



ALCOHOL DESHIDROGENASAS FUNGICAS: PAPEL FISIOLÓGICO Y POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

FUNGAL ALCOHOL DEHYDROGENASES: THEIR PHYSIOLOGICAL ROLE AND BIOTECHNOLOGY POTENTIAL

**Gloria Angélica González Hernández, Juan Carlos Torres Guzmán, J. Félix Gutiérrez
Corona y Roberto Zazueta Sandoval.**

Departamento de Biología. División de Ciencias Naturales y Exactas. Campus Guanajuato.

Universidad de Guanajuato. Tel. 473 732 0006 e-8152. gonzang@quijote.ugto.mx;

torguz@quijote.ugto.mx; felixg@quijote.ugto.mx; zazueta@quijote.ugto.mx.

Resumen

En el presente trabajo se revisan los avances en la investigación y desarrollo de enzimas oxidorreductasas, particularmente las alcohol deshidrogenasas, para determinar su importancia fisiológica y participación en diferentes procesos metabólicos como son: biosíntesis de etanol, patogenicidad de hongos entomopatógenos y fitopatógenos y en la catálisis del segundo paso de la ruta de biodegradación de hidrocarburos aromáticos.

Palabras clave: alcohol deshidrogenasa, biocontrol, medio ambiente.

Abstract

In this work the advances in research and development of oxidoreductases, particularly alcohol dehydrogenases to determine its physiological relevance and participation in different metabolic processes such as: biosynthesis of ethanol, pathogenicity of phytopathogenic and entomopathogenic fungi, and in the second catalytic step in the aromatic hydrocarbon biodegradation pathway are reviewed.

Key words: Alcohol dehydrogenase, biocontrol, environment.



La región del Bajío constituye una de las zonas agrícolas e industriales más importantes del país. La presencia de plagas, enfermedades y malezas de los cultivos, es uno de los factores que más influyen en la productividad agrícola de la región. El control fitosanitario tradicional eleva ampliamente los costos de producción de un determinado cultivo, haciendo que en muchos casos se abandonen actividades agrícolas por considerarlas incosteables, por lo que el gobierno del estado de Guanajuato en acciones de sanidad invirtió \$17'526,000.00 con el objetivo de brindar las herramientas de apoyo a los agricultores y optimizar recursos de manejo fitosanitario de los cultivos (4° Informe de Gobierno del Estado de Guanajuato, 2004, www.guanajuato.gob.mx/gestiones/romerohicks). Por otra parte, la contaminación ambiental generada por el empleo de agroquímicos para el control de plagas y por diversas actividades industriales, como la de refinación de petróleo (especialmente en Salamanca y sus alrededores) afecta a la actividad agrícola, los ecosistemas y la salud del hombre. Actualmente, a nivel mundial se está considerando aplicar o ya se aplican, procesos basados en el empleo de microorganismos y/o sus productos para solucionar estas problemáticas (Glazer y Nikaido, 2007).

Debido entonces a la trascendencia económica, de salud y ambiental que han adquirido los microorganismos, es muy importante incrementar el conocimiento sobre sus procesos celulares fundamentales (por ej. procesos metabólicos y de obtención de energía o de crecimiento y diferenciación), así como los mecanismos bioquímicos y moleculares básicos que utilizan en su interacción con otros agentes biológicos y con diversas sustancias químicas, para desarrollar nuevos procesos y herramientas, seguros y eficientes que permitan sustituir pesticidas químicos en el control de insectos, la degradación/transformación de compuestos recalcitrantes (como el petróleo y sus derivados), y la mejora de procesos industriales de producción de destilados, entre otras muchas aplicaciones; que repercutan en la mejora de nuestro entorno. Estos aspectos se han beneficiado enormemente de los avances recientes en la obtención de la secuencia nucleotídica de cientos de genomas microbianos y por el desarrollo de nuevas tecnologías de estudio, tales como el análisis genómico, transcriptómico, proteómico y metabolómico (Glazer y Nikaido, 2007).

La identificación de genes y sus productos, así como la demostración de su función en distintos procesos celulares, como el metabolismo energético, la diferenciación, el crecimiento, la



patogenicidad y la degradación de hidrocarburos o la remoción de metales pesados, son aspectos importantes para la comprensión de dichos procesos y para el desarrollo de las herramientas necesarias para establecer estrategias adecuadas de mejoramiento genético de los microorganismos, para hacerlos más efectivos en el control de plagas (Torres Guzmán y col., 2008), contrarrestar su virulencia en el caso de fitopatógenos o para incrementar su potencial de eliminación de contaminantes y de regeneración del ambiente (Gutiérrez Corona y Cervantes Vega, 2008; Zazueta Sandoval y col., 2008b).

Las enzimas, como catalizadores naturales poseen características especiales, tales como especificidad, reactividad y otras de índole fisicoquímica, como lo son sus propiedades catalíticas y biológicas, las cuales son muy apreciadas y por ello muy utilizadas en diferentes procesos de aplicación tanto industrial, como médica. El uso de las enzimas ya sea previamente purificadas o como parte de extractos o en células vivas, ha sido desarrollado en procesos catalíticos industriales económicamente viables y por supuesto amigables con el medio ambiente, yendo a la par con el rápido avance y expansión de la biotecnología moderna (**Tabla 1**).

Las oxidoreductasas bacterianas como hidrolasas, liasas y transferasas, tienen un alto potencial por su aplicación en diferentes aspectos de la protección al medio ambiente (Gianfreda y col., 1999; Boyd y col., 2001; Ahuja y col., 2004); otras enzimas, como la alcohol deshidrogenasa, forman parte de la maquinaria metabólica importante para la producción industrial de solventes (Shi y Blaschek, 2008) y de biocombustibles (Hanai y col., 2007).

En el Cuerpo Académico “Aspectos Fundamentales y de Biotecnología de Hongos y bacterias”, se han desarrollado diferentes proyectos involucrando uno de los grupos de las óxido-reductasas mostradas en la Tabla 1, las alcohol deshidrogenasas. Estos estudios se han realizado mediante enfoques de bioquímica, biología molecular y genética para determinar la presencia, regulación de la producción y papel fisiológico de la alcohol deshidrogenasa (ADH) en los hongos filamentosos *Mucor circinelloides*, *Fusarium oxysporum* y *Metarhizium anisopliae* y el efecto de la sobre-expresión del gen ADH1 durante la fermentación etanólica en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabla 1. Diferentes tipos de oxidoreductasas con aplicaciones en procesos industriales (Modificado de Xu, 2005).



Oxidoreductasas	Características catalíticas	Aplicaciones	Referencia
Oxidadasas	Oxidadasas libres de Cofactor, Tiol oxidadasas, Oxidada que contienen Cu- o Flavinas, oxidadasas con centros Redox múltiples.	Panadería Diagnóstico clínico Biosensores	Sugio y col., 2002. Groeger y Hummel 2004. Xu, 1999.
Peroxidasas	Heme peroxidasas, Catalasa, Haloperoxidasas, otras peroxidasas.	Industria textil Detergentes Industria alimentaria Biosensores Biodescontaminación	Xu y Salmon 2000. Hiramoto y Abe 2004. Hoegh 2004. Xu, 1999. Xu y col., 2004.
Oxigenasas/ Hidroxilasas	Oxigenasas libres de Cofactores, oxigenasas que contienen S, Fe-, Cu- o Flavinas, oxigenasas con centros multiples redox?	Industria textil Biosensores Biodescontaminación Síntesis quiral/asimétrica	Xu y Salmon 2000 Xu, 1999. Xu y col., 2004. Nanda y Yadav 2003.
Deshidrogenasas /Reductases	contienen Flavinas, Quinonas, o Zn, que contienen multiples centros redox, Aldo-Ceto Reductasas, reductasas que contienen Cu o Flavinas.	Biosensores Biodescontaminación Síntesis quiral/asimétrica	Xu, 1999. Xu y col., 2004. Nanda y Yadav 2003.

Mucor circinelloides

La alcohol deshidrogenasa (ADH) es una oxido-reductasa de importancia básica y biotecnológica, que ha sido objeto de intensa investigación en diferentes organismos, debido a que su producción se regula a través del desarrollo y/o de condiciones ambientales, existiendo en



muchos casos isoformas de la enzima que difieren en sus propiedades bioquímicas y fisiológicas, algunas de ellas implicadas en la producción de etanol y otras en la oxidación de este compuesto (Jörnvall y col., 1987; Reid y Fewson, 1994). En nuestro grupo de trabajo (Torres Guzmán y col., 1994; Zazueta Sandoval y col., 1999) y en otros grupos (Borgia y col., 1985) se ha investigado la presencia de la ADH en especies dimórficas del género *Mucor*, en las cuales las esporas al germinar pueden diferenciarse hacia la fase de levadura o la de micelio, según las condiciones de cultivo (Orłowski, 1991). Estudios bioquímicos y fisiológicos realizados en nuestro laboratorio con mutantes deficientes en la ADH de los hongos *Mucor rouxii* (Torres Guzmán y col., 1994; Zazueta Sandoval y col., 1999) y *Mucor circinelloides* (Meza Carmen, 1999; Mendoza Hernández, 2003; Rangel Porras y col., 2005) han indicado que la enzima es dependiente de NAD^+ , esta involucrada en la producción de etanol y es esencial para el crecimiento en anaerobiosis. Tanto en *M. rouxii* (Zazueta y col., 1999) como en *M. circinelloides* (Meza Carmen, 1999) en su forma activa, la ADH se estructura como un homotetrámero con subunidades de 43 y 37.5 Kda, respectivamente. Posteriormente, mediante el enfoque de genética reversa se ha clonado el gen *adh1*, que codifica la enzima ADH dependiente de NAD de *M. circinelloides* (Rangel Porras y col., 2005). Es de nuestro interés establecer el papel de la enzima ADH del hongo *M. circinelloides* en la oxidación de alcoholes y conocer si la misma puede ser utilizada en sistemas heterólogos en la producción y/o la oxidación de dichos compuestos.

En la cepa YR-1 de *M. circinelloides*, nativa de sitios contaminados con hidrocarburos, los estudios se han enfocado a conocer la influencia de diferentes tipos de compuestos (alcoholes e hidrocarburos alifáticos y aromáticos), sobre la producción de la(s) enzima(s) ADH que utiliza(n) como sustrato alcoholes de cadena larga y dihidrodioles, involucradas en las rutas de degradación de hidrocarburos alifáticos o y aromáticos, respectivamente. También, las enzima(s) se han purificado parcialmente y se han caracterizado respecto de parámetros cinéticos y biofísicos (Zazueta Sandoval, 2008)

Estos estudios indicaron la presencia de varias ADHs dependientes de NAD y de NADP, las cuales se localizan en la fracción citosólica del hongo. En el caso de las isoformas dependientes de NAD el patrón observado mediante zimogramas fue distinto, dependiendo de la fuente de carbono (glucosa, decanol o hexadecano) y del sustrato empleado para revelar la actividad (metanol, etanol, propanol, butanol, pentanol, glicerol, alcohol isopropílico,



etilenglicol, alcohol fenético, alcohol bencílico, metil propanol, alcohol isoamílico, propilenglicol, decanol, alcohol estearílico, colesterol, manitol Polietilenglicol, alcohol cetílico y sorbitol). En base a las movilidades electroforéticas relativas de las ADHs observadas, se puede suponer que ocurre la inducción de algunas de ellas por las fuentes de carbono probadas. En el caso de las ADHs dependientes de NADP, se observó que su producción es influida por la fuente de carbono, como glucosa, decanol o hexadecano. El análisis del nivel de actividad de ADH mediante ensayos espectrofotométricos indicó que el nivel de la misma es alto en micelio obtenido en medio con decanol y bajo en micelio obtenido con glucosa o hexadecano. El análisis de la actividad de ADH mediante zimogramas reveló que en presencia de decanol se producen diferentes actividades, que pueden utilizar como substrato alcoholes aromáticos o alifáticos (Montiel González, 2008). Estos resultados indican que la cepa YR-1 de *M. circinelloides* posee una amplia variedad de ADHs, que posiblemente forman parte de una maquinaria metabólica adaptable para la degradación y utilización de hidrocarburos aromáticos y alifáticos, así como de alcoholes.

Fusarium oxysporum

El genero *Fusarium* se describe como patógeno de plantas, ampliamente distribuido tanto en suelos naturales como cultivados y ha sido aislado de suelos muy diversos, así como de sustratos orgánicos (Booth, 1971). *Fusarium oxysporum* es la especie de mayor importancia agronómica y es la que presenta mayor grado de diversidad patogénica, ya que es capaz de parasitar a más de 120 especies vegetales entre angiospermas y gimnospermas (Blanco, 1996). Esta especie incluye tanto saprófitos estrictos que colonizan tejidos dañados o senescentes así como patógenos virulentos que provocan los síntomas característicos de la enfermedad llamada fusariosis, donde las esporas de este hongo se adhieren a la raíz de su hospedero diferenciándose a una hifa infectiva y penetrando hasta el sistema vascular de la planta provocando que esta se marchite y muera (Beckman, 1987). En *F. oxysporum* existen aislados a los que se ha denominado como *formae speciales*, que poseen la capacidad de parasitar específicamente a una especie vegetal determinada (Booth, 1971). Para el presente estudio es de interés la *formae speciales lycopersici*, que infecta específicamente a la planta del tomate (jitomate), que es una de



las más estudiadas desde varios puntos de vista y para la cual se han desarrollado herramientas para su manipulación genético-molecular (Brown y Holden, 1998).

Se clonó el gen *adh1* de *F. oxysporum* y se analizó su expresión en cultivos *in vitro* con diferentes fuentes de carbono y durante ensayos de infección en plantas de tomate; el nivel más alto de expresión del gen ocurrió en baja tensión de oxígeno, en medio con glucosa o con etanol como única fuente de carbono (Rangel Porras y col., 2005; Corrales Escobosa, 2009). Por otra parte, el transcrito de dicho gen fue detectado en raíces de tomate a tiempos tempranos y tardíos de infección, en tanto que en hojas solo se detectó a tiempos tardíos (Corrales Escobosa, 2009). El aislamiento y caracterización de mutantes de *F. oxysporum* deficientes en la actividad ADH1 indicó que la enzima actúa como fermentativa o como oxidativa, dependiendo de la fuente de carbono, y que dicha actividad enzimática se requiere para una colonización normal de la planta de tomate, posiblemente por su participación como enzima fermentativa para la regeneración de NAD durante la infección (Corrales Escobosa, 2009).

Metarhizium anisopliae

Los hongos del género *Metarhizium* se han aislado de insectos infectados y de suelos de todos los continentes excepto la Antártida (Roberts y St. Leger, 2004). La patogenicidad insecticida de *M. anisopliae* no es determinada por un solo factor, sino que es dependiente de una interacción coordinada de muchos determinantes distintos de patogenicidad e incluso factores del hospedero (Shah y col., 2003). Los conidios de *M. anisopliae* son la forma infectiva, se adhieren a la cutícula de sus hospederos y germinan para iniciar el proceso de infección formando tubos de germinación. El alargamiento apical se detiene y el ápice se hincha para formar un apresorio, estructura de adhesión y producción de enzimas que ayudan a penetrar la cutícula del huésped y establecer una relación nutricional con él (Wang y St. Leger, 2005). Del apresorio emerge la hifa infectiva para penetrar la cutícula y llegar al hemocele del insecto, donde crece invadiendo todos los tejidos. Cuando los nutrientes se agotan, el micelio emerge hacia el exterior del exoesqueleto formando nuevos conidios capaces de infectar otros insectos y reiniciar así el ciclo de vida (Clarkson y Charnley, 1996).

En la hemolinfa del insecto la tensión de oxígeno es baja (Nation, 2001) de modo que la gémula se enfrenta a cambios en la disponibilidad de O₂ y nutrientes. *M. anisopliae* durante el



proceso de invasión, podría ajustar su metabolismo en el cual la actividad fermentativa y/o oxidativa de la ADH podrían ser importantes para apoyar el crecimiento del hongo. En estudios realizados en nuestro grupo se demostró que *M. anisopliae* tiene mayor actividad de ADH dependiente de NAD^+ y produce más etanol en condiciones de micro-aerobiosis (Callejas Negrete, 2000). La purificación de la proteína ADH1p de *M. anisopliae* y el estudio de sus características cinéticas indican que en condiciones fisiológicas es una ADH fermentativa (Callejas Negrete y col., 2002).

*¿Para qué *M. anisopliae* requiere ADH?*

El gen denominado *adh2*, que produce un transcrito de 1300b, su expresión es regulada por la disponibilidad de oxígeno, concordando con lo observado a nivel de actividad. Este gen también se expresa, aunque a bajo nivel, durante el proceso de invasión al insecto de prueba *Plutella xylostella*. Los estudios de interrupción de la expresión del gen mediante antisentido, mostraron que estos transformantes, los cuales tienen nivel de mensajero y actividad de ADH disminuidos, fueron resistentes al alcohol alílico, fenotipo característico de mutantes carentes de actividad de alcohol deshidrogenasa. Otro fenotipo interesante mostrado fue una disminución de la eficiencia para matar al insecto hospedero *P. xylostella* (**Figura 1**) indicando que la actividad de ADH es importante en el proceso de patogenicidad para apoyar el crecimiento del hongo, por lo que puede ser considerado como un determinante de patogenicidad (Callejas Negrete y col., 2005). Esta función de la ADH en *M. anisopliae* es apoyada por el hecho de que otra oxido-reductasa, la alcohol-oxidasa del fitopatógeno *Cladosporium fulvum* ha sido reportada como un factor de patogenicidad (Segers y col., 2001), y se ha descrito que en distintos organismos la actividad de ADH fermentativa favorece el crecimiento y/o supervivencia en condiciones de hipoxia (Kelly y col., 1990; Ismond y col., 2003). Como estudio complementario sería deseable evaluar la sobre-expresión del gen *adh2* en el proceso de patogenicidad de *M. anisopliae* a sus hospederos.

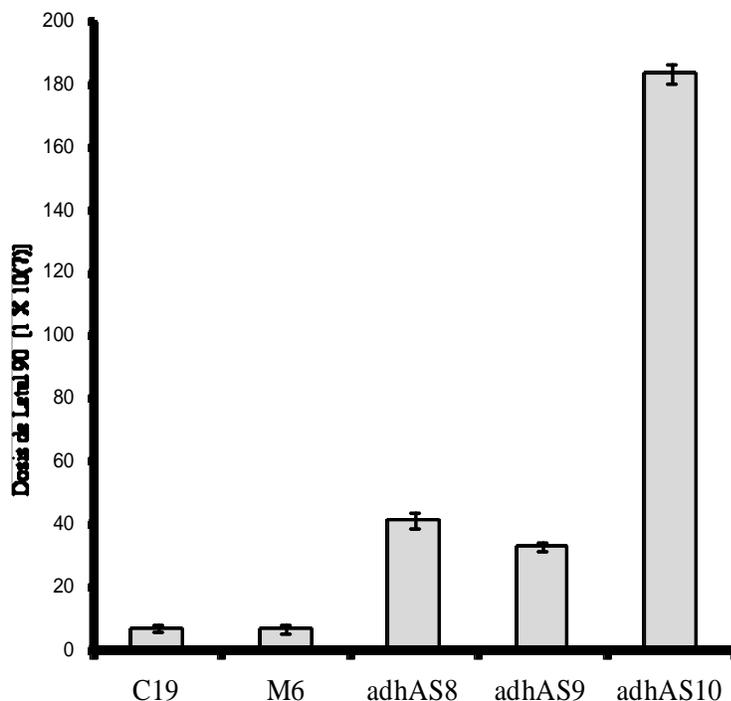


Figura 1. Determinación de la Dosis Letal Noventa (DL90) de las transformantes *adh1* antisentido de la cepa CARO19 de *M. anisopliae*. Larvas del insecto *P. xilostella* se infectaron con conidios de la cepa CARO19 de *M. anisopliae* y de las transformantes *adhAS8*, *adhAS9* y *adhAS10*. Se cuantificó las larvas muertas. La DL90 (dosis requerida para matar al 90% de la población de insectos) se determinó mediante el programa Probit del paquete estadístico SAS. La cepa M6 se usó como control, proviene de la transformación de *M. anisopliae* con el vector pGG247 (mutM) que tiene las mismas características de pGG300 (*adhAS*) excepto que no contiene el *adhAS*.



APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

***Mucor circinelloides* cepa YR-1, regeneración de suelos contaminados por hidrocarburos**

Es importante resaltar el hecho de que para hongos filamentosos se han propuesto modelos, para ubicar intracelularmente las enzimas de la ruta de degradación de los hidrocarburos, situando en el caso de los alifáticos a la mono-oxigenasa en microsomas y en peroxisomas, tanto a la alcohol graso-oxidasa (AGO) como a la aldehído deshidrogenasa (Sheller y col., 1998). En el caso de los hidrocarburos aromáticos, solo se menciona el sistema microsomal como sitio de localización de la di-oxigenasa, pero no existe una propuesta que unifique los criterios y defina la localización de la ruta. Así como tampoco se ha descrito la identificación de la segunda enzima de la ruta, la dihidro-diol deshidrogenasa (DHD). En particular en las reacciones de degradación de hidrocarburos aromáticos que son catalizadas por oxigenasas, se incluyen cadenas de transferencia de electrones (Gibson y Perales, 2000), eliminación de hidrogeno e inserciones de oxigeno (lo cual puede inducir a la apertura de los anillos aromáticos),

Por lo anteriormente expuesto, nuestro grupo de trabajo se ha enfocado al estudio de la ruta de degradación de hidrocarburos tanto aromáticos como alifáticos, usando como modelo de trabajo una cepa de un hongo filamentoso denominada YR-1, y que fue aislada de un suelo contaminado con petróleo. En el laboratorio hemos realizado estudios moleculares que nos han permitido caracterizar la cepa como *Mucor circinelloides*. Hemos logrado establecer que tanto las AGO como la DHD se inducen por la presencia de hidrocarburos en el medio de cultivo y que, la glucosa ejerce un efecto de regulación negativa en ellas (Rodríguez-Robelo y col., 2004).

La continuidad de éste proyecto, nos ha conducido a la exploración de los mecanismos metabólicos necesarios para que puedan ser biodegradados los hidrocarburos tanto aromáticos, como alifáticos, estableciendo las técnicas indispensables para poder detectar y/o determinar las actividades enzimáticas involucradas y desarrollando las metodologías para la identificación por medio de zimogramas tanto de las mono y di-oxigenasas, (Zazueta y col., 2003), como para la medición espectrofotométrica e identificación por zimogramas de las AGO (Alvarado-Caudillo y col., 2002), y su localización intracelular (Silva y col., 2009).

En éste sentido, nuestro objetivo principal consiste en estudiar los diferentes pasos enzimáticos involucrados en la ruta de degradación de los hidrocarburos tanto aromáticos, como



alifáticos en este hongo filamentoso, tratando de establecer su caracterización bioquímica, así como su localización intracelular, con lo que se pretende establecer las bases para proponer un modelo que explique el destino de los hidrocarburos después de haber sido incorporados al interior de la célula y, poder utilizar la cepa YR-1 como un potencial biorremediador de suelos contaminados con petróleo. No obstante, en forma concomitante, se han logrado obtener resultados de otras enzimas importantes involucradas en el estrés oxidativo (Zazueta y col., 2008a) el metabolismo del glicerol (Camacho-Morales y col., 2009).

***Metarhizium anisopliae*, agricultura orgánica y preservación del ambiente**

Las cepas de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* han sido modificadas genéticamente, obteniéndose cepas más virulentas debido a la sobre-expresión de genes que codifican para proteasa, una proteína quimera quitinasa::proteasa y la neurotoxina del alacrán (St. Leger y col., 1996; Fang y col., 2009; Wang y St. Leger 2007), entre otros, sin comprometer su especificidad de huésped. En este tema de oxido reductasas, en el grupo de trabajo hemos generado cepas genéticamente modificadas las cuales están en proceso de evaluación para determinar, entre otros parámetros, su eficiencia en el control de plagas. La construcción de cepas más virulentas, más resistentes a las condiciones ambientales, más eficientes en conidiación y/o más rápidas, impacta directamente en los costos del control biológico de plagas (CB), el cual en sí es al menos un 60% ms económico que los pesticidas químicos, al ser más eficientes en alguna(s) de las características mencionadas, abate aun más los costos del control de plagas bajando significativamente los costos de producción agrícola ya que este rubro es uno de los mas significativos en esta actividad. Y al ser más eficientes los biopesticidas impactará en un mayor uso del CB y reducción del uso de pesticidas químicos, favoreciendo la conservación del ambiente.

***Saccharomyces cerevisiae*, producción de etanol**

En el caso de la levadura *S. cerevisiae*, fermentadora por excelencia, utilizando cepas de uso industrial en la fermentación del jugo de agave para la producción de tequila o mezcal, mediante la sobreexpresión de varios genes entre ellos el gen *adh1* el cual codifica para la alcohol deshidrogenasa fermentativa de esta levadura, generamos cepas genéticamente



modificadas con capacidad fermentativa mejorada (Gutiérrez-Lomelí y col., 2008; Cira-Chávez y col., 2008). No obstante el uso de estas cepas en la fermentación etanólica del agave podría mostrar cierta reticencia por ser un producto de consumo humano, debido a que son cepas adaptadas a las condiciones agresivas que representa una fermentación de este tipo, éstas pueden ser usadas en la producción del biocombustible *bioetanol*.

CONCLUSIONES

El estudio de las bases genéticas, fisiológicas y bioquímicas de los microorganismos generan conocimiento que, además de ayudar a entender el comportamiento de un microorganismo particular en un ambiente determinado, proporciona las herramientas que permiten el diseño de estrategias adecuadas para que, mediante manipulación del organismo en cuestión, adquiera características nuevas o mejoradas. En otras palabras los microorganismos son herramientas biológicas amables con el ambiente y pueden brindar servicios al ser humano mejorando su calidad de vida si se tiene el conocimiento para llevarlo a cabo, siendo las ADH de los hongos un claro ejemplo de ello.

REFERENCIAS

- Ahuja, S.K., Ferreira, G.M. and Moreira, A.P.** (2004). Utilization of enzymes for environmental applications. *Crit. Rev. Biotech.* **24**; 125-54.
- Alvarado, C.Y., Gutiérrez-Corona, J.F. and Zazueta-Sandoval R.** (2002). Presence and physiologic regulation of alcohol oxidase activity in an indigenous fungus isolated from petroleum-contaminated soils. *Appl. Biochem. Biotech.* **98-100**; 243-55.
- Beckman, C.H.** (1987). The nature of wilt diseases of plants; APS Press; Minnesota, USA.
- Blanco, M.A.** (1996). Miosis vasculares. En: Patología Vegetal Tomo II, Llacer G., Lopez, M.M., Traperó, A. Mundi Prensa, Madrid.
- Booth, C.** (1971). The genus *Fusarium*. C.M. Institute, eds., The Eastern Press Limited London and Reading.
- Boyd, D.R., Sharma, R.D. and Allen, C.C.C.** (2001). Aromatic dioxygenases: Molecular biocatalysis and applications. *Curr. Opin. Biotech.* **12**; 564-73.
- Borgia, P.T., Gokul, N.K. and Phillips, G.J.** (1985). Respiratory-competent conditional developmental mutant of *Mucor racemosus*. *J. Bacteriol.* **164**, 1049-56.



Brown, J.S. and Holden D.W. (1998). Insertional mutagenesis of pathogenic fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**: 390-4.

Callejas Negrete, O.A. (2000). Tesis de Maestría. Estudio de la actividad de la alcohol deshidrogenasa (ADH) de *Metarhizium anisopliae*. Posgrado en Biología Experimental. Universidad de Guanajuato.

Callejas Negrete, O.A., Esquivel Naranjo, U., Salazar Solís, E., Gutiérrez Corona, F., Torres Guzmán, J.C. y González Hernández, G.A. (2002). Optimización de la producción masiva de conidios de *Metarhizium anisopliae*, tipificación de cepas nativas y su mejoramiento genético. Investigación en Guanajuato 2001. CONCYTEG,11-3

Callejas Negrete, O.A., Torres Guzmán, J.C., Salazar Solís, E., Gutiérrez Corona, F. and González Hernández, G.A. Silencing of the alcohol dehydrogenase (*adh1*) gene of *Metarhizium anisopliae* by antisense RNA expression. International Workshop on Microbial Biotechnology and Biological Control: Microorganism as Friendly Tools. 27 – 30 Junio. Guanajuato, Gto.

Camacho Morales, R.L., Durón, A.C. and Zazueta-Sandoval, R. (2009). Analysis of glycerol dehydrogenase activities present in *Mucor circinelloides* YR-1. *Antonie van Leeuwenhoek*. Enviado para publicación.

Cira, L.A., González, G.A., Torres, J.C., Pelayo, C., Gutiérrez, M. and Ramírez J. (2008). Heterologous expression of *Fusarium oxysporum* tomatinase in *Saccharomyces cerevisiae* increases its resistance to saponins and improves ethanol production during the fermentation of *Agave tequilana* Weber var. azul and *Agave salmiana* must. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **93**(3): 259-66.

Clarkson, J.M. and Charnley AK. (1996). New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends Microbiol.* **4**: 197-203.

Corrales Escobosa, A.R. (2009). Determinación genética y papel fisiológico de la ADH en el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Tesis de doctorado en proceso. Posgrado en Biología Experimental, Universidad de Guanajuato.

Fang, W., Feng, J., Fan, Y., Zhang, Y., Bidochka, M.J., Leger, R.J. and Pei, Y. (2009). Expressing a fusion protein with protease and chitinase activities increases the virulence of the insect pathogen *Beauveria bassiana*. *J. Inv. Pathol.* Aug 8 [Epub ahead of print].

Gianfreda, L., Xu, F. and Bollag, J.M. (1999). Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation J.* **3**: 1-25.

Groeger, H. and Hummel, W. PCT patent W02004009825-A1 (2004).

Gibson, D.T. and Perales, R.E. (2000). Aromatic Hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Curr. Op. Biotech.* **11**: 236-46.

Glazer, A.N. and H. Nikaido. (2007). Microbial biotechnology: Fundamentals of applied microbiology. Cambridge University Press, Cambridge Inglaterra. ISBN: 978-0-521-84210-5

Gutiérrez Corona, J.F. y Cervantes Vega, C. 2008. Interacciones microbianas con el cromo: mecanismos y potencial biotecnológico. *Ide@s CONCYTEG* **37**: 21-36.



- Gutiérrez-Lomelí, M., Torres-Guzmán, J.C., González-Hernández, G.A., Cira-Chávez, L.A., Pelayo-Ortiz, C. and Ramírez-Córdova, J. de J.** (2008). Overexpression of ADH1 and HXT1 genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* improves the fermentative efficiency during tequila elaboration. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **93**(4): 363-71.
- Hanai, T., S. Atsumi, J. C. Liao.** (2007) Engineered synthetic pathways for isopropanol production in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 7814-7818.
- Hiramoto, T. and Abe, K.** (2004). PCT patent W020044103329-A1
- Hoegh L.** (2004). PCT patent W02004091312-A1
- Ismond, K.P., Dolférus, R., De Pauw, M., Dennis, E.S. and Good, A.G.** (2003). Enhanced low survival in *Arabidopsis* through increased metabolic flux in the fermentative pathway. *Plant Physiol.* **132**:1292-302.
- Jörnvall, H., Persson, B. and Jeffery, J.** (1987). Characteristics of alcohol, polyol dehydrogenases. *Eur. J. Biochem.* **167**:195-201.
- Kelly, J.M., Drysdale, M.R., Sealy-Lewis, H.M., Jones, I.G. y Lockington, R.A.** (1990). Alcohol dehydrogenase III in *Aspergillus nidulans* is anaerobically induced and post-transcriptionally regulated. *Mol. Gen. Genet.* **222**: 323-8.
- Mendoza Hernández, JM.** (2003). Papel fisiológico de la ADH en el cigomiceto *Mucor circinelloides* Tesis de Maestría, Posgrado en Biología Experimental, Universidad de Guanajuato.
- Meza Carmen, V.** (1999). Purificación y caracterización parcial de la alcohol deshidrogenasa de *Mucor circinelloides* Tesis de Maestría, Posgrado en Biología Experimental, Universidad de Guanajuato.
- Montiel González, G.** (2008). Efecto de la fuente de carbono en la inducción de diferentes actividades de alcohol deshidrogenasa NADP dependientes en la cepa YR-1 de *Mucor circinelloides*. Tesis de Licenciatura.
- Nanda, S.J. and Yadav, S.J.** (2003). Lipoygenase biocatalysis: a survey of asymmetric oxygenation. *Mol. Catal B: Enzym.* **26**: 3-28.
- Nation, J.L.** (2001). Insect Physiology and Biochemistry. p. 301-23. CRC Press Eds. Washington DC.
- Orlowski, M.** (1991). *Mucor* dimorphism. *Microbiol. Rev.* **55**: 234-58.
- Rangel Porras, R.A., Meza Carmen, V., Martínez-Cadena, G., Torres-Guzmán, J.C., González-Hernández, G.A., Arnau, J. and Gutiérrez-Corona, J.F.** (2005). Molecular analysis of a NAD-dependent alcohol dehydrogenase from the Zygomycete *Mucor circinelloides*. *Molec. Genet. Genom.* **274**: 354-63.
- Reid, M.F. and Fewson, C.A.** (1994). Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. *Crit. Rev. Microbiol.* **20**: 13-56.



Roberts, D.W. and St Leger, R.J. (2004). *Metarhizium* spp., Cosmopolitan Insect-Pathogenic Fungi: Mycological Aspects. *Adv. Appl. Microbiol.* 54: 1-70.

Rodríguez, R.C., Zazueta N.V. and Zazueta-Sandoval, R. (2004) Effects of carbon source on expression of alcohol oxidase activity and on morphologic pattern of YR-1 strain, a filamentous fungus isolated from petroleum-contaminated soils. *Appl. Biochem. Biotech.* 113-116:161-71.

Segers, G., Bradshaw, N., Archer, D., Blissett, K. and Oliver, R.P. (2001). Alcohol oxidase is a novel pathogenicity factor for *Cladosporium fulvum*, but aldehyde dehydrogenase is dispensable. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14(3): 367-77.

Shah, P.A. and Pell, J.K. (2003). Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl Microbiol. Biotech.* 61(5-6): 413-23.

Sheller, U., Zimmer, T., Becher, D., Schauer, F. and Shunck, W.H. (1998) Oxygenation cascade in conversion of *n*-alkanes to α, ω -Dioic acids catalyzed by Cytochrome P450 52A3. *J. Biol. Chem.* 273: 32528-34.

Shi, Z. and Blaschek, H.P. (2008). Transcriptional analysis of *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 and the hyper-butanol-producing mutant BA101 during the shift from acidogenesis to solventogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 7709-14.

Silva Jiménez, H., Zazueta Novoa, V., Durón Castellanos, A., Rodríguez Robelo, C., Leal-Morales, C.A. and Zazueta-Sandoval, R. (2009). Intracellular distribution of fatty alcohol oxidase (FAO) activity in *Mucor circinelloides* YR-1 isolated from petroleum-contaminated soils. *Antonie van Leeuwenhoek.* 96: 527-35.

St. Leger, R., Joshi, L., Bidochka, M.J. and Roberts, D.W. (1996). Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proceed. Nat. Acad. Sci.* 93: 6349-54.

Sugio, A., Takagi, S., Christensen, S., Ostergaard, L. and Oliw, E. (2002) PCT Patent W0200220730-A.

Torres Guzmán, J.C., Arreola Garcia, G.A., Zazueta Sandoval, R., Carrillo Rayas, T., Martinez Cadena, G. and Gutierrez Corona, F. (1994). Genetic evidence for independence between fermentative metabolism (ethanol accumulation) and yeast-cell development in the dimorphic fungus *Mucor rouxii*. *Curr. Genet.* 26:166-71.

Torres-Guzman, J.C., Salazar-Solís, E. y González-Hernández, G.A. (2008). Búsqueda de alternativas ecológicamente amables para el control de plagas en la agricultura moderna: *Metarhizium anisopliae* como modelo de estudio. *Ide@s CONCYTEG*, año3 No. 37:4-9.

Wang, C. and St. Leger, R.J. (2005). Developmental and Transcriptional Responses to Host and Nonhost Cuticles by the Specific Locust Pathogen *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* *Eukaryot. Cell.* 4(5): 937-47.

Wang, C. and St Leger, R.J. (2007). A scorpion neurotoxin increases the potency of a fungal insecticide. *Nature Biotech.* 25:1455-1456.



Xu, F. (1999) In: The encyclopedia of bioprocessing technology: Fermentation, Biocatalysis and Biseperation. Eds. Flickinger MC, and Drew SW. 1545-1554 John Wiley Et Sons, New York,.

Xu, F. and Salmon, S.I. (2000). US Patent US6129769-A1

Xu, H. Lund, H., Luo, J. and Bloomfield, K. (2004). PCT patent W02004112843-A2.

Xu F. 2005. Applications of oxidoreductases: Recent Progress. *Industrial Biotechnology*. **8**(1); 38-50.

Zazueta Sandoval, R. (2008). Las oxidorreductasas en la biotecnología ambiental. En: La química verde y el desarrollo sustentable. I@eas CONCYTEG 3. No 37. Pp 37. Revista electrónica en línea.

Zazueta Sandoval, R. and Gutiérrez Corona, J.F. (1999). Developmental and environmental influences in the production of a single NAD-dependent fermentative alcohol dehydrogenase by the zygomycete *Mucor rouxii*. *Arch. Microbiol.* **172**: 280-6.

Zazueta-Sandoval R, Durón-Castellanos A and Silva Jiménez H. (2008a). Peroxidases in YR-1 strain of *Mucor circinelloides* a potential bioremediator of petroleum-contaminated soils. *Ann. Microbiol.* **58**: 421-426.

Zazueta Sandoval R, Durón Castellanos A, Silva Jiménez H, Zazueta-Novoa V, Alvarado Caudillo Y, Rodríguez Robelo C, Peña Cabrera E y Cárabez Trejo A. (2008b) Estudios sobre el metabolismo de hidrocarburos en hongos filamentosos. En: Heredia, G. ed.. Tópicos sobre diversidad, Ecología y usos de los hongos microscópicos en Iberoamérica. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) e Instituto de Ecología A.C. Xalapa, Ver. México. 386. Capitulo 18. pp 349. ISBN:970-709-104-5.

Zazueta-Sandoval R, Zazueta-Novoa V, Silva-Jiménez H and Cabrera Ortíz R. (2003). A Different Method of Measuring and Detecting Mono and Di-Oxygenase Activities: Key Enzymes in hydrocarbon biodegradation. *Appl. Biochem. Biotech.* **105-108**; 725-736.