

# Optimización de las Condiciones de Cultivo para la Producción de Enzimas Redox por *Aspergillus niger* QD y *Pestalotia sp* 2iQRJ

CALLE N. Juan E.,<sup>1</sup>  
VILLEGAS C. Romina P.,<sup>2</sup>  
ÁLVAREZ A. María Teresa,<sup>1</sup>  
GIMENEZ T. Alberto,<sup>1</sup>  
TERRAZAS S. Enrique L.,<sup>1</sup>

- 1 Laboratorio de Biotecnología "Biocatálisis", Instituto de Investigaciones Farmaco-Bioquímicas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés, Av. Saavedra 2224 Casilla 3239 - La Paz, Bolivia.
- 2 Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza Laboratorio CATIE Proyecto de Investigación "Identificación de la población microbiana existente en la hojarasca de cacao (*Theobroma cacao* L.)", Costa Rica

Tel. (591-02)2240347  
Cel. 70598529  
E-mail: bioquijuan@hotmail.com  
(Juan Eugenio Calle Nina)

## Palabras Clave:

*Aspergillus niger*; *Pestalotia sp* 2iQRJ  
Catalasa; lacasa; manganeso peroxidasa.

## Key words:

*Aspergillus niger*; *Pestalotia sp* 2iQRJ  
Catalase, lacase, Manganese peroxidase

## RESUMEN

Se evaluó la producción de enzimas REDOX en 250 cepas fúngicas del IIFB. Cualitativamente el 22% presentó actividad enzimática en medio sólido ABTS. Las cepas *Pestalotia sp* 2iQRJ y *Aspergillus niger* (141QD) fueron seleccionadas por presentar mayor desarrollo de halo de oxidación de ABTS. La cuantificación se realizó por método espectrofotométrico siguiendo la oxidación enzimática de ABTS Y DMP. Las condiciones óptimas para la producción enzimática fueron:  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  y pH 6.

Para optimizar las condiciones de cultivo se trabajó con diseños factoriales, desarrollado en medio basal, variando las concentraciones de glucosa, extracto de levadura, peptona y  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . *Aspergillus niger* (141QD) presentó actividad catalasa 4 U/L (glucosa 5g/L; Extracto de levadura 1g/L), en agitación, determinada durante 10 días a  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  y pH 6.

Por otro lado, en la cepa *Pestalotia sp* 2iQRJ (14 días de cultivo), se cuantificó actividad lacasa 129 U/L (Glucosa 10 g/L; extracto de levadura 0,5 g/L; y  $\text{CuSO}_4$  9 mg/L); Manganeso peroxidasa 25 U/L (Glucosa 2,5 g/L; extracto de levadura 0.6 g/L y  $\text{MnSO}_4$  15 mg/L) donde el extracto de levadura fue altamente significativas en el incremento de actividad.

## ABSTRACT

The production of REDOX enzymes was evaluated in 250 fungal strains of IIFB collection. Qualitatively 22% presented enzymatic activity on solid medium ABTS. The strands *Pestalotia sp* 2iQRJ and *Aspergillus niger* (141QD) were selected for presenting bigger development of oxidation halo with ABTS. The quantification was measured by spectrophotometric method, following the enzymatic oxidation of ABTS and DMP.

For the optimization of the culture conditions we worked with factorial designs, developed in basal medium, varying the concentrations of glucose, yeast extract, peptone and  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . *Aspergillus niger* (141QD) presented catalase

activity 4 U/L (glucose 5g/L; yeast Extract 1g/L), in shaking, during 10 days at 25 + 3°C and pH 6.

On the other hand, for the strand *Pestalotia sp* 2iQRJ (14 days of culture), laccase activity was quantified 129 U/L (Glucose 10 g/L; extract of yeast 0,5 g/L; and CuSO<sub>4</sub> 9 mg/L); Manganese peroxidase 25 U/L (Glucose 2,5 g/L; extract of yeast 0,5 g/L; and MnSO<sub>4</sub> 15 mg/L) where the yeast extract was highly significant in the activity increment.

## INTRODUCCIÓN

Las enzimas son catalizadores biológicos, es decir, proteínas que tienen la capacidad de acelerar ciertas reacciones químicas. En los últimos años su uso en gran cantidad de industrias ha adquirido gran relevancia. El desarrollo de técnicas y métodos para el desarrollo de estos procesos han sido un importante requisito para el avance en la enzimología en las últimas tres décadas y por muchos es considerada un arte <sup>5</sup>.

Actualmente en Bolivia, la producción de enzimas viene desarrollándose por los métodos de la biotecnología clásica que incluye dos etapas principales: la de fermentación, en la que se multiplica el microorganismo productor de la enzima, y la de recuperación y purificación, en la que se aísla la enzima y se lleva al grado de pureza adecuado para su uso, éste último en plena proyección, cuyo pionero es el Instituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímicas desde el año 1999.

Trabajos relevantes de investigación sobre producción de enzimas REDOX; Catalasa, Lacasa y Manganese peroxidasa, obtenidos a partir de cultivos fúngicos, han ayudado a lograr un mayor entendimiento sobre las cualidades que éstas brindan, cuyas aplicaciones industriales son variadas, basta mencionar algunas: relacionadas con procesos de designificación, detoxificación de suelos y efluentes industriales, oxidación de colorantes, etc; ya sea en forma libre, inmovilizada o cristalizada, confirman ampliamente lo fino y exquisito de las propiedades catalíticas asociadas a estas "micromáquinas".

La finalidad del presente estudio fue investigar la capacidad de producción de enzimas REDOX por los hongos del IIFB y encontrar mayores rendimientos, mediante la optimización de condiciones de cultivo a través del establecimiento de diseños factoriales categorizando variables físico-químicas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### MICROORGANISMOS FÚNGICOS

*Pestalotia sp* 2iQRJ y *Aspergillus niger* (141QD) fueron obtenidos de la colección de cepas del laboratorio de Biotecnología "Proyecto de Biodiversidad microbiana" del IIFB, aisladas de diferentes regiones del trópico del norte de La Paz, Durante el estudio, los cultivos fueron mantenidos en agar papa-dextrosa y buffer tanquay-glicerol a 4 -8°C, con resiembras cada mes.

Estas dos cepas fueron seleccionadas por su capacidad de producir enzimas REDOX, a través de un tamizaje primario cualitativo y un secundario cuali-cuantitativo.

### TAMIZAJE PRIMARIO CUALITATIVO, ACTIVIDAD ENZIMÁTICA REDOX

Para la evaluación y selección de hongos potenciales en la producción de enzimas redox, se estudiaron 250 cepas. La metodología fue la siguiente: Siembra en medio basal (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.6 g/L; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.5 g/L) suplementado con glucosa 1 g/L, extracto de levadura 0.5 g/L, agar 18 g/L y 25mg/100mL ácido 2-2'-Azino-bis (3-ethylbenzotiazolin-6-sulfonico) (ABTS).

### OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE CATALASA A PARTIR DE *Aspergillus niger* (141QD)

En base a un estudio preliminar de diseño Factorial 33, establecimos un juego de 27 frascos conteniendo 25 mL de medio de cultivo cuya composición fue: Glucosa 10g/L; Extracto de levadura 1g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.6 g/L y MgSO<sub>4</sub> 0.5 g/L. En el cual inoculamos 100 uL de una suspensión de *Aspergillus niger* (141QD) de concentración 106ufc/mL previamente homogenizado en vortex (Thermolyne, maximix plus).

La incubación fue desarrollada de forma agitada en shaker (Forma Scientific, orbital shaker) a 125 rpm, atemperada a 28°C; Cada 2 días, un frasco fue separado, filtrado al vacío y el micelio residual recuperado para la determinación de biomasa en peso húmedo, el que posteriormente fue lisado por el método mecánico del POTTER, el sobrenadante se guardó para la medición enzimática a 4°C.

### OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE LACASA Y MANGANESO PEROXIDASA A PARTIR DE *Pestalotia sp 2iQRJ*

Para comparar y evaluar la capacidad de producción de enzimas REDOX, se establecieron sistemas de cultivo en batch (cerrado), que se montaron en frascos de vidrio de una capacidad de 100 mL, cuyo volumen de cultivo fue 25 mL.

La optimización mediante diseño factorial consistió en el uso de tres variables químicas cuantitativas: glucosa, extracto de levadura, peptona y CuSO<sub>4</sub> respectivamente, en tres niveles cada uno (Ver Tabla No. 1)

De igual forma se procedió para la optimización de manganeso peroxidasa, la única variante fue la introducción de MnSO<sub>4</sub> como inductor.

El proceso fue determinado en el transcurso de 2 semanas, bajo condiciones de cultivo en estanco, medio basal, concentración constante de extracto de levadura 0.5g/L, pH inicial 6,5 a una temperatura de 25 ± 3 °C.

#### DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

##### DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALASA

La medida de actividad en líquido se realizó con un método espectrofotométrico basado en la disminución en la absorbancia a 240 nm<sup>4,10</sup>, durante la descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por la enzima (C<sub>240</sub> = 41M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>).

Una unidad de catalasa fue definida como la cantidad de enzima presente en el sobrenadante del cultivo líquido que reduce 1 micromol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto a 25°C.

La mezcla reacción consistió: 1200uL solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.18%, 20 uL de la muestra a analizar.

##### DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LACASA

La actividad lacasa fue determinada por oxidación del ácido 2-2'-Azino-bis (3-ethylbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) como sustrato. La mezcla reacción contenía 400 uL de buffer acetato 50mM (pH 3), 400 uL de H<sub>2</sub>O destilada, 100 uL de solución de ABTS 10 mM y 100 uL del sobrenadante del fermento fúngico.

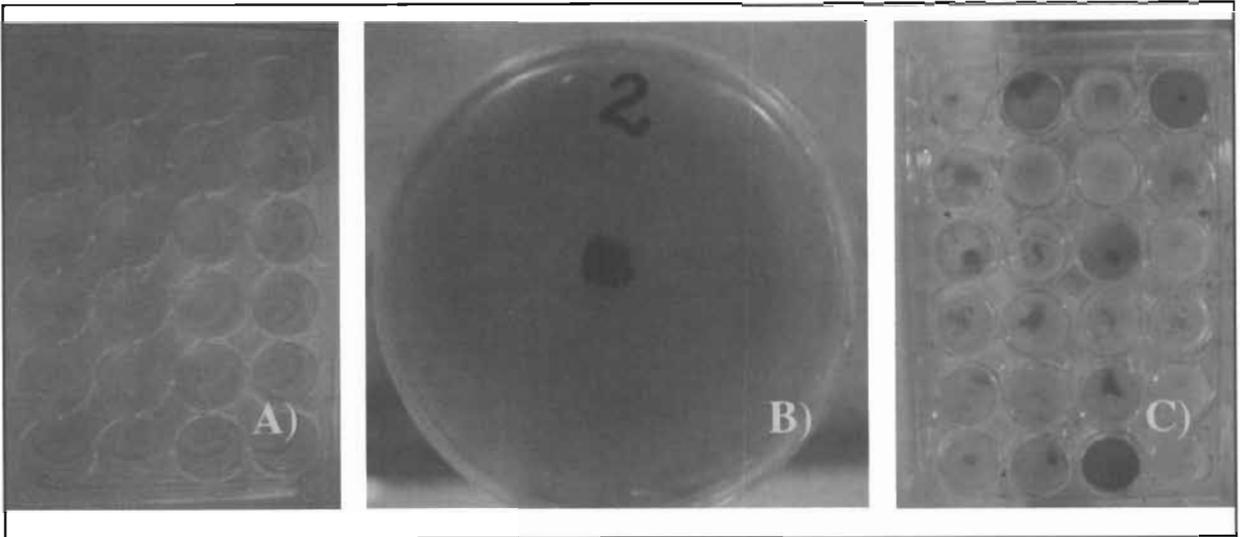
La oxidación del ABTS fue seguida por el incremento de la absorbancia a 420 nm. La actividad enzimática

TABLA No. 1  
OPTIMIZACIÓN DE PRODUCCIÓN DE LACASA A TRAVÉS DEL ESTABLECIMIENTO DE DISEÑO FACTORIAL, CEPA PESTALOTIA SP 2IQRJ

NIVEL		VARIABLES		
FACTORIAL	FRASCO	GLUCOSA	PEPTONA	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O
111	1	10	1	25
112	2	10	1	12.5
113	3	10	1	5
121	4	10	0.5	25
122	5	10	0.5	12.5
123	6	10	0.5	5
131	7	10	0.25	25
132	8	10	0.25	12.5
133	9	10	0.25	5
211	10	5	1	25
212	11	5	1	12.5
213	12	5	1	5
221	13	5	0.5	25
222	14	5	0.5	12.5
223	15	5	0.5	5
231	16	5	0.25	25
232	17	5	0.25	12.5
233	18	5	0.25	5
311	19	2.5	1	25
312	20	2.5	1	12.5
313	21	2.5	1	5
321	22	2.5	0.5	25
322	23	2.5	0.5	12.5
323	24	2.5	0.5	5
331	25	2.5	0.25	25
332	26	2.5	0.25	12.5
333	27	2.5	0.25	5

FIGURA No. 1

TAMIZAJE PRIMARIO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA REDOX DETERMINADA EN ESTADO SÓLIDO. (PLACAS DE 24 POZOS) A) CONTROL NEGATIVO B) CONTROL POSITIVO C) SCREENING DE 250 MUESTRAS



fue definida como la cantidad de enzima que puede oxidar 1 micromol de ABTS por minuto a 25°C ( $C_{420} = 36,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )<sup>1</sup>

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD MANGANESO PEROXIDASA**

La medida de actividad en líquido se realizó con un método espectrofotométrico basado en la oxidación del  $\text{Mn}^{+2}$  a  $\text{Mn}^{+3}$  moléculas altamente oxidantes, cuyo efecto se traduce en la oxidación del 2,6-dimetoxifenol, por parte de manganeso peroxidasa. Se definió como una Unidad de Actividad (UA) a la cantidad de enzima necesaria para producir 1  $\mu\text{mol}$  de producto oxidado en un minuto a 25°C. Como sustrato se utilizó 2,6-dimetoxifenol cuyo coeficiente es  $49.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a una  $\lambda$  de 470 nm (10,13). La mezcla reacción fue 400  $\mu\text{L}$  de buffer succinato 0.4 M (pH 5), 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 100  $\mu\text{L}$  de 2,6-dimetoxifenol (DMF), 100  $\mu\text{L}$   $\text{MnSO}_4$  1mM; 100  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  50mM y 100  $\mu\text{L}$  del sobrenadante del fermento, en volumen final de 1 ml.

**RESULTADOS**

**TAMIZAJE PRIMARIO CUALITATIVO, ACTIVIDAD ENZIMÁTICA REDOX**

Se estudiaron 250 cepas, provenientes de la colección existente en el laboratorio de Biotecnología "biodiversidad microbiana", la evaluación y selección de cepas potenciales productoras de enzimas REDOX fueron identificadas cualitativamente (Figura No. 1) por el cambio de coloración en el medio Agar-ABTS como consecuencia de la capacidad oxidativa.

**OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE CATALASA A PARTIR DE *Aspergillus niger* (141QD)**

Las mejores condiciones para la producción enzimática fueron: temperatura 28 y 30°C, pH 6 y cultivo agitado.

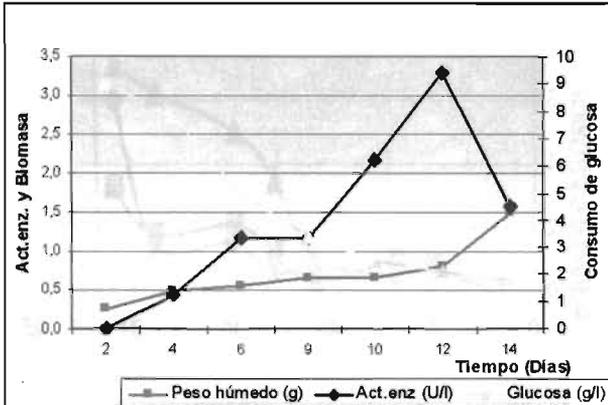
La Tabla No. 2 se resume la actividad determinada posterior a la lisis celular, provocada de forma mecánica, el empleo del potter resulta siendo la más óptima en comparación con los otros.

TABLA No. 2  
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALASA SEGÚN TIPO DE LISADO CELULAR

MEDICION CAT LISADO CELULAR		
CEPA	ABS	ACT. ENZ. U/L
22 QD potter	0.0044	1
22QD arena	0	0.00
141 QD potter	0.0379	10
141 QD arena	0.0022	1
Asp. potter	0.0052	1
Asp. arena	0.0066	2
Asp. sonificado	0.0193	5

FIGURA No. 2

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CATALASA EN RELACION DE LA BIOMASA Y CONSUMO DE GLUCOSA MEDIDO EN DÍAS.



La Figura No. 2 representa la relación existente entre el incremento de la biomasa, actividad enzimática y el consumo de glucosa expresado en días. De los cuales podríamos calcular la velocidad de crecimiento y el rendimiento.

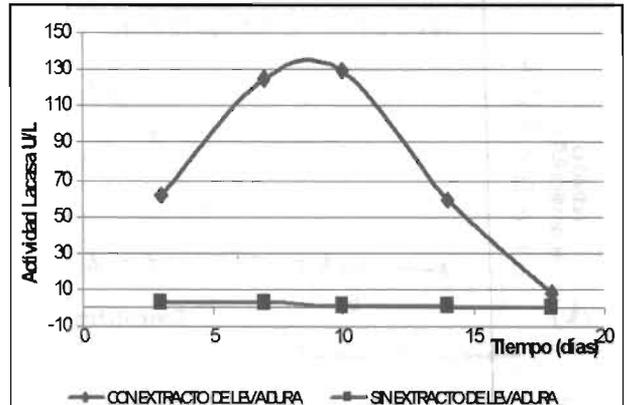
**OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE LACASA A PARTIR DE *Pestalotia sp 2iQRJ***

La presencia de la actividad lacasa en *Pestalotia sp 2iQRJ*, fue determinada por la reacción de fermento con ABTS, el incremento de la absorbancia a 420 nm. de longitud de onda.

La Figura No. 3 muestra la determinación del efecto del extracto de levadura sobre la actividad lacasa, obteniendo un máximo de actividad de 129 U/L al cabo de 10 días, en cambio en ausencia de éste vital componente la actividad máxima es 3 U/L.

FIGURA No. 3

CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO DE PESTALOTIA SP 2iQRJ, EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE EXTRACTO DE LEVADURA 0.5 G/L



**OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE LACASA A TRAVÉS DEL ESTABLECIMIENTO DE FACTORIAL 3<sup>3</sup>**

En la Figura No. 4, podemos apreciar el incremento de absorbancia, medida a 420 nm, por la oxidación del ABTS a causa de la enzima producida por la cepa *Pestalotia sp 2iQRJ*. En tal experimento obtuvimos un máximo de actividad de lacasa 33 U/L al cabo de 21 días.

**OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE LACASA A TRAVÉS DEL ESTABLECIMIENTO DE FACTORIAL 3<sup>2</sup>**

Bajo las condiciones de cultivo de éste sistema 32, la actividad se hizo evidente al cabo de 6 días. La determinación a los 14 días obtuvimos un máximo

FIGURA No. 4  
ACTIVIDAD LACASA DETERMINADA EN PESTALOTIA SP 2iQRJ

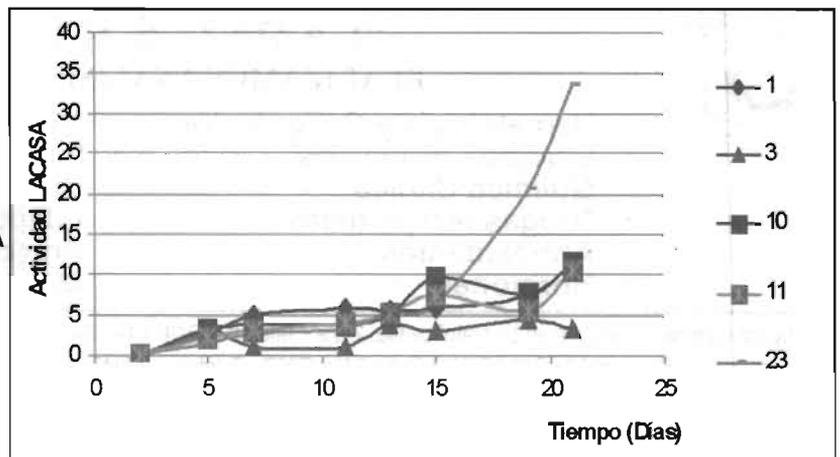


FIGURA No. 5

DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA 3!2.

A) PEPTONA 1G/L, B) PEPTONA 0.5 G/L Y C) PEPTONA 0.25G/L

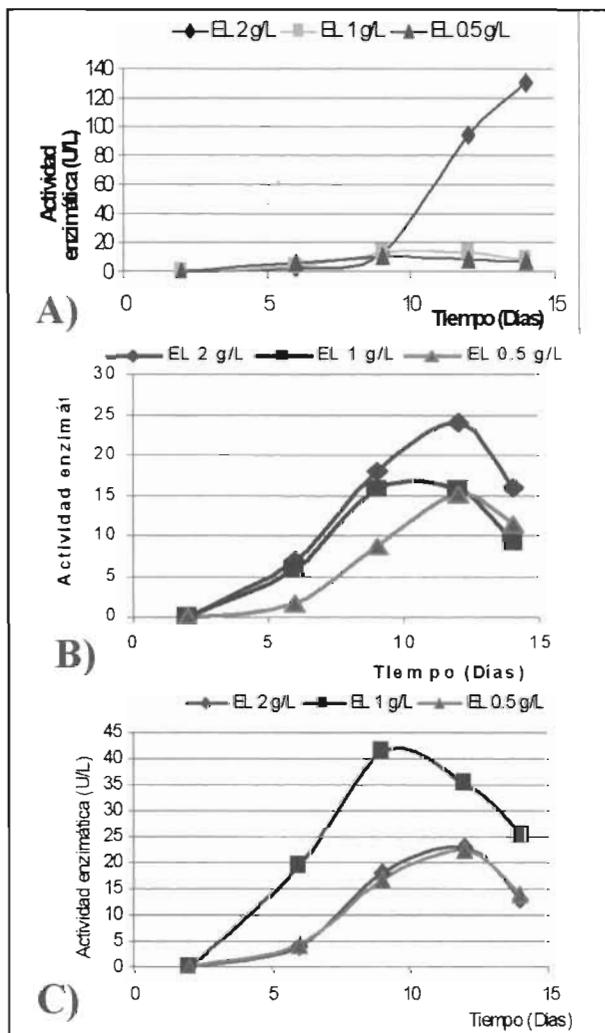
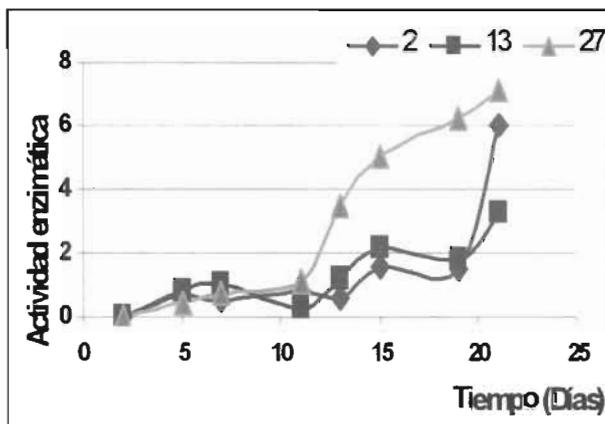


FIGURA No. 6

INCREMENTO DE LA ABSORBANCIA A 470 NM, A CAUSA DE LA OXIDACIÓN DE MN2+ A MN3+ Y DMF



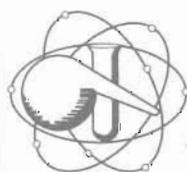
de actividad en el nivel 1 con 129 U/L cuyas características son: Medio basal, Glucosa 2 g/L, Peptona de soya 1g/L y CuSO45H2O 12mg/L.

Manteniendo constante la concentración de glucosa 2g/L, peptona 0.5 g/L, CuSO45H2O 12mg/L, se logró al cabo de 12 días 24 U/L. (Ver Figura No. 5).

De igual forma, variando la peptona a 0.25 g/L, y manteniendo constante la concentración de glucosa 2 g/L, CuSO45H2O 12mg/L, logramos al cabo de 9 días un máximo de 41 U/L.

**OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE MANGANESO PEROXIDASA A PARTIR DE *Pestalotia sp 2iQRJ***

La presencia de la actividad manganeso peroxidasa en *Pestalotia sp 2iQRJ*, fue determinada por el método método descrito anteriormente.



**LABORATORIOS DE ANÁLISIS CLÍNICOS  
"LA PAZ" S.R.L.**

**REALIZAMOS ANÁLISIS DE:**

- Hematología y Coagulación
- Líquidos orgánicos
- Química Clínica
- Drogas terapéuticas
- Antioxidantes
- Hormonas
- Microbiología y Hemocultivos
- Inmunología
- Drogas de abuso
- Infecciones por Elisa
- Prueba de Paternidad
- Marcadores Tumorales

Oficina Central: Plaza Isabel La Católica No. 2479 • Teléfonos 2441844 - 2441264 - 2441435 - 2441982 • Fax 591-2211-2743

Sucursal 1: CALACOTO Calle 9 No. 7887 • Teléfono: 2784644 • Telf. EMERGENCIA: 715 32317

Sucursal 2: MIRAFLORES Calle Hugo Estrada No. 004 - Edif. Providencia 2do. Mezzanine Oficina No. 3 • Teléfono 2226728

WEB: [www.laboratorioslapaz.com](http://www.laboratorioslapaz.com)

Los niveles 2, 13 y 27 (Figura No. 6) revelaron mayor actividad Mn peroxidasa. Al cabo de 21 días obtuvimos 6, 3 y 7 U/l respectivamente. Las características fueron: Glucosa 10g/L; Peptona 2g/L, MnSO<sub>4</sub> 12.5mg/L, Extracto de levadura 0.5g/L.

## DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos, es importante resaltar que la cepa *Aspergillus niger* (141QD) y *Pestalotia sp 2iQRJ* poseen gran capacidad de producción enzimática REDOX, el primero existente en la colección del laboratorio y el segundo aislado y purificado de la población microbiana existente en la hojarasca del cacao (*Theobroma cacao* L.), a quienes se les atribuye la responsabilidad de causar la podredumbre blanca. Este tipo de hongos se caracterizan por poseer un sistema enzimático extracelular de carácter no específico capaz de degradar un polímero tan irregular como la lignina.<sup>5,11</sup>

Ahora bien, en nuestro caso la obtención de 4 U/L de catalasa (Figura No. 2) resulta ser un valor que requiere análisis minucioso, ya que comparando con otros estudios muestran resultados similares en estudios a pequeña escala<sup>4,6</sup>, mientras que desarrollando sistemas de biorreactores donde el control automatizado de variables importantes como la temperatura, agitación, luz, oxigenación, pH y oligoelementos, se hace notable el incremento de actividad hasta un 30%<sup>2,7,8</sup>.

En el caso de la lacasa la obtención de 129 U/L (Figura No. 3 y No. 4) representa un valor muy importante, bajo condiciones descritas anteriormente, ya que comparando con otros estudios (7,10) muestran: 27 U/L de *Pleurotus ostreatus*; 30 U/L *Peniophora sp* de tal forma que podríamos concluir que las mejores condiciones de cultivo para 2i QR fueron: glucosa 10g/L, extracto de levadura 0,5 g/L y CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 9mg/L.

Finalmente en la determinación de manganeso peroxidasa de la cepa *Pestalotia sp 2iQRJ* (Figura No. 6), a través del establecimiento del diseño factorial, la actividad enzimática fue seguida durante catorce días, se obtuvo 25U/L de un cultivo cuya composición fue: glucosa 2,5g/L, peptona 0,5g/L y MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 15mg/L.

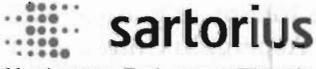
Las actividades manganeso peroxidasa (MnP) y lacasa obtenidas en los medios con inductores fueron muy superiores a las obtenidas en medio basal sin Mn<sup>+2</sup> o Cu<sup>+2</sup> (Figura No. 3) La inducción por este tipo de compuestos fue probada en varios estudios con diferentes hongos aislados de procesos de pudrición blanca<sup>11,14</sup>. Específicamente en *Pestalotia sp 2iQRJ* las actividades lacasa y MnP aumentan en presencia de este dicatión.

Muchos estudios reportan la aplicabilidad industrial emergente de este tipo de enzimas, en especial la



**COMTEC**  
Compañía Técnica y Comercial S.R.L.

---

 <p><b>Fisher Scientific Worldwide</b> Equipos, Materiales y Reactivos para Laboratorios</p>  <p>Microscopios para Laboratorios</p> <p><b>ThermoElectron</b> Centrífugas, Medidores de pH, Conductividad, Freezers, Incubadoras</p>  <p>Lectores y Lavadores de ELISA</p>  <p>Soluciones para control de contaminación en áreas críticas y de producción para laboratorios farmacéuticos Material de limpieza libre de pelusas, Paños absorbentes</p>	 <p><b>SIGMA-ALDRICH</b> Reactivos para Laboratorios</p>  <p><b>Denver Instrument Company</b> <i>Precision laboratory instruments since 1880</i> Balanzas Analíticas y de Precisión</p>  <p><i>Protecting your laboratory environment</i> <b>LABCONCO</b> Campanas de Flujo Laminar, Liofilizadores, Rotaevaporadores</p>   <p>Membranas y Equipos para Filtración</p>
---	--

---

**Certificado y con ISO 9001**

Av. Arce esq. Campos • Edif. Illimani I. Mezzanine Oficina N° 12  
Teléfono No.: (02) 243 1012 • Fax No.: (02) 243 4335  
Linea Gratuita No. 800 10 4844 • E-mail: [comte@entelnet.bo](mailto:comte@entelnet.bo) • La Paz - Bolivia

lacasa, MnP y la catalasa. Aplicaciones en el campo del tratamiento de efluentes, <sup>11, 12, 13</sup> del complejo enzimático (MnP), enzima clave en el mecanismo oxidativo de *Pestalotia sp* 2iQRJ.

Por el momento se desconoce el mecanismo exacto de acción de dichos hongos, si bien se ha asociado a la presencia de diferentes enzimas extracelulares, MnP, lignina peroxidasa (LiP) y lacasa, secretadas por el hongo en condiciones nutricionales definidas.

### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la cooperación del proyecto "Biodiversidad microbiana" del programa UMSA, ASDI-SAREC de Suecia y la beca otorgada por el "IRD" (Institut de Recherche et du Développement) de Francia a Juan E. Calle Nina para estudios de maestría. IFS International Foundation for Science.

Los autores agradecen a todo el personal dependiente del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas IIFB de la Facultad de Farmacia y Bioquímica en la totalidad de sus unidades, sin olvidarnos de la cooperación del Proyecto de investigación CATIE, Costa Rica.

### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Childs, R. and W. Bardsley. The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen. *Biochem. J.* 1975; 145, 93-103.
2. Fiedurek J, Gromada A. Production of catalase and glucose oxidase by *Aspergillus niger* using unconventional oxygenation of culture. *J Appl Microbiol.* 2000 Jul;89(1):85-9
3. Han, M.-J., H.-T. Choi and H.-G. Song. Degradation of phenanthrene by *Trametes versicolor* and its laccase. *J. Microbiol.* 2004; 42, 94-98.
4. Liu JZ, Huang YY, Liu J, Weng LP, Ji LN. Effects of metal ions on simultaneous production of glucose oxidase and catalase by *Aspergillus niger*. *Lett Appl Microbiol.* 2001;32(1), 16-9
5. Mendoza L. Degradación de fenantreno, naftaleno y benzopireno por acción de dos basidiomicetos. Tesis de Maestría, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia 2005
6. Pedrini, N., Juarez, M. P., Crespo, R., de Alaniz, M. J.T. (2006). Clues on the role of *Beauveria bassiana* catalases in alkane degradation events. *Mycologia* 98: 528-534
7. Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Scaloni A, Capasso A & Sannia G (1977) A novel laccase from *Pleurotus ostreatus*. *J. Biol. Chem.* 272: 31301-31307.
8. Shin, K.S. and Y.J. Lee. Purification and characterization of a new member of the laccase family from the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 2000; 384, 109-115.
9. Shin, K.S. The role of enzymes produced by white-rot fungus *Irpex lacteus* in the decolorization of the textile industry effluent. *J. Microbiol.* 2004; 42, 37-41.
10. Shuttleworth, K.L. Postie, L. and Bollag, J.M. "Production of induced laccase by the fungus *Rhizoctonia praticola*," *Can. J. Microbiol.*, vol.32, pp.867-870. (1986)
11. Soares GM, de Amorim MT, Costa-Ferreira M. Use of laccase together with redox mediators to decolourize Remazol Brilliant Blue R. *J Biotechnol* 2001; 89:123-129.
12. Terrazas E. Fungal Redox Enzymes Involved in the Oxidation of Organic Pollutants. Tesis de Doctorado, Universidad de Lund, Lund Suecia 2005
13. Urra J; Sepúlveda L.; Contreras E; Palma C. Screening of static culture and comparison of batch and continuous culture for the textile dye biological decolorization by *Phanerochaete chrysosporium* Braz. *J. Chem. Eng.* 2006;23,281-290
14. Wolfenden, R.S. and Wilson, D.L. "Radical cation as reference chromogens in the kinetic studies of one electron transfer reaction," *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, vol.II, pp.805-812. (1982)
15. Xiao, Y., X. Tu, J. Wang, M. Zhang, Q. Cheng, W. Zeng, and Y. Shi. Purification, molecular characterization and reactivity with aromatic compounds of a laccase from basidiomycete *Trametes sp.* strain AH28-2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2003; 60, 700-707.