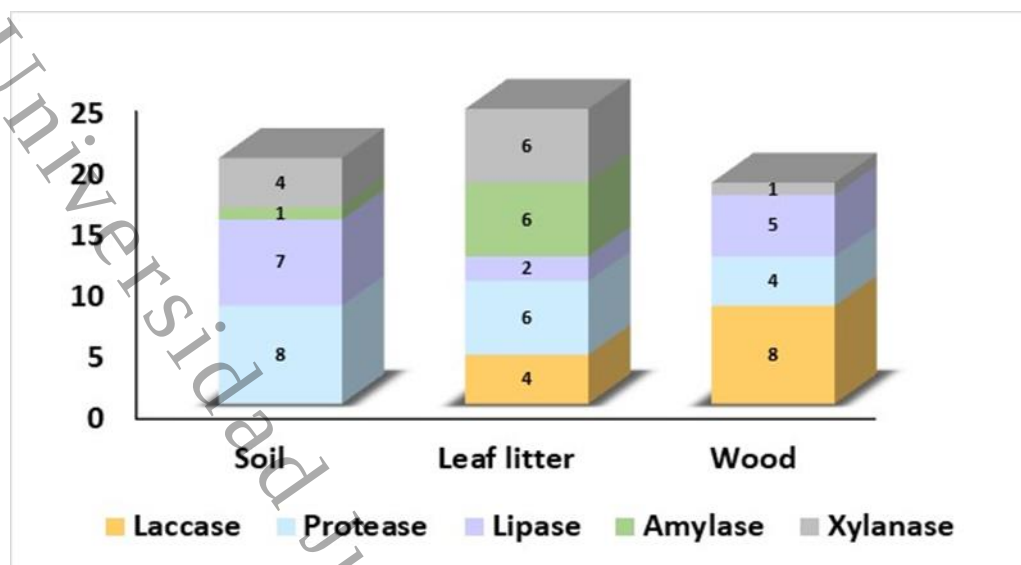


Figure 2.1. Number of fungal strains isolated from different sources and their relationship with enzyme production.

2.3.1 Qualitative plate test.

The laccase enzymatic activity was detected by the oxidation of the ABTS (blue green halo) and guaiacol (brown halo) around the colony, mainly of fungi known as lignin degraders or white rot (Fig. 2.2 A-B), the strains with the highest activity were *Trametes villosa* FE35, *Daedalea flavida* PE47 *Panus sp.* PE43, *Rigidoporus sp.* FE55, and *Marasmius sp.* (CE25), with enzymatic potency index (PI) of 2.3, 2.2, 2.1, 1.9, and 1.7, respectively, recovered from wood (Table 1). Protease activity was evident with a clear zone (substrate hydrolyzed) around the colony (Fig. 2.2 C) in isolated strains of wood, Basidiomycete CE34 (3.0), CE10 (2.3), and *Daedalea flavida* PE47 (2.4) and recovered from leaves *Monodictys sp.* CH616 (2.6). The best activity was registered for the recovered fungi of soil like Ascomycete PS1130 (3.2), *Fusarium spp.* FS400 (3.0), *Acremonium sp.* PS595 (2.8), *Aspergillus sp.* PS948 (2.7), *Gliomastix sp.* PS1298 (2.4) and *Paecilomyces sp.* FS446 (2.3).

Regarding the detection of amylase, positive results were visualized after adding an iodine solution (0.3% iodine, 0.6% potassium iodide) that caused a clear zone around the colonies because of the hydrolysis of starch (Fig. 2.2 D). The amylase activity was not detected for strains recovered from wood. In isolated strains of leaf litter (PI), they stand out *Aspergillus sp.* CH693 (2.5), the *Mycelia sterilia* FH175 (2.4)

and FH338 (2.2), *Nodulisporium* sp. PH225 (1.8), *Fusarium* sp. PH79 (1.9) and *Xylariaceae* PH208 (1.9), while in the soil, only *Fusarium* sp. FS720 (2.5). In xylanases, the visualization was by adding a Congo red solution (0.4%) that stains the plates red, observing a lighter area around the colonies that indicate the presence of xylanase activity (Fig. 2.2 E). The activity was recorded in the three sources, in leaf litter was observed for *Aspergillus* sp. CH665 (3.5), *Fusarium* spp. FH702 (3.2) and PH79 (1.8), sterile mycelium PH706 (2.6), *Xylariaceae* PH208 (1.9), in wood *Rigidoporus* sp. FE55 (1.8) and *Neonothopanus* sp. FE33 (1.6), and soil *Fusarium* sp. FS720 (1.7), *Cylindrocarpon* sp. FS45 (1.6), *Xylariaceae* CS708 (1.4) and *Acremonium* sp. CS330 (1.2), (Table 1).

Regarding lipase activity, the positive strains were determined by forming an orange, fluorescent halo around the colonies visible under UV light at 350 nm, a product of the interaction of rhodamine B with the fatty acids released during the enzymatic hydrolysis of the triacylglycerols (Fig. 2.2 F). The lipases were positive for the fungi isolated from the three sources: in the soil, *Graphium* spp. FS835 (2.3) and PS1143 (2.2), two *Mycelia sterilia* FS943 (2.3) and FS907 (2.2), *Fusarium* spp. FS903 (2.2) and FS400 (2.1), *Aspergillus* sp. CS1022 (2.2); in leaf litter to *Aspergillus* sp. CH693 (2.3) and *Fusarium* sp. FH676 (2.3); and wood were *Auricularia* sp. FE15 (2.5), *Marasmius* spp. CE25 (2,3) and PE38 (2,2), *Daedalea flavida* PE47 (2,2) and *Trametes villosa* FE35 (2,1), (Table 1).

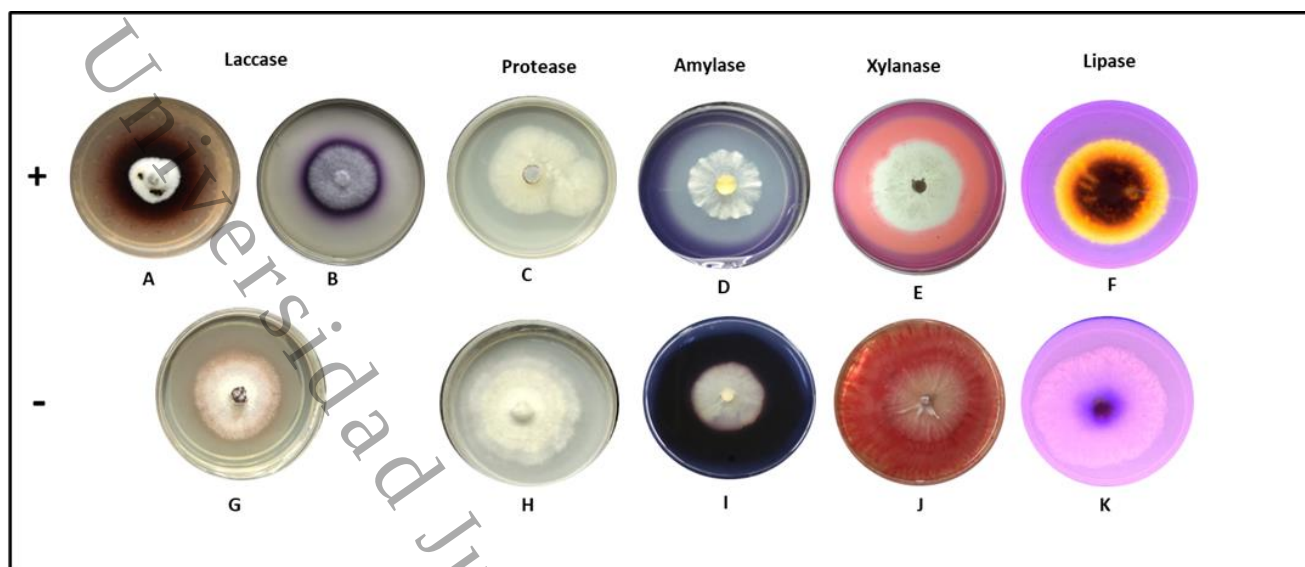


Figure 2.2 Qualitative enzymatic plate assay on solid medium with visible enzymatic activity (A, B, C, D, E, F) and without activity (G, H, I, J, K).

2.3.2 Enzymatic activity quantification.

In a second test, the enzyme expression was quantified by liquid fermentation of the 10 fungi that showed the highest PI and more than one enzyme in the qualitative tests. These were *Marasmius* sp. CE25, *Neonothopanus* sp. FE33, *Trametes villosa* FE35, *Daedalea flavida* PE47, *Aspergillus* sp. CH693, *Rigidoporus* sp. FH55, *Xylariaceae* PH208, and three *Fusarium* spp. FH79, FS400, and FS720. Enzymatic quantification of blue multicopper oxygen oxidoreductases was performed for the wood isolates of *Trametes villosa* FE35, *Daedalea flavida* PE47, *Marasmius* sp. CE25, *Neonothopanus* sp. FE33, and *Rigidoporus* sp. FH55. The results of this quantification show that these fungi reach maximum activity between 14 and 16 days of culture except for *Rigidoporus* sp. FH55, which was 8 days later. The highest activity was for *Trametes villosa* FE35 with 1,179 U/mg (82.78 U/mL), followed by *Rigidoporus* sp. FH55. with 1,044 U/mg (73.06 U/mL), *Marasmius* sp. EC25 with 326.28 U/mg (78.25 U/mL), *Daedalea flavida* PE47 with 521.8 U/mg (48.0 U/mL), and finally *Neonothopanus* sp. FE33 with 161.38 U/mg (12.49 U/mL). Laccase activity reported in this work for *Daedalea flavida* PE47 was on day 16. However, this time was not enough to record its maximum activity; since it was observed that in subsequent days, it kept increasing (Fig. 2.3A).

The hydrolysis of casein during the quantification of proteases showed a maximum expression point after four days of culture of *Daedalea flavida* PE47 with 80.67 U/mg (47.24 U/mL) followed by *Fusarium* sp. FS400 with 160.61 U/mg (88.33 U/mL) after ten days of culture (Fig. 2.3 B). For amylases, only two strains of *Fusarium* sp. (PH79 and FS720) from leaf litter and soil, respectively, showed amylase activity after 10 days of culture with 14 U/mg (0.998 U/mL) and 40 U/mg (2.27 U/mL). Regarding *Aspergillus* sp. CH693 and *Xylariaceae* PH208, under the culture conditions, these strains did not show amylase enzyme activity (Fig. 2.3 C).

Xylanase activity was detected in fungi isolated of the three sources, showing the maximum activities at 4 and 6 days of culture using *Fusarium* sp. PH79 with 49.23 U/mg (4.41 U/mL) and *Fusarium* sp. FS720 with 36.06 U/mg (3.44 U/mL), followed by *Rigidoporus* sp. FH55 with 24.38 U/mg (216 U/mL) and *Xylariaceae* PH208 with 20.11 U/mg (2.36 U/mL); only *Neonothopanus* sp. FE33 showed two peaks at 8 and 12 days of culture with 18.82 U/mg (1.88 U/mL) and 19.21 U/mg (1.94 U/mL), respectively (Fig. 2.3 D) Regarding lipases, the five strains evaluated *Aspergillus* sp. CH693 with 0.018 U/mg (0.017 U/mL), *Daedalea flavida* PE47 with 0.014 U/mg (0.010 U/mL), *Fusarium* sp. FS400 with 0.045 U/mg (0.015 U/mL), *Marasmius* sp. EC25 with 0.040 U/mg (0.042 U/mL) and *Trametes villosa* FE35 with 0.039 U/mg (0.014 U/mL) showed very low concentrations of lipases during the first ten days of culture, however the activity was lost totally in later days (Fig. 2.3 E).

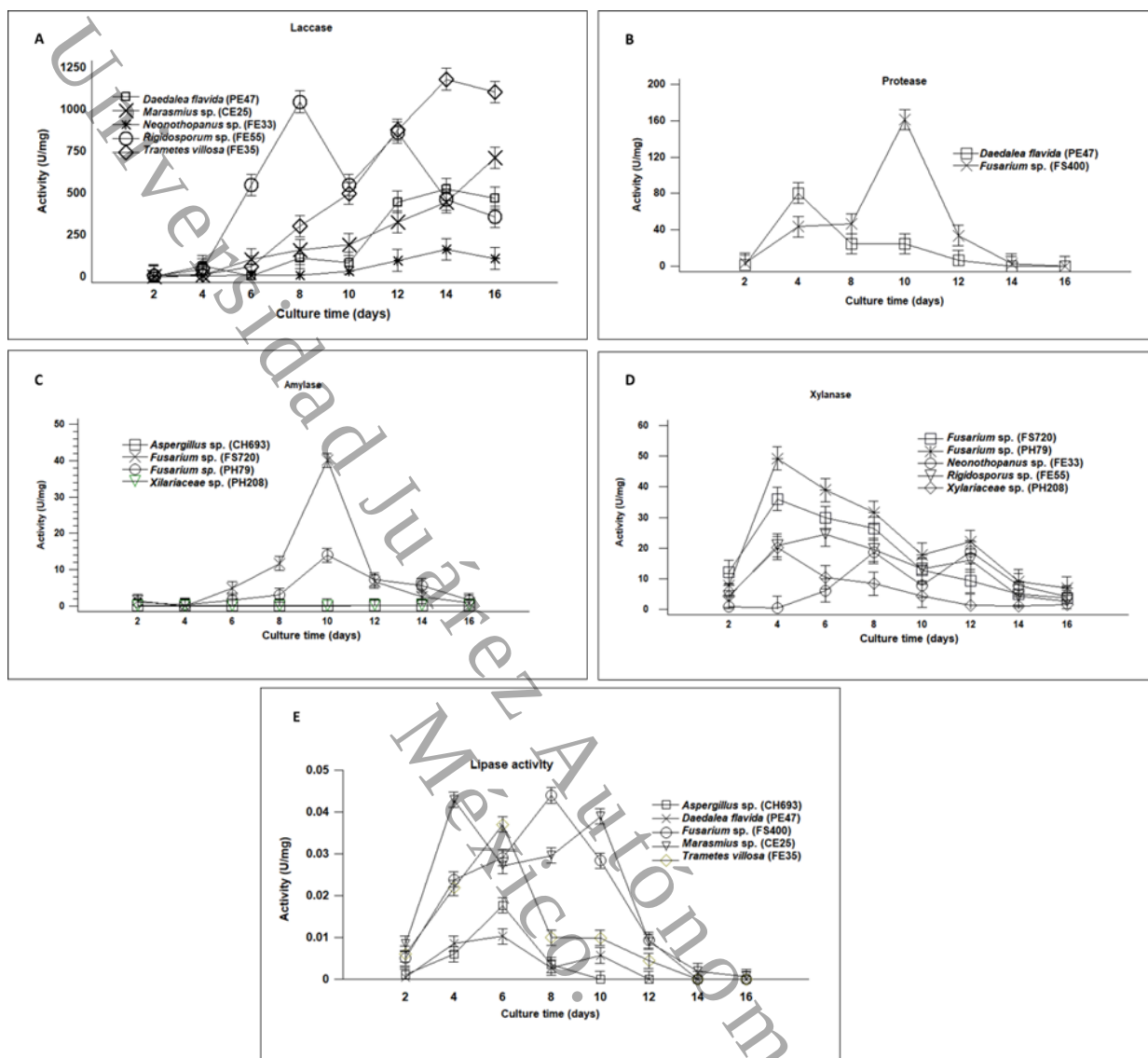


Figure 2.3 Enzymatic activity quantification of the ten selected fungi expressed as U/mg: (A) Laccase (B) Protease (C) Amylase (D) Xylanase, and (E) Lipase.

2.4. Discussion

The bioprospecting of fungal organisms isolated from tropical environments continues to be a topic of great interest in the ecological field such as bioremediation and biological control, in biotechnological processes such as biofertilizers, biofuels, as well as industrial in food processing, detergent industry, textile, pharmaceutical, among other. This shows the importance of understanding and identifying the functioning of fungal biodiversity in these little explored environments to preserve, take advantage of and exploit these compounds [8].

The peculiarity of the humid tropics greatly influences the development and physiology of the fungal species that live there, which is reflected in the catalytic properties of their extracellular enzymes to degrade the sources that they colonize. This catalytic effect was observed in qualitative tests on agar through a dark blue halo from the first day of culture around the colonies of fungi with oxidoreductase activity; a similar effect was observed in strains with a hydrolytic activity where a product halo of the hydrolysis was detected from the fourth day of culture. The potency index was recorded; it represents the potential of the halo produced by the strain through the qualitative estimation that is not precisely related to the quantification of the enzyme expressed for the fungus [18,35].

In qualitative tests, substrates and solid media can rule out false positives for enzyme production. In the case of laccase, guaiacol (0.9 mM) was first used, a substrate frequently used to evaluate laccase-producing ligninolytic fungi [30,44]. However, the affinity constants and the number of rotation of laccases towards guaiacol are low, which can be confused with other oxidases. Therefore, the activity was confirmed with a second test using the ABTS (0.5 mM), a fluorogenic substrate that acts as a multicopper blue oxidase mediator [44,45], excluding isolates that do not produce laccase. A clear example was *Neonothopanus* sp. FE33 that in the guaiacol test showed a halo of PI 4.6 (data not shown), while in the test with ABTS, the halo was 1.2 (Table 1). Regarding the hydrolytic enzymes, the culture media were the key to detecting the presence or absence of the enzyme using only minimal

mineral medium and supplemented with the respective substrate as carbon source, limiting the feeding of the fungi in the culture medium [46].

The results show that the laccase activity by fungi depends on the substrate where they are isolated, since the close relationship between sources with high lignin content such as wood and laccase production has been documented [51]. Laccase activity results were mainly from white rot fungi isolated from wood and leaf; This is due to the fact that lignolytic basidiomycetes have a unique and non-specific enzyme system that allows them to efficiently mineralize lignin, which is one of the compounds of plant material structurally constituted by phenolic hydroxyl groups where laccase exerts its action through enzymes. Lignolytic extracellular cells to be able to reach the cellulose and hemicellulose from where they obtain their energy source, and which is widely documented in several enzymatic bioprospecting works [47–49].

The secretion of several enzymes by the same fungus was key for the quantitative evaluation phase, i.e., in the case of *Neonothopanus* sp. FE33 that showed activity for laccase and xylanase was selected instead of *Panus* sp., which only presented a higher PI for laccase activity (Table 1), even though strains related to the *Panus* genus have been reported to be a good producer of laccase complex enzymes [49–51]. Although *Trametes villosa* FE35, *Daedalea flavida* PE47, *Marasmius* sp. CE25 and *Rigidoporus* sp. FH55 collected of wood produce more than one enzyme, in addition to the large number of laccase isoenzymes that some ligninolytic species can express [52]. On the other hand, the laccase activity presented by *Trametes villosa* (1179 U/mg) is similar to other works reported for tropical environments [52,53]. However, this laccase activity can be improved by adding Cu^{2+} to the culture medium as an inducer [54,55] and/or changing the carbon source [56,57]. Initially, in the quantitative analysis, low laccase activity was obtained, which improved by adding CuSO_4 -0.2 mM; the addition of fructose to the culture medium instead of glucose increased the size and texture of the pellets, the amount of biomass, and the specific activity of the enzyme (data not shown). Possibly a higher N-glycosylation of proteins with fructose oligosaccharides may give the enzyme

structure greater stability and protection against degradation caused by proteases during liquid fermentation [59].

It is well understood that macroscopic fungi also produce extracellular hydrolytic enzymes [58,59]. *Daedalea flavida* PE47, besides secreting laccases, also produces proteases, finding that only Souza et al. [60] have reported the expression of proteases by a strain of the genus *Daedalea*. Interestingly, these enzymes are economically important in the detergent industry [61], and food processing [62]. Nevertheless, subsequent assays are necessary for *Daedalea flavida* PE47 to optimize and increase protease production due to its rapid growth in a liquid medium and longer stability time, similar to the expression of proteases by microfungi [16], which are more efficient in producing extracellular enzymes due to their ease of cultivation, manipulation, growth, stability, and high productivity at low cost [16,63]. As observed with the strain of *Fusarium* sp. (FS400) isolated from soil, in addition to presenting greater protease activity than *Daedalea flavida* PE47, it exceeded the values found by other authors for species of the same genus [66,67]. On the other hand, it has been shown that a low pH (4.8 to 6) and low nitrogen availability in tropical soils can promote the presence of proteases [68,69].

The production of xylanases in macroscopic fungi is related to sources rich in xylan, the main component of hemicellulose in leaves and wood [70]. In this case, the isolated strains of wood, *Rigidoporus* sp. FS55 (24.38 U/mg) and *Neonothopanus* sp. FE33 (18.82 U/mg) showed higher xylanase expression. whereas *Fusarium* strains PH79 (49.23 U/mg) from leaf litter and FS720 (36.06 U/mg) from soil presented the highest amylase activity, even with values higher than those reported in other studies [71,72]. The species of the genus *Fusarium* are strongly associated as phytopathogens; since their extracellular enzymatic action, they infect the leaves and fruits of plants [64,65]. Although, the amylase activity evaluated in this work is lower compared to other studies [66,67]. The importance of amylases and xylanases in agricultural residues' saccharification and fermentation processes to obtain bioethanol and their potential in the food industry is relevant. Therefore, optimization is necessary for a greater expression of the enzyme [68,69]. •

In the qualitative phase of lipase evaluation, fungi *Marasmius* sp. CE25, *Trametes villosa* FE35, *Daedalea flavidia* PE47, *Aspergillus* sp. CH693, *Fusarium* sp. FS400 showed a high PI to be considered in the quantitative phase. However, under the experimental conditions, no lipase activity was detected. False positives could cause this due to the interaction with Rhodamine B and the presence of cutinases. The cutinases are members of the α/β hydrolase family, capable of hydrolyzing fatty acid esters and emulsified triacylglycerols with the same efficiency as lipases since both share structural and catalytic similarities [70,71]. Cutinases can be secreted mainly by phytopathogenic fungi from the genera *Fusarium*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Colletotrichum*, and sometimes by basidiomycetes [72]; they feed on the cuticle a rigid wall of plants that provides protection, rich in fatty acids of 16 and 18 carbons linked together by ester bonds [73].

2.5. Conclusions

The abundant vegetation and climatic conditions that predominate in tropical rainforests make possible the development of fungi with particular characteristics like the catalytic properties and stability of their extracellular enzymes, which are essential for future biotechnological applications. The enzymatic assays revealed that onethird of the 150 fungi selected for this study show some types of enzymatic activity. Isolated wood fungi *Trametes villosa* FE35, *Marasmius* sp. CE25, and *Daedalea flavidia* PE47 showed high laccase activity. While for protease activity was recorded by *Fusarium* sp. FS400 isolated from soil followed by *Daedalea flavidia* PE47 with moderate activity, while two other strains of *Fusarium* sp. PH79 and FS720 from leaf litter and soil obtained the highest yields for amylase and xylanase. There is no doubt that the isolating sources of the strains greatly influence finding the given types of enzymes; such is the case that none of the fungi evaluated in the quantitative phase presented lipase activity. This work represents the first comprehensive study of lignocellulosic fungi with enzymatic potential from the Mexican humid tropics.

2.6 References

1. Mittermeier, R.A.; Myers, N.; Tliomsen, J.B.; Olivieri, S. Biodiversity hotspots and major tropical wilderness areas: Approaches to setting conservation priorities. *Conserv. Biol.* 1998, 12, 516–520.
2. Martínez-Meyer, E.; Sosa-Escalante, J.E.; Álvarez, F. El estudio de la biodiversidad en México: ¿una ruta con dirección? *Rev. Mex. Biodivers.* 2014, 85, 1–9, doi:10.7550/rmb.43248.
3. Guzmán, G. Inventorying the fungi of Mexico. *Biodivers. Conserv.* 1998, 7, 369–384, doi:10.1023/A:1008833829473.
4. Godliving Mtui, Y.S. Lignocellulolytic enzymes from tropical fungi: Types, substrates and applications. *Sci. Res. Essays* 2012, 7, 1544–1555, doi:10.5897/sre11.1812.
5. Hawksworth, D.L.; Lücking, R. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *The Fungal Kingdom 2017*, 79–95, doi: 10.1128/microbiolspec.funk-0052-2016.
6. Wrzosek, M.; Ruszkiewicz-Michalska, M.; Sikora, K.; Damszel, M.; Sierota, Z. The plasticity of fungal interactions. *Mycol. Prog.* 2017, 16, 101–108.
7. Zucconi, L.; Canini, F.; Temporiti, M.E.; Tosi, S. Extracellular enzymes and bioactive compounds from antarctic terrestrial fungi for bioprospecting. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2020, 17, 1–31.
8. Hyde, K.D.; Xu, J.; Rapior, S.; Jeewon, R.; Lumyong, S.; Niego, A.G.T.; Abeywickrama, P.D.; Aluthmuhandiram, J.V.S.; Brahamanage, R.S.; Brooks, S.; et al. The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. *Fungal Divers.* 2019 971 2019, 97, 1–136, doi:10.1007/S13225-019-00430-9.
9. El-Sawah, A.M.; El-Keblawy, A.; Ali, D.F.I.; Ibrahim, H.M.; El-Sheikh, M.A.; Sharma, A.; Hamoud, Y.A.; Shaghaleh, H.; Brestic, M.; Skalicky, M.; et al. Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Enhance Soil Key Enzymes, Plant Growth, Seed Yield, and Qualitative Attributes of Guar. *Agric.* 2021, Vol. 11, Page 194 2021, 11, 194, doi:10.3390/AGRICULTURE11030194.
10. Meyer, V.; Basenko, E.Y.; Benz, J.P.; Braus, G.H.; Caddick, M.X.; Csukai, M.; de Vries, R.P.; Endy, D.; Frisvad, J.C.; Gunde-Cimerman, N.; et al. Growing a circular economy with fungal biotechnology: a white paper. *Fungal Biol. Biotechnol.* 2020 71 2020, 7, 1–23, doi:10.1186/S40694-020-00095-Z.
11. Chang, Y.; Yang, D.; Li, R.; Wang, T.; Zhu, Y. Textile Dye Biodecolorization by Manganese Peroxidase: A Review. *Mol.* 2021, Vol. 26, Page 4403 2021, 26, 4403, doi:10.3390/MOLECULES26154403.
12. Niyonzima, F.N. Detergent-compatible fungal cellulases. *Folia Microbiol. (Praha)*. 2021, 66, 25–40.

13. Sudeep, K.C.; Upadhyaya, J.; Joshi, D.R.; Lekhak, B.; Chaudhary, D.K.; Pant, B.R.; Bajgai, T.R.; Dhital, R.; Khanal, S.; Koirala, N.; et al. Production, characterization, and industrial application of pectinase enzyme isolated from fungal strains. *Fermentation* 2020, 6, 59, doi:10.3390/FERMENTATION6020059.
14. Troiano, D.; Orsat, V.; Dumont, M.J. Status of filamentous fungi in integrated biorefineries. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2020, 117, 109472, doi: 10.1016/J.RSER.2019.109472.
15. Singh, A.K.; Bilal, M.; Iqbal, H.M.N.; Meyer, A.S.; Raj, A. Bioremediation of lignin derivatives and phenolics in wastewater with lignin modifying enzymes: Status, opportunities and challenges. *Sci. Total, Environ.* 2021, 777, 145988, doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2021.145988.
16. Beneyton, T.; Wijaya, I.P.M.; Postros, P.; Najah, M.; Leblond, P.; Couvent, A.; Mayot, E.; Griffiths, A.D.; Drevelle, A. High-throughput screening of filamentous fungi using nanoliter-range droplet-based microfluidics. *Sci. Rep.* 2016, 6, 1–10, doi:10.1038/srep27223.
17. Tapia-Tussell, R.; Daisy, P. rez B.; Rafael, R.H.; Alberto, C.V.; Gerardo, R.M. oz; Sara, S.P. New laccase-producing fungi isolates with biotechnological potential in dye decolorization. *African J. Biotechnol.* 2011, 10, 10134–10142, doi:10.5897/ajb11.331.
18. Chan Cupul, W.; Heredia Abarca, G.P.; Rodríguez Vázquez, R. Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática ligninolítica de macromicetos del estado de Veracruz, México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 2016, 32, 339–351, doi:10.20937/RICA.2016.32.03.08.
19. Sánchez-Corzo, L.D.; Álvarez-Gutiérrez, P.E.; Meza-Gordillo, R.; Villalobos-Maldonado, J.J.; Enciso-Pinto, S.; Enciso-Sáenz, S. Lignocellulolytic Enzyme Production from Wood Rot Fungi Collected in Chiapas, Mexico, and Their Growth on Lignocellulosic Material. *J. Fungi* 2021, Vol. 7, Page 450 2021, 7, 450, doi:10.3390/JOF7060450.
20. Mueller, G.M.; Bills, G.F.; Foster, M.S. Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods; Academic, P., Ed.; Elsevier Inc.: Burlington, MA., 2004; ISBN 9780080470269.
21. Chaparro, D.F.; Rosas, D.C.; Varela, A. Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática de hongos descomponedores de madera (Quindío, Colombia). *Rev. Iberoam. Micol.* 2009, 26, 238–243, doi: 10.1016/j.riam.2009.03.005.
22. Ellis, M.B. Dematiaceous Hyphomycetes.; Institute, Kew, Commonwealth Mycological: Surrey, England, 1971.
23. Phillips, R. Mushrooms & other Fungi of Great Britain & Europe; 1 ed.; 1981; ISBN 0 330 26441 9.

24. Largent D. L.; Stutzn D.E. How to identify mushrooms to genus; Eureka, C., Ed.; Mad River Press: USA, 1986; ISBN 9780916422004.
25. Ryvarden, L. Genera of polypores : nomenclature and taxonomy; Synopsis fungorum; Lubrecht & Cramer: UK, 1991.
26. Alexopoulos, C.J.; Mims, C.W.; Blackwell, M. Introductory mycology.; wiley: India, 1996.
27. Domsch K.L., Walter Gams, T.-H.A. Compendium of Soil Fungi.; Gams, W., Ed.; 2 nd.; IHW- Verlag: Eching, Germany., 2007.
28. Seifert, K.A.; Gams, W. The genera of Hyphomycetes - 2011 update. Persoonia Mol. Phylogeny Evol. Fungi 2011, 27, 119–129, doi:10.3767/003158511X617435.
29. Sunil, S.M.; Renuka, P.S.; Pruthvi, K.; Swetha, M.; Malini, S.; Veena, S.M. Isolation, purification, and characterization of fungal laccase from *Pleurotus* sp. Enzyme Res. 2011, 2011, 1–8, doi:10.4061/2011/248735.
30. Mandic, M.; Djokic, L.; Nikolaivits, E.; Prodanovic, R.; O'Connor, K.; Jeremic, S.; Topakas, E.; Nikodinovic-Runic, J. Identification and Characterization of New Laccase Biocatalysts from *Pseudomonas* Species Suitable for Degradation of Synthetic Textile Dyes. Catalysts 2019, 9, 629, doi:10.3390/catal9070629.
31. Willerding, A.L.; Oliveira, L.A. De; Moreira, F.W.; Germano, M.G.; Chagas, A.F. Lipase activity among bacteria isolated from amazonian soils. Enzyme Res. 2011, 2011, doi:10.4061/2011/720194.
32. Gopinath, S.C.B.; Anbu, P.; Hilda, A. Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. Mycoscience 2005, 46, 119–126, doi:10.1007/s10267-004-0221-9.
33. Abdel-Sater, M.A.; El-Said, A.H.M. Xylan-decomposing fungi and xylanolytic activity in agricultural and industrial wastes. Int. Biodeterior. Biodegradation 2001, 47, 15–21, doi: [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(00\)00113-X](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(00)00113-X).
34. Kumar, A.; Sharma, V.; Saxena, J.; Yadav, B.; Alam, A.; Prakash, A. Isolation and Screening of Extracellular Protease Enzyme from Bacterial and Fungal Isolates of Soil. Int. J. Sci. Res. Environ. Sci. 2015, 3, 334–340, doi:10.12983/ijres-2015-p0334-0340.
35. Cruz Ramírez, M.G.; Rivera-Ríos, J.M.; Téllez-Jurado, A.; Maqueda Gálvez, A.P.; Mercado-Flores, Y.; Arana-Cuenca, A. Screening for thermotolerant ligninolytic fungi with laccase, lipase, and protease activity isolated in Mexico. J. Environ. Manage. 2012, 95, S256–S259, doi: 10.1016/j.jenvman.2010.10.045.
36. Sivakumar, R. Isolation, Screening and Optimization of Production Medium for Thermostable Laccase Production from *Ganoderma* sp. Int. J. Eng. Sci. Technol. 2010, 2, 7133–7141.

37. Miller, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* 1959, 31, 426–428, doi:10.1021/ac60147a030.
38. Singh, S.; Singh, S.; Bali, V.; Sharma, L.; Mangla, J. Production of fungal amylases using cheap, readily available agriresidues, for potential application in textile industry. *Biomed Res. Int.* 2014, 2014, doi:10.1155/2014/215748.
39. Ravichandra, K.; Yaswanth, V.V.N.; Nikhila, B.; Ahmad, J.; Srinivasa Rao, P.; Uma, A.; Ravindrababu, V.; Prakasham, R.S. Xylanase Production by Isolated Fungal Strain, *Aspergillus fumigatus* RSP-8 (MTCC 12039): Impact of Agro-industrial Material as Substrate. *Sugar Tech* 2016, 18, 29–38, doi:10.1007/s12355-014-0357-7.
40. Cupp-Enyard, C.; Aldrich, S. Sigma's non-specific protease activity assay - Casein as a substrate. *J. Vis. Exp.* 2008, 4–5, doi:10.3791/899.
41. Winkler, U.K.; Stuckmann, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 1979, 138, 663–670.
42. Gupta, R.; Rathi, P.; Gupta, N.; Bradoo, S. Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2003, 37, 63, doi:10.1042/ba20020059.
43. Lowry, O.H.; Rosebrogh, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 265–275, doi:10.1016/0922-338X(96)89160-4.
44. Bourbonnais, R.; Leech, D.; Paice, M.G. Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1998, 1379, 381–390, doi:10.1016/S0304-4165(97)00117-7.
45. de Salas, F.; Cañadas, R.; Santiago, G.; Virseda-Jerez, A.; Vind, J.; Gentili, P.; Martínez, A.T.; Guallar, V.; Muñoz, I.G.; Camarero, S. Structural and biochemical insights into an engineered high-redox potential laccase overproduced in *Aspergillus*. *Int. J. Biol. Macromol.* 2019, 141, 855–866, doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.09.052.
46. Fraatz, M.A.; Naeve, S.; Hausherr, V.; Zorn, H.; Blank, L.M. A minimal growth medium for the basidiomycete *Pleurotus sapidus* for metabolic flux analysis. *Fungal Biol. Biotechnol.* 2014, 1, 1–8, doi:10.1186/s40694-014-0009-4.
47. Camacho-Morales, R.L.; Gerardo-Gerardo, J.L.; Guillén Navarro, K.; Sánchez, J.E. Ligninolytic enzyme production by white rot fungi during paraquat (herbicide) degradation. *Rev. Argent. Microbiol.* 2017, 49, 189–196, doi:10.1016/j.ram.2016.11.004.

48. Rodríguez-Couto, S. Microbial Laccases as Potential Eco-friendly Biocatalysts for the Food Processing Industries. *Microb. Enzym. Technol. Food Appl.* 2017, 255–268, doi:10.1201/9781315368405-16.
49. Cardoso, B.K.; Linde, G.A.; Colauto, N.B.; do Valle, J.S. *Panus strigellus* laccase decolorizes anthraquinone, azo, and triphenylmethane dyes. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2018, 16, 558–563, doi: 10.1016/j.bcab.2018.09.026.
50. Zhang, M.; Wu, F.; Wei, Z.; Xiao, Y.; Gong, W. Characterization and decolorization ability of a laccase from *Panus rudis*. *Enzyme Microb. Technol.* 2006, 39, 92–97, doi: 10.1016/j.enzmictec.2005.09.012.
51. Yang, J.; Li, W.; Bun Ng, T.; Deng, X.; Lin, J.; Ye, X. Laccases: Production, expression regulation, and applications in pharmaceutical biodegradation. *Front. Microbiol.* 2017, 8, doi:10.3389/fmicb.2017.00832.
52. Yamanaka, R.; Soares, C.F.; Matheus, D.R.; Machado, K.M.G. Lignolytic enzymes produced by *Trametes villosa* CCB176 under different culture conditions. *Brazilian J. Microbiol.* 2008, 39, 78–84, doi:10.1590/S1517-83822008000100019.
53. Ezike, T.C.; Ezugwu, A.L.; Udeh, J.O.; Eze, S.O.O.; Chilaka, F.C. Purification and characterisation of new laccase from *Trametes polyzona* WRF03. *Biotechnol. Reports* 2020, 28, e00566, doi: 10.1016/j.btre. 2020.e00566.
54. Fonseca, M.I.; Tejerina, M.R.; Sawostjanik-Afanasiuk, S.S.; Giorgio, E.M.; Barchuk, M.L.; Zapata, P.D.; Villalba, L.L. Preliminary studies of new strains of *Trametes* sp. From Argentina for laccase production ability. *Brazilian J. Microbiol.* 2016, 47, 287–297, doi: 10.1016/j.bjm.2016.01.002.
55. Buddhika, U.V.A.; Savocchia, S.; Steel, C.C. Copper induces transcription of BcLCC2 laccase gene in phytopathogenic fungus, *Botrytis cinerea*. *Mycology* 2021, 12, 48, doi:10.1080/21501203.2020.1725677.
56. Eugenio, M.E.; Carbajo, J.M.; Martín, J.A.; Martín-Sampedro, R.; González, A.E.; Villar, J.C. Synergie effect of inductors on laccase production by *Pycnoporus sanguineus*. *Afinidad* 2010, 67, 129–135.
57. Dhakar, K.; Pandey, A. Laccase production from a temperature and pH tolerant fungal strain of *Trametes hirsuta* (MTCC 11397). *Enzyme Res.* 2013, 2013, doi:10.1155/2013/869062.
58. Zilly, A.; dos Bazanella, G.C.S.; Helm, C.V.; Araújo, C.A.V.; de Souza, C.G.M.; Bracht, A.; Peralta, R.M. Solid-State Bioconversion of Passion Fruit Waste by White-Rot Fungi for Production of Oxidative and Hydrolytic Enzymes. *Food Bioprocess Technol.* 2012, 5, 1573–1580, doi:10.1007/s11947-011-0532-8.
59. Peralta, R.M.; da Silva, B.P.; Gomes Côrrea, R.C.; Kato, C.G.; Vicente Seixas, F.A.; Bracht, A. Enzymes from Basidiomycetes-Peculiar and Efficient Tools for

Biotechnology. In *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications*; 2017; pp. 119–149 ISBN 9780128037461.

60. Souza, H.Q. de; Oliveira, L.A. de; Andrade, J.S. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. *Ciência e Tecnol. Aliment.* 2008, 28, 116–124, doi:10.1590/s0101-20612008000500019.
61. Niyonzima, F.N.; More, S. Purification and properties of detergent-compatible extracellular alkaline protease from *Scopulariopsis* spp. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2014, 44, 738–759, doi:10.1080/10826068.2013.854254.
62. Souza, P.M.; Werneck, G.; Aliakbarian, B.; Siqueira, F.; Ferreira Filho, E.X.; Perego, P.; Converti, A.; Magalhães, P.O.; Junior, A.P. Production, purification and characterization of an aspartic protease from *Aspergillus foetidus*. *Food Chem. Toxicol.* 2017, 109, 1103–1110, doi: 10.1016/j.fct.2017.03.055.
63. Vishwanatha, K.S.; Rao, A.G.A.; Singh, S.A. Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: Optimization of process parameters. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2010, 37, 129–138, doi:10.1007/s10295-009-0654-4.
64. Singh, D.P.; Singh, H.B.; Prabha, R. Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity: Vol. 1: Research perspectives. *Microb. Inoculants Sustain. Agric. Product.* Vol. 1 Res. Perspect. 2016, 1–343, doi:10.1007/978-81-322-2647-5.
65. Pessôa, M.G.; Paulino, B.N.; Mano, M.C.R.; Neri-Numa, I.A.; Molina, G.; Pastore, G.M. *Fusarium* species—a promising toolbox for industrial biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2017, 101, 3493–3511, doi:10.1007/s00253-017-8255-z.
66. Nwagu, T.N.; Okolo, B.N. Extracellular amylase production of a thermotolerant *Fusarium* sp: isolated from Eastern Nigerian soil. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 2011, 54, 649–658, doi:10.1590/S1516-89132011000400002.
67. Singh, S.; Singh, S.; Bali, V.; Sharma, L.; Mangla, J. Production of fungal amylases using cheap, readily available agriresidues, for potential application in textile industry. *Biomed Res. Int.* 2014, 2014, doi:10.1155/2014/215748.
68. Almeida, M.; Guimaraes, V.; Falkoski, D.L.; Visser, E. Optimization of Endoglucanase and Xylanase Activities from *Fusarium verticillioides* for Simultaneous Saccharification and Fermentation of Sugarcane Bagasse. *Artic. Appl. Biochem. Biotechnol.* 2013, doi:10.1007/s12010-013-0572-9.
69. Uday, U.S.P.; Choudhury, P.; Bandyopadhyay, T.K.; Bhunia, B. Classification, mode of action and production strategy of xylanase and its application for biofuel production from water hyacinth. *Int. J. Biol. Macromol.* 2016, 82, 1041–1054.
70. Peña, C.; Bermúdez, E.; Morales, S.; Farrés, A. Las cutinasas como una herramienta valiosa para la descontaminación de residuos plásticos. *Tab.* 2018, 42, 24–35.

71. Villafana, R.T.; Rampersad, S.N. Diversity, structure, and synteny of the cutinase gene of *Colletotrichum* species. *Ecol. Evol.* 2020, 10, 1425–1443, doi:10.1002/ece3.5998.
72. Kontkanen, H.; Westerholm-Parvinen, A.; Saloheimo, M.; Bailey, M.; Rättö, M.; Mattila, I.; Mohsina, M.; Kalkkinen, N.; Nakari-Setälä, T.; Buchert, J. Novel *Coprinopsis cinerea* Polyesterase that hydrolyzes cutin and Suberin. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009, 75, 2148–2157, doi:10.1128/AEM.02103-08.
73. Belge, B.; Llovera, M.; Comabella, E.; Gatiús, F.; Guillén, P.; Graell, J.; Lara, I. Characterization of cuticle composition after cold storage of “celeste” and “someset” sweet cherry fruit. *J. Agric. Food Chem.* 2014, 62, 8722–8729, doi:10.1021/jf502650t.

Capítulo III

Co-cultivo de hongos lignocelulósicos de
ambientes tropicales como estrategia para
potencializar la producción enzimática

Capítulo III.

Co-cultivo de hongos lignocelulolíticos de ambientes tropicales como estrategia para potencializar la producción enzimática.

Co-cultivation of lignocellulolytic fungi from tropical environments as a strategy to enhance enzyme production.

Karla Peraza-Jiménez ¹, Susana De la Rosa-García ^{1*}, José Javier-Huijara Vasconcelos ², and Sergio Gómez-Cornelio³

¹Laboratorio de Microbiología Aplicada, División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Km. 0.5 Carretera Villahermosa-Cárdenas, 86150, Villahermosa, Tabasco, México.

²División Académica de Ciencias Agropecuarias, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Carretera Federal Villahermosa-Teapa Km 25, R/a La Huasteca, 86298, Villahermosa, Tabasco.

³Universidad Politécnica del Centro. Km 22.5 Carretera Federal Villahermosa-Teapa, Tumbulushal, 86290, Centro, Tabasco

Enviado: 16 de marzo del 2022.

Resumen

El co-cultivo de hongos sigue siendo una herramienta importante para estimular mayores rendimientos en la excreción de enzimas y metabolitos valiosos por sus múltiples aplicaciones a nivel industrial y biotecnológico. Para este estudio se seleccionaron cinco cepas fúngicas (*Trametes villosa*, *Daedalea flavida*, *Marasmius* sp., *Fusarium* sp. FH79 y *Fusarium* sp. FS720) con potencial enzimático lignocelulósico aislados de hojarasca, suelo y madera del trópico húmedo mexicano con la finalidad de determinar el comportamiento y potencial incremento en la producción de sus enzimas estando en co-cultivo. Los resultados de las interacciones en medio líquido revelan que existe un aumento en la actividad lacasa, amilasa, xilanasas y proteasa en cultivos duales entre basidiomicetos; sin embargo, las máximas actividades fueron mostradas cuando fueron co-cultivadas con cepas

de *Fusarium* sp.; entre los registros más relevantes de aumento en la actividad destacan el co-cultivo de *Trametes villosa* y *Fusarium* sp. FS720 con 1.66 U/mL para la actividad lacasa, *Fusarium* sp. PH79 y *Fusarium* sp. FS720 con 2.03 U/mL , 2.65 U/mL para las actividades amilasa y xilanasa, y *Marasmius* sp. con *Daedalea flavida* con 122 U/mL para la actividad proteasa. Este incremento en la actividad enzimática demuestra que las interacciones entre especies pueden estimular la producción, por ello puede ser de gran utilidad para su aplicación industrial.

Palabras clave: Interacción, lacasa, amilasa, xilanasa, proteasa

Abstract

The co-culture of fungi continues to be an important tool to stimulate higher yields in the excretion of enzymes and valuable metabolites due to its multiple applications at the industrial and biotechnological levels. For this study, five fungal strains (*Trametes villosa*, *Daedalea flavida*, *Marasmius* sp., *Fusarium* sp. FH79 and *Fusarium* sp. FS720) with lignocellulosic enzymatic potential isolated from letter, soil and wood of the Mexican humid tropics were selected to determine the behavior and potential increase in the production of its enzymes being in co-culture. The results showed an increase in laccase, amylase, xylanase and protease activity in dual cultures between basidiomycetes; however, the maximum activities were shown when they were co-cultivated with strains of *Fusarium* sp.; Among the most relevant records of increased activity, the co-culture of *Trametes villosa* and *Fusarium* sp. FS720 with 1.66 U/mL for laccase, *Fusarium* sp. PH79 and *Fusarium* sp. FS720 with 2.03 U/mL, 2.65 U/mL for amylase and xylanase, *Marasmius* sp. and *Daedalea flavida* with 122 U/mL for proteases. This increase in enzymatic activity shows that interactions between species can stimulate production; therefore, it can be very useful for its industrial application.

Introducción

Los hongos en su ambiente natural no se encuentran aislados, por el contrario, están en constante interacción, compitiendo por territorio y alimento; todo esto a través de interacciones antagonistas o sinergistas, que son las que determinan el desarrollo de la comunidad a través de la descomposición y variación del carbono en el medio ambiente. Estas interacciones pueden ser generalmente de dos tipos, la primera llamada de reemplazo y ocurre cuando un hongo desplaza de su territorio a otro hongo, y punto muerto en donde ninguno de los dos hongos gana; estas interacciones van acompañadas de cambios morfológicos y metabólicos como secreción de toxinas, gases, metabolitos y enzimas oxidativas (J. Hiscox *et al.*, 2018; Jennifer Hiscox *et al.*, 2010).

La importancia de entender y conocer los tipos de interacciones que se llevan a cabo con hongos de igual y diferente género es de vital importancia tanto a nivel ecológico, para comprender los procesos de descomposición, de sucesión fúngica, determinación de la función del ecosistema y la resiliencia al cambio climático; como a nivel industrial y biotecnológico para el aprovechamiento de las enzimas y metabolitos empleados en el control biológico de hongos patógenos, biorremediación, mineralización de compuestos recalcitrantes, detoxificación de xenobióticos, blanqueamiento de pulpa y papel, biocombustibles, entre otros (Jennifer Hiscox & Boddy, 2017; Sperandio & Ferreira Filho, 2019).

En varias investigaciones han empleado las interacciones fúngicas en condiciones de co -cultivos; como una alternativa para aumentar la producción en la actividad enzimática; (Ijoma *et al.*, 2019; Kuhar *et al.*, 2015; Lira-Pérez *et al.*, 2020); demostrando que se promueve la activación de rutas cripticas silenciadas en monocultivos de cepas (Serrano *et al.*, 2017); sin embargo, todavía se necesita una interpretación más amplia y clara de las redes de comunicación molecular en las interacciones microbianas que nos ayuden a entender el funcionamiento fisiológico y metabólico, beneficiando de esta manera los avances en biotecnología con alternativas sostenibles para las bioproducciones. En los ambientes tropicales este fenómeno de interacción se lleva a cabo de manera eficiente, debido a la diversidad

de especies de hongos presentes que compiten por un mismo espacio y sustrato, el cual por las condiciones ambientales y la actividad microbiana es degradado de forma rápida y continua; por esta razón en el trópico húmedo de la sierra de Tabasco se llevó a cabo un estudio de bioprospección fúngica enzimática donde se encontró la presencia de enzimas oxidativas e hidrolíticas con resultados interesantes y potencial para continuar con estudios de interacción de los hongos con mayor actividad como *Trametes villosa* (lacasa), *Daedalea flavigra* (lacasa y proteasa), *Marasmius* sp. (lacasa) y dos cepas de *Fusarium* PH79 y FS720 (amilasa y xilanasa) (Peraza-Jiménez *et al.*, 2022); por tales motivos el objetivo de este trabajo es determinar la actividad enzimática de co-cultivos duales de las cinco cepas con buena actividad enzimática para determinar el impacto de las interacciones durante el proceso y el comportamiento de sus enzimas.

Materiales y métodos

Cepas fúngicas

En un estudio previo se evaluó la actividad enzimática de 150 cepas fúngicas aisladas de la sierra de Tabasco (Peraza-Jiménez *et al.*, 2022). De las cuales se seleccionaron las cinco cepas con mayor actividad enzimática lacasa, amilasa, proteasa y xilanasa y mediante ensayos duales en placa de Petri se evaluó la compatibilidad entre ellas. Las cepas fueron *Marasmius* sp. (CE25) del cerro Coconá (17°33'46.6" N, 92°55'31" W), *Daedalea flavigra* (PE47) y *Fusarium* sp. (PH79) de Puyacatengo (17°31'34.2" N, 92°55'31" W) y de la estación biológica la Florida (17°27.8'33" N, 99°45'99" W) *Trametes villosa* (FE35) y *Fusarium* sp. (FS720). Todos estos sitios se caracterizan por tener un clima lluvioso en la mayor parte del año con un promedio de precipitación que oscila entre los 2,214 y 3,382 mm, abarcando de agosto a marzo con temperaturas promedio de 22 y 26.8 °C.

Co-cultivo en medio sólido

Para conocer el tipo de interacción interespecífica que existe entre hongos de la podredumbre blanca y hongos filamentosos; se construyó una matriz de interacción con diez combinaciones (tabla 1). Para el experimento de cultivos duales, discos de 8 mm aproximadamente de *Trametes villosa*, *Daedalea flavigra*, y *Marasmius* sp.

fueron inoculadas en cajas Petri (90 mm Ø) con agar papa dextrosa (PDA) tres días antes de iniciar el ensayo por su lento crecimiento, seguido de los discos de *Fusarium* sp. (PH79) y *Fusarium* sp. (FS720) dejando un espacio entre ambas de 50 mm. Los cultivos duales se llevaron a incubación por 7 días a 25 °C hasta observar el tipo de interacción. El experimento se realizó por triplicado y como controles se inocularon las cinco cepas en monocultivos en las mismas condiciones. El ensayo se detuvo cuando uno de los hongos llegó al borde de la placa de Petri.

Tabla 1 Matriz de combinaciones fúngicas en co-cultivos (en verde)

Co-cultivos	<i>Trametes villosa</i> FE35	<i>Marasmius</i> sp. CE25	<i>Daedalea flavida</i> PE47	<i>Fusarium</i> sp. PH79	<i>Fusarium</i> sp. FS720
<i>Trametes villosa</i> FE35					
<i>Marasmius</i> sp. CE25					
<i>Daedalea flavida</i> PE47					
<i>Fusarium</i> sp. PH79					
<i>Fusarium</i> sp. FS720					

Co-cultivos en medio líquido.

Una vez identificado el tipo de interacción presentada en medio sólido entre ambas especies y que se descartara posibles efectos alelopáticos se procedió a inocular los hongos en 120 mL de medio (modificado para cada enzima) contenidos en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Para evaluar actividad lacasa se empleó el medio (Sivakumar, 2010) (g/L fructosa 10, extracto de levadura 2.5, KH_2PO_4 1.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.05, MgSO_4 0.5, CaCl_2 0.01, MnSO_4 0.001, ZnSO_4 0.001 y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.2mM, con pH 4.8), para evaluar las actividades amilasa y xilanasas se empleó medio mínimo (g/L) NH_4NO_3 0.6, KH_2PO_4 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001, a pH 5.8 suplementada con respectiva fuente de carbono (1% de almidón y 1% de xilano de abedul, w/v). Para evaluar la actividad proteasa se preparó el medio compuesto por (g/L) Extracto de levadura 1.0, MgSO_4 0.02, glucosa 2.0, KH_2PO_4

0.1, a pH 7.0. Con la ayuda de un transfer se inocularon los medios con seis discos de 8 mm de diámetro de monocultivos axénicos de cepas *Trametes villosa*, *Daedalea flavida* y *Marasmius* sp., transcurridos tres días de incubación orbital, se inocularon otros seis discos de *Fusarium* sp. (FH79) y *Fusarium* sp. (FS720) en los mismos matraces. Todos los medios se incubaron a 25 °C por 16 días a 130 rpm en agitación orbital. Para la cuantificación de la enzima se tomaron 5 mL del sobrenadante a los 8, 10, 12 y 14 días cultivo, posteriormente se centrifugó por 10 min a 10,000 rpm y se filtró en papel Whatman No 1 para la evaluación del extracto enzimático. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y monocultivos de las cepas de estudio en las mismas condiciones del experimento se tomaron como controles.

Cuantificación de actividad lacasa

Para la evaluación de actividad lacasa se determinó mediante la oxidación del 2,2'-azino-bis ácido 3-etilbenthiazoline -6-sulfonic (ABTS). La mezcla de reacción consistió en 0.5 mM de ABTS, 0.1 M de un buffer de acetato de sodio (pH 4.5) y 100 µL de sobrenadante enzimático. La oxidación del sustrato fue monitoreada por el incremento en la absorbancia a 420 nm ($\epsilon_{420} = 3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) durante 5 min. La actividad enzimática fue expresada como U= 1µmol de ABTS oxidado por min a 25 °C (Sunil *et al.*, 2011).

Cuantificación de actividad amilasa y xilanasas

Ambas enzimas fueron cuantificadas mediante el método de (Miller, 1959) que emplea al DNS (3, 5 ácido dinitrosalicílico) para determinar la formación o liberación de los azúcares reductores durante el ensayo. La mezcla de reacción consistió en 1% de almidón soluble como sustrato disuelto en amortiguador citrato de sodio 0.1 M, pH 5.6, 5 mL del sobrenadante para amilasas y 1% de xilano de abedul en 0.05 M de amortiguador acetato de sodio, pH 5.3, 5 mL del sobrenadante para xilanasas; posteriormente se llevó a incubación a 40 °C durante 30 min. La reacción fue finalizada con la adición de 2 mL del reactivo DNS y calentamiento a 80 °C durante 5 min. La absorbancia fue leída a 540 nm frente a un blanco sin la enzima en las mismas condiciones de ensayo; simultáneamente se realizó dos curvas estándar de

calibración (glucosa y xilosa, 1 mg/mL). La actividad amilasa y xilanasa fueron expresadas como la cantidad que libera 1 μmol de azúcar reductor equivalentes a glucosa y xilosa por mL en un minuto (Ravichandra *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2014).

Cuantificación de actividad proteasa

Para la determinación de actividad proteasa se preparó una solución de caseína 65% en un amortiguador de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.5; 5 mL, la solución se transfirió en tubos de ensayo llevándolos a incubación a baño maría a 37 °C por 5 min; posteriormente se añadió 1 mL del sobrenadante enzimático, se mezcló con la ayuda de un vortex y se mantuvo en incubación a 37°C por 10 min. La mezcla de reacción se detuvo añadiendo 5 mL de TCA (ácido tricloro acético) 110 mM. Por último, las muestras fueron filtradas y a 2 mL de muestra se le adicionó 5 mL de carbonato de sodio 500 mM, 1 mL de Folin's 0.5 mM, todo esto se llevó a incubación en oscuridad a temperatura ambiente por 30 min. Una curva estándar de tirosina (0.2 mg/mL) y blancos fueron desarrollados bajo las mismas condiciones. La absorbancia fue medida a 660 nm y la actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima que libera 1 mol de tirosina por minuto (Cupp-Enyard & Aldrich, 2008).

Análisis estadísticos

Todos los datos de cuantificación enzimática fueron realizados por triplicado. La determinación de las diferencias significativas se realizó mediante una comparación múltiple de medias empleando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguida de la prueba Tukey. En los análisis de datos se consideró una significancia de $\alpha=0.05$ con el paquete estadístico Statgraphis 7.

Resultados

Interacción en placa en medio sólido

Los resultados de interacción interespecífica mediante la interacción entre cepas de la podredumbre blanca *Trametes villosa*, *Daedalea flavida* y *Marasmius* sp. CE25 y dos hongos microscópicos *Fusarium* sp. PH79 y FS720, mostraron un tipo principal de interacción; de punto muerto ó deadlock que sucede, cuando ninguno de los dos hongos gana territorio, este fenómeno se visualizó entre la interacción de todas las combinaciones realizadas (Fig.1 A, B, C, D, E, F, G y H). A pesar, del rápido crecimiento de *Fusarium* sp. PH79 este no logra colonizar un mayor espacio a los basidiomicetos lignícolas que contendieron, mientras que *Fusarium* sp. FS720 siempre fue inhibido a consecuencia de su lento crecimiento (Fig.1 F y G). Con base a estos resultados se realizó el bioensayo de fermentación en medio líquido inoculando las cepas de acuerdo con la matriz propuesta (Tabla 1).



Figura. 1 interacciones duales (A, B) *Fusarium* sp. PH79 vs *Trametes villosa*, (C) *Marasmius* sp. vs *Trametes villosa*, (D) *Daedalea flavida* vs *Marasmius* sp., (E) *Daedalea flavida* vs *Trametes villosa*, (F) *Fusarium* sp. PH79 vs *Fusarium* sp. FS720, (G) *Trametes villosa* vs *Fusarium* sp. FS720, (H) *Fusarium* sp. PH79 vs *Daedalea flavida*.

Interacciones en medio líquido y evaluación enzimática

Una vez identificado el tipo de interacción en los cultivos duales entre las cinco cepas fúngicas en medio sólido, se procedió con el ensayo de fermentación en medio líquida. En la evaluación del rendimiento de la actividad enzimática de las

cinco cepas seleccionadas en condiciones de co-cultivos destacan para la actividad lacasa de *Trametes villosa* FE35 con *Fusarium* sp. FS720 (1.66 U/mL) y *Trametes villosa* FE35 con *Fusarium* sp. PH79 (1.55 U/mL) fueron los co-cultivos con mayor actividad con un máximo a los 14 días de incubación, en comparación de su respectivo monocultivo (*T. villosa*) con 1.02 U/mL a los mismos días; seguido de la interacción de *Daedalea flavida* PE47 y *Fusarium* sp. PS720 (0.76 U/mL) a los 12 días, por otra parte *Daedalea flavida* PE47 con *Fusarium* PH79 (0.52 U/mL) a los 12 días de cultivo, mientras que el monocultivo de PE47 solamente reportó 0.36 U/mL; en cuanto a la interacción de *Marasmius* sp. CE25 y *Fusarium* sp. FS720 (0.99 U/mL) así como *Marasmius* sp. CE25 con *Fusarium* sp. PH79 (1.02 U/mL) se observó un ligero aumento en comparación de su monocultivo con (0.90 U/mL) (Fig. 2 A).

Por otra parte, las interacciones entre basidiomicetos en algunos casos no mostraron diferencias significativas en su actividad tal es el caso de *Marasmius* sp. CE25 con *Daedalea flavida* PE47 con (0.96 U/mL) comparado con sus monocultivos CE25 (0.90 U/mL), mientras que para *Daedalea flavida* PE47 fue de 0.36 U/mL. En cuanto a la interacción de *Trametes villosa* FE35 con *Marasmius* sp. CE25 se potencializó la actividad en co-cultivo de 1.51 U/mL a los 14 días, mientras que en monocultivos los valores fueron de 1.3 y 0.9 U/mL, respectivamente; por último la interacción de *Trametes villosa* FE35 y *Daedalea flavida* PE47 fue positiva para *Daedalea flavida* pasando de (0.36 U/mL) en monocultivo a (0.75 U/mL) a los 14 días en co-cultivo; Sin embargo, para *Trametes villosa* FE35 experimentó un descenso en la actividad pasando de (1.37 U/mL) en monocultivo a (0.75 U/mL) en co-cultivo (Fig. 2 A).

Para el caso de actividad amilasa, la mayor actividad en los ensayos monocultivos y cocultivos se observó al día 10; las interacciones más sobresalientes fueron para el co-cultivo entre cepas del mismo género de *Fusarium* sp. 720 y *Fusarium* sp. PH79 pasando de 1.75 y 1.09 U /mL respectivamente en monocultivos hasta alcanzar una actividad máxima de (2.03 U/mL) en co-cultivo, bajando su actividad en días consecutivos (Fig. 2 B).

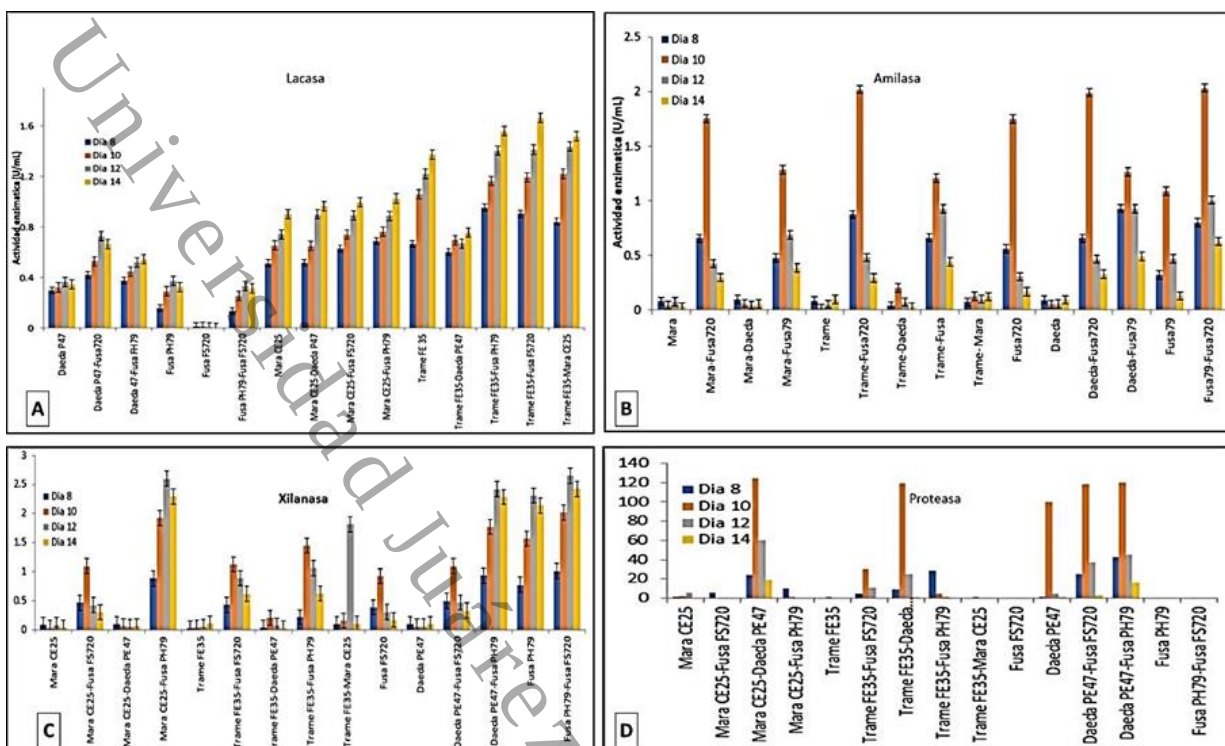


Figura. 2 cuantificación enzimática de cepas en co-cultivos A) Lacasa, B) Amilasa, C) xilanasa y D) proteasa. Mara CE25 = *Marasmius* sp., Daeda PE47= *Daedalea flavida*, Trame FE35 = *Trametes villosa*; Fusa FS720 = *Fusarium* sp. 720, Fusa PH79 = *Fusarium* sp. 79.

Con respecto a la interacción con basidiomicetos, la máxima actividad con diferencias estadísticamente significativas se registró en los co-cultivos de *Trametes villosa* FE35 y *Fusarium* sp. FS720 con (2.02 U/mL) a los 10 días, seguida de las interacciones entre *Daedalea flavida* PH47 y *Fusarium* sp. 720 con (1.99 U/mL) a los 10 días, en comparación de sus respectivos monocultivos (Fig. 2 B). Por otro lado, las interacciones con *Fusarium* sp. PH79 solamente mostraron un ligero aumento en la actividad pasando de (1.09 U/mL) en monocultivo a (1.20, 1.26 y 1.28 U/mL) en co-cultivos con *Trametes villosa* FE35, *Daedalea flavida* PE47 y *Marasmius* sp. CE25 a los 10 días respectivamente. Cabe recalcar que la interacción de *Marasmius* sp. CE25 con *Fusarium* sp. 720 no se observaron cambios significativos en su actividad.

Para xilanasas la máxima actividad es registrada a los 12 días de cultivo en las interacciones entre *Fusarium* sp. PH79 y *Fusarium* sp. FS720 con 2.65 U/mL, seguida de la interacción entre *Fusarium* sp. PH79 y *Marasmius* sp. CE25 con 2.59 U/mL a los mismos días. Por otro lado, se observó, que el co-cultivo de *Daedalea flavida* PH47 y *Fusarium* sp. PH79 y *Fusarium* sp. FS720 no mostraron diferencias significativas de actividad en comparación a sus respectivos monocultivos de las cepas de *Fusarium*. En adición, la cepa de *Trametes villosa* FE35 con *Fusarium* sp. PH79 y *Fusarium* sp. FS720 mostraron un descenso en la actividad xilanasa en comparación cuando los dos *Fusarium* sp. están en monocultivos (Fig. 2 C).

Para la enzima proteasa la mayor actividad fue registrada a los diez días de cultivo por la interacción de *Marasmius* sp. CE25 y *Daedalea flavida* PE47 con 122 U/mL; mientras que para los co-cultivos de *Daedalea flavida* PE47 y *Fusarium* sp. PH79, *Fusarium* sp. FS720 y *Trametes villosa* FE35 fue de 119, 118 y 119 U/mL respectivamente a los mismos días (Fig. 2 D).

3.4 Discusión

La activación o desbloqueo de rutas biosintéticas cripticas es un fenómeno que ocurre cuando algunas especies de hongos son retadas por otros hongos compitiendo por espacio y alimento estando en cultivos duales o mixtos; esta activación favorece en la codificación de enzimas y metabolitos de interés comercial y biotecnológico; además de potencializar su actividad como lo demuestran varios trabajos de investigación (Abdalla *et al.*, 2017; Jiménez-Barrera *et al.*, 2018; Sanitá Lima & Coutinho de Lucas, 2022).

Las interacciones duales presentadas en este trabajo son de cepas de hongos estudiados con anterioridad y seleccionados por su alta actividad enzimática (Peraza-Jiménez *et al.*, 2022) con el objetivo de determinar el rendimiento de sus enzimas estando en condiciones de co-cultivos. En la mayoría de las interacciones entre basidiomicetos y basidiomicetos con los filamentosos del género *Fusarium*, se observó una interacción de punto muerto en todas sus réplicas, esto nos sugiere, que existe un grupo reducido de sustancias bioactivas durante las interacciones micelares, que pueden producir efectos en las capacidades de inhibición,

producción de pigmentos, modificación del color de la colonia, entre otros (Brglez et al., 2020). Por otra parte, la interacción entre *Fusarium* sp. PH79 con *Fusarium* sp. FS720 fue la única donde se observó un antagonismo de reemplazo en donde la cepa *Fusarium* sp. PH79 gana territorio e inhibe parcialmente el crecimiento a *Fusarium* sp. FS20; esto podría deberse al sustrato de aislamiento de *Fusarium* sp. PH79 que cuenta con la capacidad de degradar tanto celulosa como hemicelulosa, ya que tiene un origen en hoja (Anasontzis et al., 2016; Huang et al., 2015) y que en el medio de cultivo con PDA obtuvo su mejor expresión, por la disponibilidad de nutrientes del medio de cultivo, compuesto en su mayoría de carbohidratos y nitrógeno; mientras que *Fusarium* sp. FS720 tiene un origen en suelo; acostumbrado posiblemente a una mayor disponibilidad de nitrógeno y otros minerales, que en el medio de cultivo no pudo adquirir (Lin et al., 2016).

El comportamiento de las enzimas lacasas durante las interacciones interespecíficas duales entre hongos de la podredumbre blanca demostraron que *Trametes villosa* FE35 vs *Marasmius* sp. CE25 obtuvieron un mejor desempeño enzimático en co-cultivo; esto posiblemente se debe a que ambos comparten el mismo índice de crecimiento micelial (datos no mostrados), además el tipo de interacción que presentan (punto muerto) indica que hay un efecto sinérgico que potencializa su actividad; por este motivo es que en los ecosistemas naturales la interacción entre dos o más especies lignícolas acelera la descomposición de la madera y restos vegetales (Baldrian, 2004; Mali et al., 2017; Sánchez, 2009). Por otro lado, la actividad enzimática que presentan es alta comparada con otras interacciones duales de especies lignícolas (Ijoma et al., 2019; Lira-Pérez et al., 2020).

Un dato interesante fue la interacción dual de cepas filamentosas de *Fusarium* con las cepas de *Trametes*, *Daedalea* y *Marasmius* que potencializó la producción de enzima lacasa; a pesar de que las cepas *Fusarium* spp. no presentan esta actividad estando en condiciones de monocultivos, se puede sugerir que podrían fungir como excelentes inductores de la actividad lacasa en interacciones duales con basidiomicetos, similar a lo que ocurre los hongos del género *Trichoderma* (Bertrand

et al., 2013; Sjaarda *et al.*, 2015). En la literatura existen escasos reportes de incremento en la actividad lacasa por interacciones entre especies del género *Fusarium* con especies de basidiomicetos; por lo tanto, estas cepas podrían considerarse como excelentes candidatos para continuar con el estudio sobre las numerosas biomoléculas que intervienen en estas interacciones y como afectan la expresión de genes de la enzima lacasa, las cuales son de gran importancia en áreas de la biotecnología por sus aplicaciones en medicina, agricultura, manufactura de pulpa y papel, biorremediación, biocombustibles, entre otros (El-Sawah *et al.*, 2021; Kapoore *et al.*, 2022; Meyer *et al.*, 2020; Ming *et al.*, 2019).

La industria de los alimentos y biocombustibles cada vez exige mayores rendimientos a bajo costo para solventar sus gastos de producción, por lo tanto, han apostado por los co-cultivos de hongos como una estrategia para aumentar su productividad (Wang *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2021); en este sentido la interacción entre las cepas de *Fusarium* sp. PH79 con *Fusarium* sp. 720 fueron de las más prometedoras por su aumento en las actividades amilasa y xilanasas, enzimas capaces de hidrolizar los enlaces glucosídicos α -1, 4 y β -1, 6 xilano de la biomasa vegetal lignocelulósica como fuente de biocombustibles y comúnmente producida por hongos filamentosos (Gómez *et al.*, 2016; Nwagu & Okolo, 2011; Ramanjaneyulu *et al.*, 2017). Por otra parte los co-cultivos de *Deadalea flavida* y *Marasmius* sp. CE25 representa una fuente nueva de producción de enzimas proteasas, que a pesar, de no ser comúnmente encontradas en basidiomicetos, la diversidad y complejidad de acción de esta enzima ha dado lugar a estudios recientes por su empleo en la industria del detergente (Inacio *et al.*, 2015; Peralta *et al.*, 2017); esta actividad en basidiomicetes está asociada con el agotamiento de nitrógeno en el sustrato durante el metabolismo secundario con condiciones que promueven la degradación de la lignina (Greenfield *et al.*, 2021).

Conclusiones.

Este trabajo representa un estudio preliminar de interacciones interespecíficas entre hongos basidiomicetos y filamentosos aislados de sustratos de hoja, madera y suelo del trópico húmedo mexicano. Las interacciones de co-cultivos entre estas cepas estudiadas demostraron ser eficientes para inducir las interacciones célula-célula con un aumento en su actividad enzimática. Sin embargo, es necesario estudios posteriores para comprender el comportamiento de genes y proteínas involucradas en las interacciones interespecíficas micelares, clave para explicar y modelar el desarrollo de una comunidad y las funciones asociadas a un ecosistema.

Referencias

- Abdalla, M. A., Sulieman, S., & McGaw, L. J. (2017). Microbial communication: A significant approach for new leads. *South African Journal of Botany*, 113, 461–470. <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2017.10.001>
- Anasontzis, G. E., Kourtoglou, E., Villas-Boâs, S. G., Hatzinikolaou, D. G., & Christakopoulos, P. (2016). Metabolic engineering of *Fusarium oxysporum* to improve its ethanol-producing capability. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAY), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00632>
- Baldrian, P. (2004). Increase of laccase activity during interspecific interactions of white-rot fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, 50(3), 245–253. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.07.005>
- Bertrand, B., Martínez-Morales, F., & Trejo-Hernández, M. R. (2013). Fungal laccases: Induction and production. *Revista Mexicana de Ingeniera Química*, 12(3), 473–488.
- Brglez, A., Piškur, B., & Ogris, N. (2020). In vitro interactions between eutypella parasitica and some frequently isolated fungi from the wood of the dead branches of young sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*). *Forests*, 11(10), 1–12. <https://doi.org/10.3390/f11101072>
- Cupp-Enyard, C., & Aldrich, S. (2008). Sigma's non-specific protease activity assay - Casein as a substrate. *Journal of Visualized Experiments*, 19, 4–5. <https://doi.org/10.3791/899>
- Dighton, J. (2003). *Fungi in ecosystem processes*. 432.
- El-Sawah, A. M., El-Keblawy, A., Ali, D. F. I., Ibrahim, H. M., El-Sheikh, M. A., Sharma, A., Hamoud, Y. A., Shaghaleh, H., Brestic, M., Skalicky, M., Xiong, Y.-C., & Sheteiwy, M. S. (2021). Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Enhance Soil Key Enzymes, Plant Growth, Seed Yield, and Qualitative Attributes of Guar. *Agriculture 2021, Vol. 11, Page 194*, 11(3), 194. <https://doi.org/10.3390/AGRICULTURE11030194>
- Gómez, S., Payne, A. M., Savko, M., Fox, G. C., Shepard, W. E., Fernandez, F. J., & Cristina Vega, M. (2016). Structural and functional characterization of a highly stable endo- β -1,4-xylanase from *Fusarium oxysporum* and its development as an efficient immobilized biocatalyst. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0605-z>
- Greenfield, L. M., Puissant, J., & Jones, D. L. (2021). Synthesis of methods used to assess soil protease activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 158, 108277. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2021.108277>
- Hiscox, J., O'Leary, J., & Boddy, L. (2018). Fungus wars: basidiomycete battles in

- wood decay. *Studies in Mycology*, 89, 117–124.
<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.02.003>
- Hiscox, Jennifer, Baldrian, P., Rogers, H. J., & Boddy, L. (2010). Changes in oxidative enzyme activity during interspecific mycelial interactions involving the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Fungal Genetics and Biology*, 47(6), 562–571. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.03.007>
- Hiscox, Jennifer, & Boddy, L. (2017). Armed and dangerous – Chemical warfare in wood decay communities. *Fungal Biology Reviews*, 31(4), 169–184.
<https://doi.org/10.1016/j.fbr.2017.07.001>
- Huang, Y., Busk, P. K., & Lange, L. (2015). Cellulose and hemicellulose-degrading enzymes in *Fusarium commune* transcriptome and functional characterization of three identified xylanases. *Enzyme and Microbial Technology*, 73–74, 9–19.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.03.001>
- Ijoma, G. N., Selvarajan, R., & Tekere, M. (2019). The potential of fungal co-cultures as biological inducers for increased ligninolytic enzymes on agricultural residues. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16(1), 305–324. <https://doi.org/10.1007/s13762-018-1672-4>
- Inacio, F. D., Ferreira, R. O., Araujo, C. A. V. De, Brugnari, T., Castoldi, R., Peralta, R. M., & Souza, C. G. M. De. (2015). Proteases of wood rot fungi with emphasis on the genus *Pleurotus*. *BioMed Research International*, 2015.
<https://doi.org/10.1155/2015/290161>
- Jiménez-Barrera, D., Chan-Cupul, W., Fan, Z., & Osuna-Castro, J. A. (2018). Fungal co-culture increases ligninolytic enzyme activities: statistical optimization using response surface methodology. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 48(9), 787–798. <https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1509084>
- Kapoor, R. V., Padmaperuma, G., Maneein, S., & Vaidyanathan, S. (2022). Co-culturing microbial consortia: approaches for applications in biomanufacturing and bioprocessing. *Critical Reviews in Biotechnology*, 42(1), 46–72.
<https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1921691>
- Kuhar, F., Castiglia, V., & Levin, L. (2015). Enhancement of laccase production and malachite green decolorization by co-culturing *Ganoderma lucidum* and *Trametes versicolor* in solid-state fermentation. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 104, 238–243. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.06.017>
- Lin, Z., Wang, J., Bao, Y., Guo, Q., Powell, C. A., Xu, S., Chen, B., & Zhang, M. (2016). Deciphering the transcriptomic response of *Fusarium verticillioides* in relation to nitrogen availability and the development of sugarcane pokkah boeng disease. *Scientific Reports*, 6(July), 1–13.
<https://doi.org/10.1038/srep29692>

- Lira-Pérez, J., Rodríguez-Vázquez, R., & Chan-Cupul, W. (2020). Effect of fungal co-cultures on ligninolytic enzyme activities, H₂O₂ production, and orange G discoloration. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 50(6), 607–618. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1721534>
- Mali, T., Kuuskeri, J., Shah, F., & Lundell, T. K. (2017). Interactions affect hyphal growth and enzyme profiles in combinations of coniferous wood-decaying fungi of Agaricomycetes. *PLoS ONE*, 12(9), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185171>
- Meyer, V., Basenko, E. Y., Benz, J. P., Braus, G. H., Caddick, M. X., Csukai, M., de Vries, R. P., Endy, D., Frisvad, J. C., Gunde-Cimerman, N., Haarmann, T., Hadar, Y., Hansen, K., Johnson, R. I., Keller, N. P., Kraševac, N., Mortensen, U. H., Perez, R., Ram, A. F. J., ... Wösten, H. A. B. (2020). Growing a circular economy with fungal biotechnology: a white paper. *Fungal Biology and Biotechnology* 2020 7:1, 7(1), 1–23. <https://doi.org/10.1186/S40694-020-00095-Z>
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Ming, C., Dilokpimol, A., Zou, C., Liao, W., Zhao, L., Wang, M., de Vries, R. P., & Kang, Y. (2019). The quest for fungal strains and their co-culture potential to improve enzymatic degradation of Chinese distillers' grain and other agricultural wastes. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 144(November 2018), 104765. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104765>
- Nwagu, T. N., & Okolo, B. N. (2011). Extracellular amylase production of a thermotolerant *Fusarium* sp: isolated from Eastern Nigerian soil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(4), 649–658. <https://doi.org/10.1590/s1516-89132011000400002>
- Peralta, R. M., da Silva, B. P., Gomes Côrrea, R. C., Kato, C. G., Vicente Seixas, F. A., & Bracht, A. (2017). Enzymes from Basidiomycetes-Peculiar and Efficient Tools for Biotechnology. *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications*, 119–149. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00005-4>
- Peraza-Jiménez, K., De la Rosa-García, S., Huijara-Vasconcelos, J. J., Reyes-Estebanez, M., & Gómez-Cornelio, S. (2022). Enzymatic Bioprospecting of Fungi Isolated from a Tropical Rainforest in Mexico. *Journal of Fungi*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/JOF8010022>
- Ramanjaneyulu, G., Sridevi, A., Seshapani, P., Ramya, A., Dileep Kumar, K., Praveen Kumar Reddy, G., & Rajasekhara Reddy, B. (2017). Enhanced production of xylanase by *Fusarium* sp. BVKT R2 and evaluation of its biomass saccharification efficiency. *3 Biotech*, 7(5).

<https://doi.org/10.1007/s13205-017-0977-1>

- Ravichandra, K., Yaswanth, V. V. N., Nikhila, B., Ahmad, J., Srinivasa Rao, P., Uma, A., Ravindrababu, V., & Prakasham, R. S. (2016). Xylanase Production by Isolated Fungal Strain, *Aspergillus fumigatus* RSP-8 (MTCC 12039): Impact of Agro-industrial Material as Substrate. *Sugar Tech*, 18(1), 29–38.
<https://doi.org/10.1007/s12355-014-0357-7>
- Sánchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 27(2), 185–194.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.001>
- Sanitá Lima, M., & Coutinho de Lucas, R. (2022). Co-cultivation, Co-culture, Mixed Culture, and Microbial Consortium of Fungi: An Understudied Strategy for Biomass Conversion. *Frontiers in Microbiology*, 12(January), 10–13.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.837685>
- Serrano, R., González-Menéndez, V., Rodríguez, L., Martín, J., Tormo, J. R., & Genilloud, O. (2017). Co-culturing of fungal strains against *Botrytis cinerea* as a model for the induction of chemical diversity and therapeutic agents. *Frontiers in Microbiology*, 8(APR), 1–15.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00649>
- Singh, S., Singh, S., Bali, V., Sharma, L., & Mangla, J. (2014). Production of fungal amylases using cheap, readily available agriresidues, for potential application in textile industry. *BioMed Research International*, 2014.
<https://doi.org/10.1155/2014/215748>
- Sivakumar, R. (2010). Isolation, Screening and Optimization of Production Medium for Thermostable Laccase Production from *Ganoderma* sp. *International Journal of Engineering Science and Technology*, 2(12), 7133–7141.
- Sjaarda, C. P., Abubaker, K. S., & Castle, A. J. (2015). Induction of lcc2 expression and activity by *Agaricus bisporus* provides defence against *Trichoderma aggressivum* toxic extracts. *Microbial Biotechnology*, 8(6), 918–929.
<https://doi.org/10.1111/1751-7915.12277>
- Sperandio, G. B., & Ferreira Filho, E. X. (2019). Fungal co-cultures in the lignocellulosic biorefinery context: A review. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 142(May), 109–123.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.05.014>
- Sunil, S. M., Renuka, P. S., Pruthvi, K., Swetha, M., Malini, S., & Veena, S. M. (2011). Isolation, purification, and characterization of fungal laccase from *Pleurotus* sp. *Enzyme Research*, 2011(1), 1–8.
<https://doi.org/10.4061/2011/248735>
- Wang, J., Zheng, X., Lin, S., Lin, J., Guo, L., Chen, X., & Chen, Q. (2014).

Identification of differentially expressed genes involved in laccase production in tropical white-rot fungus *Polyporus* sp. PG15. *Journal of Basic Microbiology*, 54(2), 142–151. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200310>

Yu, G., Sun, Y., Han, H., Yan, X., Wang, Y., Ge, X., Qiao, B., & Tan, L. (2021). Coculture, An Efficient Biotechnology for Mining the Biosynthesis Potential of Macrofungi via Interspecies Interactions. *Frontiers in Microbiology*, 12(March), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.663924>

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

Capítulo IV

Conclusiones Generales

Capítulo IV

Conclusiones Generales

1. La identificación taxonómica de las 150 cepas fúngicas colectadas en la sierra del Estado consistió en cinco a nivel de especie, 113 a nivel de género, 17 a nivel de familia y diez como micelio estéril. En el análisis de cada fuente de aislamiento se encontraron géneros como *Auricularia*, *Trametes*, *Neonothopanus*, *Hexagonia*, *Marasmius*, *Marasmiellus*, *Daedalea*, *panus*, *Rigidoporus*, dos basidiomicetos y un ascomiceto aislados de troncos de madera en descomposición; mientras para los aislados de hojarasca se identificaron cepas de *Acremonium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Nodulisporium*, *Dreschlera*, *Monodictys*, *Xylaria* y diez micelios estériles; en contraste con el suelo se identificaron cepas de *Acremonium*, *Cylindrocarpon*, *Graphium*, *Gliomastix*, *Paecilomyces*, *Xylariaceas* y cinco micelios estériles.

2. La evaluación enzimática cualitativa en placa permitió seleccionar de forma rápida y eficaz las cepas con actividad enzimática lacasa, amilasa, proteasa, lipasa y xilanasa mediante el empleo de los sustratos y adecuación de medios de cultivo para cada enzima.

3. El empleo de inductores (Cu^{++} , almidón, salvado de trigo, gelatin y tween 20), así como la modificación en la composición y concentración de los nutrientes en los medios de cultivo fue de gran utilidad para el incremento de la actividad enzimática y contenido de proteínas durante la fermentación en medio líquido.

4. Las interacciones interespecíficas duales entre las cinco mejores cepas seleccionadas evidenció que existe un tipo principal de antagonismo dead lock o de punto muerto en la cual ninguno de los dos hongos gana territorio. Este tipo de interacción mostró un efecto sinérgico con un aumento en la actividad enzimática lacasas, amilasas, proteasa y xilanasa durante la interacción de *Trametes villosa*, *Marasmius sp.* y *Daedalea flavida* con cepas *Fusarium sp.* PH79 y FS720 que con cepas del mismo género.

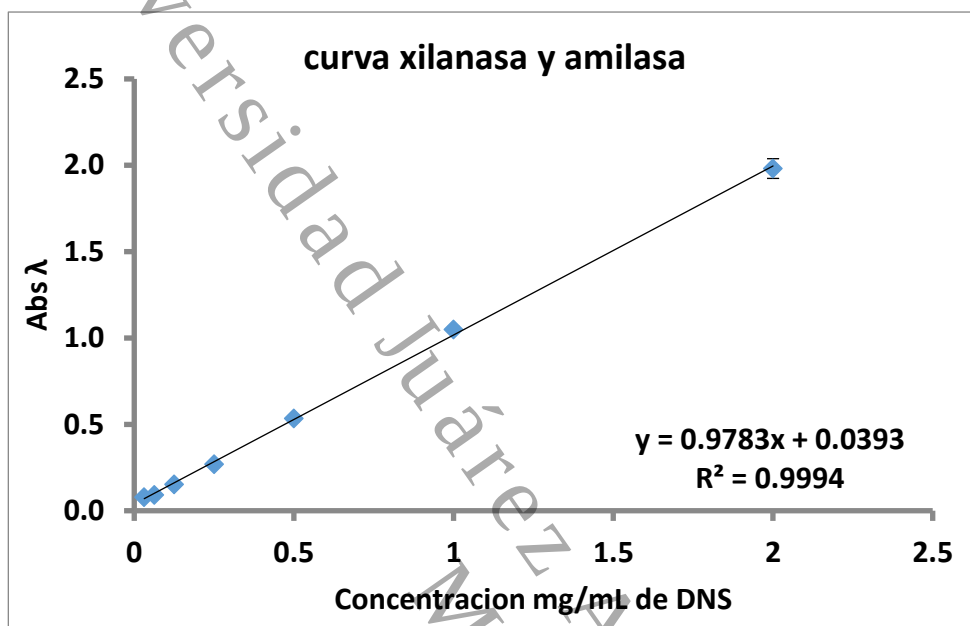
5. Este trabajo de investigación representa el primer aporte del estudio enzimático de los hongos de la Sierra tropical húmeda del Estado de Tabasco, el cual constituye una fuente promisoría de nuevas y mejores enzimas con cualidades únicas para ser empleadas en futuros bioprocesos en la industria alimentaria y biotecnológica; a nivel ecológico nos da una pauta para entender las sucesiones biológicas de las especies en los sustratos, sus interacciones con otros organismos, así como el índice de degradación de la materia orgánica; es por ello que es urgente proponer alternativas de agricultura sustentable en esos lugares que propicien su conservación y por ende salvaguardar la biodiversidad de especies de hongos que ahí habitan.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

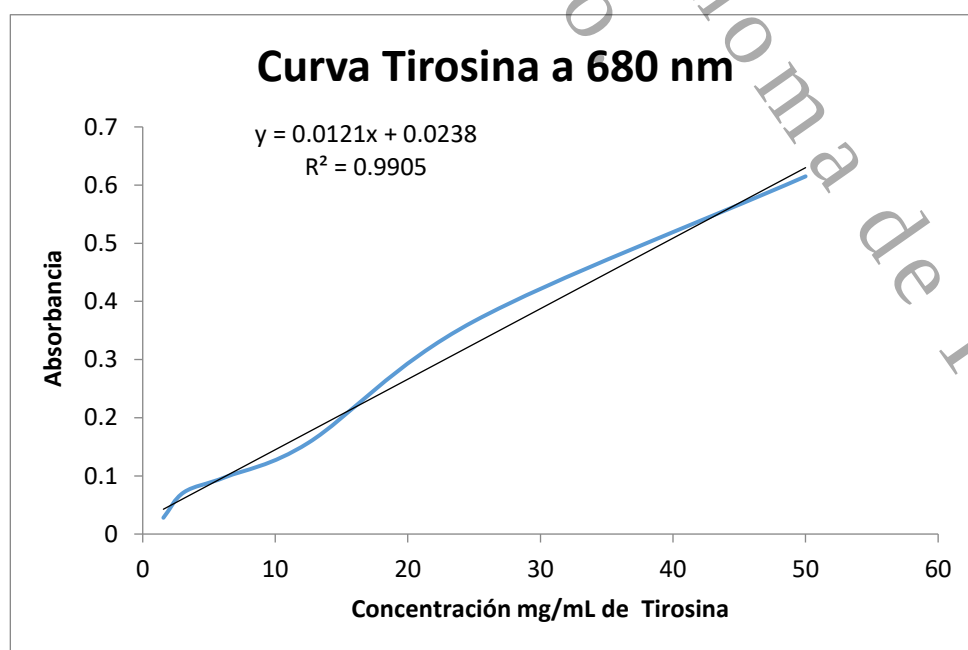
Anexos técnicos

Anexos

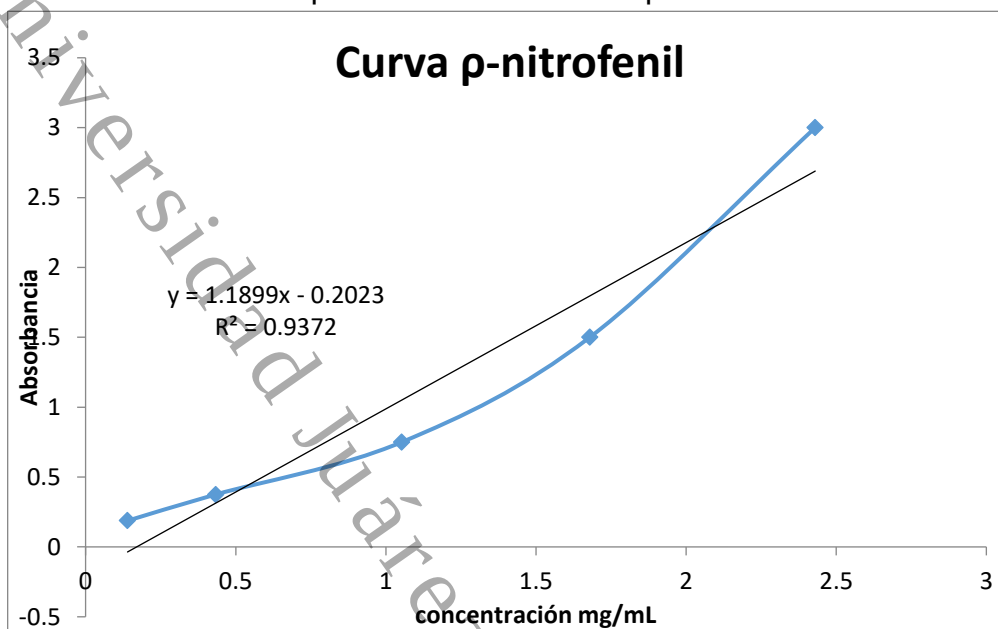
Curva de calibración por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) para cuantificar la concentración de amilasa y xilanas a 540 nm.



Curva de calibración para cuantificación de proteasas a 680 nm



Curva de calibración para cuantificación de lipasas a 410 nm



Curva de calibración para cuantificación de proteínas a 740 nm.

