



COMPARACIÓN DE PROTEÍNAS FÚNGICAS SECRETADAS POR EL AISLADO FUNGICO A7 BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE CULTIVO

Juan Magaña Martínez ^a, Nicole Jaime Martínez ^a, Lériida Liss Flores Villavicencio ^a, José Pedro Castruita Domínguez ^b, Patricia Ponce Noyola ^a, Juan Luis Pichardo Molina ^c, Julio César Villagómez Castro ^{a*}

^aDepartamento de Biología, DCNE campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato, Noria alta s/n Col. Noria Alta, Guanajuato, Gto. 36050, México. j.maganamartinez@ugto.mx, *castroj@ugto.mx

^bDepartamento de Ecología Aplicada, CUCBA, Universidad de Guadalajara, Cam. Ramón Padilla Sánchez 2100, Las Agujas, Zapopan, Jal. 44600, México

^cCentro de Investigaciones en Óptica, A. C. Loma del Bosque 115, Colonia Lomas del Campestre, C.P. 37150 León, Guanajuato, México

Resumen

En este trabajo, se presenta la comparación de la actividad de dos glucosidasas secretadas por un aislado fúngico denominado A7, el cual pertenece a un consorcio microbiano que degrada polímeros plásticos en suspensión. Se caracterizaron morfológicamente las colonias del aislado fúngico crecido en los medios de cultivo agar dextrosa papa (PDA), agar dextrosa-extracto de levadura-peptona (YPD) y agar medio mínimo de Mathur sales (MMM), los cuales se incubaron durante 7 días a 28 °C. La caracterización microscópica del hongo se realizó en microcultivos que se tiñeron con azul de lactofenol. Para determinar la capacidad del hongo para aprovechar como fuente de carbono diferentes polímeros naturales o sintéticos, el aislado se cultivó a 28 °C en MMM adicionado con diferentes polímeros naturales o sintéticos (0.1% p/v), como fuente de carbono y, utilizando un cultivo control adicionado con glucosa (GLC). Después de 2 semanas de incubación, se observó el crecimiento fúngico, mayoritariamente en el cultivo control y, en orden decreciente a los realizados con celofán dulce (CD), carboximetilcelulosa (CMC), celulosa cristalina (CEL), tereftalato de polietileno (PET), poliestireno (PS), polietileno de alta densidad (PE) o celofán amargo (CA). Se analizó la actividad enzimática y la proteína secretadas en cultivos realizados en condiciones estáticas o de agitación (120 rpm), durante 21 días a 28 °C, adicionando al MMM los diferentes polímeros naturales (0.1% p/v). Cada semana se recuperó un cultivo representativo y se determinó, en el sobrenadante libre de células, la actividad de glucosidasa y celobiosidasa utilizando sustratos unidos a 4-metilumbelliferona (4MU). La proteína secretada se determinó por la técnica de Lowry y el patrón de proteínas en geles SDS-PAGE al 10%. Nuestros resultados muestran que el aislado fúngico tuvo un mayor crecimiento radial en YPD>PDA>MMM, con morfología colonial dependiente del medio



de cultivo empleado. Microscópicamente, se observó un micelio septado, con conidióforos y fiálides conteniendo conidios redondos; sugiriendo un hongo del género *Penicillium*. La proteína secretada fue mayor en condiciones de cultivo estático y el perfil electroforético mostró la secreción diferencial de proteínas, con pesos moleculares de 108 - 18 kDa, dependiendo del sustrato utilizado como fuente de carbono, observándose que el sustrato que indujo la mayor actividad de β -glucosidasa y celobiosidasa fue la CMC. Con base en estos resultados, se ha iniciado la caracterización molecular del aislado A7 y la purificación de la actividad enzimática secretada durante su crecimiento en CMC y en un futuro determinar su posible aplicación biotecnológica.

Palabras clave: Polímeros naturales y sintéticos; Hidrolasas; Penicillium.

" COMPARISON OF FUNGAL PROTEINS SECRETED BY FUNGAL ISOLATE A7 UNDER DIFFERENT CULTURE CONDITIONS"

Abstract

In this work, the comparison of the activity of two glucosidases secreted by a fungal isolate called A7, which belongs to a microbial consortium that degrades plastic polymers in suspension, was carried out. The colonies of the fungal isolate grown in the culture media potato dextrose agar (PDA), dextrose-yeast extract-peptone agar (YPD) and Mathur salts minimal medium agar (MMM) were morphologically characterized, which were incubated for 7 days. at 28°C. The microscopic characterization of the fungus was carried out in microcultures that were stained with lactophenol blue. To determine the ability of the fungus to take advantage of different natural or synthetic polymers as a carbon source, the isolate was grown at 28 °C in MMM added with different natural or synthetic polymers (0.1% w/v), as a carbon source and, using a control culture added with glucose (GLC). After 2 weeks of incubation, fungal growth was observed, mostly in the control culture and, in decreasing order, those carried out with sweet cellophane (CD), carboxymethyl cellulose (CMC), crystalline cellulose (CEL), polyethylene terephthalate (PET). , polystyrene (PS), high-density polyethylene (PE) or bitter cellophane (CA). The enzymatic activity and secreted protein were analyzed in cultures carried out under static or shaking conditions (120 rpm), for 21 days at 28 °C, adding the different natural polymers (0.1% w/v) to the MMM. A representative culture was recovered each week and glucosidase and cellobiosidase activity was determined in the cell-free supernatant using substrates linked to 4-methylumbelliferone (4MU). The secreted protein was determined by the Lowry technique and the protein standard on 10% SDS-PAGE gels. Our results



show that the fungal isolate had greater radial growth in YPD>PDA>MMM, with colonial morphology dependent on the culture medium used. Microscopically, a septate mycelium was observed, with conidiophores and phialides containing round conidia; suggesting a fungus of the genus *Penicillium*. The secreted protein was higher under static culture conditions and the electrophoretic profile showed the differential secretion of proteins, with molecular weights of 108 - 18 kDa, depending on the substrate used as a carbon source, observing that the substrate that induced the highest β activity -glucosidase and cellobiosidase was the CMC. Based on these results, the molecular characterization of isolate A7 and the purification of the enzymatic activity secreted during its growth in CMC have begun and in the future determine its possible biotechnological application.

Keywords: Natural and synthetic polymers; Hydrolases; Penicillium.

1. Introducción

En los últimos años, debido al crecimiento de la población, la exigencia en la calidad de vida y la industrialización; se ha ocasionado un desequilibrio en los ciclos tróficos de muchas especies, las cuales son afectadas por los residuos generados en los procesos industriales y el crecimiento desmedido de la mancha urbana.

La industria de los derivados del petróleo representa una fuerte actividad económica, con una amplia generación de empleos directos e indirectos. Una de sus motivaciones es el uso de plásticos y derivados por la población, los cuales se usan de forma cotidiana ligada a un ritmo de vida consumista. Esta producción de plásticos ha aumentado desde sus inicios

con un incremento constante desde la década de los años cuarenta y cincuenta, especialmente el plexiglás y teflón (Unidad de Cultura Científica e Innovación de la Universidad de Burgos, 2020). Después de la vida útil de los productos plásticos, estos se desechan y generan basura en nuestro entorno. Recientemente, derivado de la pandemia por el coronavirus (SARS-CoV2), la Asociación Nacional de Industrias del Plástico reportó que el consumo y fabricación de plásticos incrementó un 40% por la individualización de materiales (Alegría, 2022), el uso de mascarillas, las innumerables compras en línea, así como la exigencia de bebidas y alimentos



sellados, ocasionando toneladas de residuos que, en el mejor de los casos, se depositaron en los rellenos sanitarios y, de no ser así, se dirigieron a los océanos, donde se dispersan por sus propiedades de flotabilidad y durabilidad (Ali y col., 2023; Eriksen y col., 2014). El principal problema asociado a la entrada de residuos plásticos (polímeros sintéticos) en el medio natural se debe a que la mayoría de ellos se obtienen a partir de combustibles fósiles, y son muy resistentes a la degradación (Góngora Pérez, 2014).

Los polímeros naturales y los polímeros sintéticos difieren en su síntesis y composición, y con ello, en su posterior disposición final. Los primeros están presentes en el medio ambiente y pueden ser transformados y utilizados bióticamente, mientras que los segundos, al ser sintetizados por diferentes procesos químicos no son fácilmente transformados en la naturaleza (Abizanda Pardo y col., 2021). Ante la ineficiencia en los procesos fisicoquímicos para la eliminación y/o degradación de los polímeros naturales y sintéticos, se ha hecho atractiva la idea de la biorremediación, que busca organismos capaces de adherirse a la superficie de los polímeros y utilizarlos como fuente de

carbono, dando como resultado la producción de diferentes productos intermediarios, o bien, su degradación (Abizanda Pardo, 2021; Palm y col., 2019). Un sitio propicio para la búsqueda de organismos capaces de sintetizar enzimas degradadoras de polímeros, plásticos o naturales, es identificarlos en su medio ambiente (rellenos sanitarios, lixiviados en desechos de fábricas, etc.). Actualmente, la degradación microbiana y enzimática de los polímeros naturales o sintéticos (principalmente plásticos residuales) es una estrategia prometedora para la despolimerización hasta sus monómeros y reciclarlos, o bien, para convertirlos en bioproductos de mayor valor, como polímeros biodegradables a través de su mineralización (Mohanan y col., 2020).

Particularmente, y con respecto a la degradación de los polímeros naturales, los microorganismos producen una gamma de enzimas capaces de degradar dichos polímeros. Se han descrito varios géneros de microorganismos capaces de realizar una posible biodegradación de plásticos, entre ellos: *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Micrococcus*, *Corynebacterium* y



Nocardia, así como numerosos tipos de hongos, como *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. (Ma y col., 2022). Uno de los microorganismos más prometedores en la biorremediación de plásticos es la bacteria *Ideonella sakaiensis*, la cual es capaz de formar biopelículas sobre láminas de PET y degradarlas mediante la secreción de PET hidrolasa (PETasa) y mono(2-hidroxietil) tereftalato hidrolasa (MHETasa) (Yoshida y col., 2021).

En nuestro grupo de investigación, se cuenta con un consorcio de microorganismos que tienen la capacidad de utilizar el PET como fuente de carbono y actualmente se están caracterizando los aislados de dicho consorcio (Pérez-Méndez, 2021; Calderón-Tinajero, 2023). Particularmente, en este trabajo se presenta el crecimiento y actividad de un aislado fúngico denominado A7, cultivado en medio mínimo de sales adicionado de polímeros naturales y sintéticos, como fuentes de carbono.

2. Metodología

2.1 Caracterización macroscópica y crecimiento radial

El aislado fúngico se inoculó, en placas de 100 x 15 mm, por medio de un bocado de 5 mm de diámetro en diferentes medios sólidos a pH 4.5: PDA (agar papa dextrosa), YPD (extracto de levadura de peptona y dextrosa) y MMM (Medio Mínimo de Mathur sales) incubándolos por 7 días a 28 °C. Al término de la incubación se analizó la morfología macroscópica y se determinó el crecimiento fúngico radial. Adicionalmente, se hicieron cultivos en condiciones de anaerobiosis en tubos de ensayo de 16 x 125 mm, para ello, se inoculó un bocado de 5 mm de diámetro en 4 mL de MMM adicionado de polímero al 0.1% p/v y 2 mL de aceite mineral para evitar la difusión de oxígeno y generar la anaerobiosis. Los polímeros seleccionados para el cultivo fueron el celofán dulce (CD), celofán amargo (CA) y, la glucosa (GLC) como control.

2.2 Caracterización microscópica

La caracterización microscópica se realizó mediante la técnica de microcultivo en medio PDA, incubando por 14 días a 28 °C el hongo. Las preparaciones recuperadas se tiñeron con azul de lactofenol, las cuales fueron observadas en microscopía de



campo claro (Microscopio Leica DMLS con una cámara AxioCam ICc1, Carl Zeiss). Adicionalmente, se observaron al microscopio los polímeros empleados como fuente de carbono.

2.3 Crecimiento del aislado A7 en MMM adicionado con diferentes polímeros naturales y sintéticos

Se prepararon matraces Erlenmeyer de 25 mL con MMM líquido y como fuente de carbono (0.1% p/v) se adicionaron polímeros sintéticos como tereftalato de polietileno (PET), poliestireno (PS), polietileno de alta densidad (PE), celofán amargo (CA, poliestireno de baja densidad), y polímeros naturales como celofán dulce (CD), carboximetilcelulosa (CMC), celulosa cristalina (CEL) y como control se utilizó la glucosa (GLC). Posteriormente, se inocularon los matraces con un bocado de 5 mm de A7 y se incubaron por 15 días a 125 rpm y 28 °C. En un segundo experimento, se inoculó A7 con las siguientes fuentes de carbono: GLC, CD, CA, CMC y CEL al 0.1% y se incubaron a 28 °C en dos condiciones de cultivo, agitación a 200 rpm y cultivo estático, recuperando una alícuota cada semana durante 21 días. Después del

periodo de incubación se recolectaron los sobrenadantes (SN) y se centrifugaron a 2655 g por 10 minutos a 4 °C; las pastillas fueron analizadas en microscopia de campo claro y los sobrenadantes se alicuotaron y colocaron a – 20 °C para su posterior análisis. En el SN se cuantificó la actividad enzimática secretada y se determinó la concentración de proteína por el método de Lowry (1951), realizando lecturas a 750 nm en un espectrómetro Epoch BioTek y utilizando como referencia albumina de suero bovino (BSA) para determinar la concentración de proteína.

2.4 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS – PAGE 10%)

Los sobrenadantes previamente obtenidos, se sometieron a una electroforesis en condiciones desnaturalizantes en un gel de poliacrilamida al 10% de acuerdo con el protocolo de Laemmli (1970). Posteriormente, para visualizar el patrón de proteínas se realizó la tinción con nitrato de plata.

2.5 Determinación de la actividad enzimática secretada

Se determinó la actividad enzimática en los sobrenadantes de los cultivos



recuperados después de su crecimiento en cada fuente de carbono y condición, utilizando sustratos derivados de la 4-metilumbeliferona (4-MU) acoplada a β -glucósido y celobiósido: 4-metilumbeliferil-glucósido (4-MU-G) y 4-metilumbeliferil-celobiosido (4-MU-C), respectivamente, (Chávez-Ramírez, 2015; Hernández-Guzmán y col., 2016). El ensayo se realizó con los sustratos a una concentración final de 10 μ M en solución amortiguadora de citrato-fosfato 150 mM, pH 4.5, en un volumen de reacción de 200 μ L. La mezcla se incubó durante 1 hora a 45 °C y al término de la incubación, la reacción se paró adicionando 2.3 mL de solución amortiguadora de bicarbonato de

sodio-hidróxido de sodio, 0.1 M, pH 10.4. La fluorescencia liberada se determinó a las longitudes de onda de excitación y de emisión (λ_{exc} 350 nm; λ_{em} , 440 nm), utilizando un espectrofluorómetro Perkin-Elmer LS-5B.

3. Resultados y Discusión

3.1 Caracterización macroscópica y crecimiento radial

La morfología del aislado A7 cultivado en los diferentes medios: PDA, YPD y MMM se muestra en la Figura 1, donde se observan características morfológicas dependiendo del medio de cultivo utilizado.

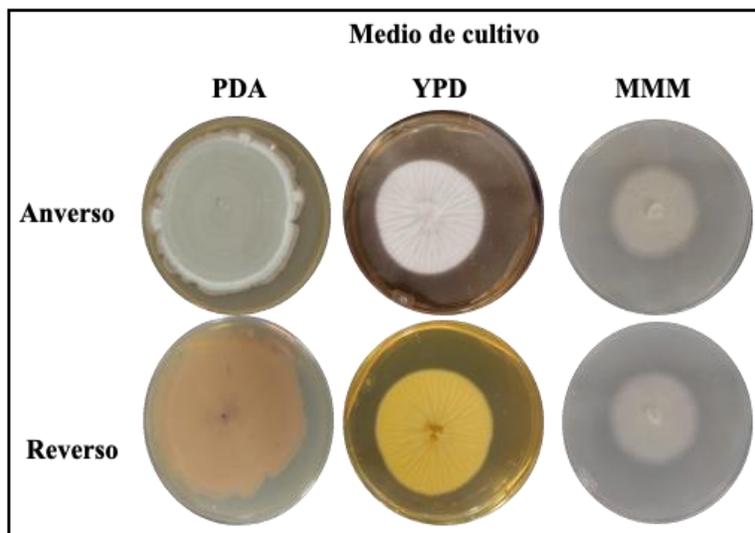


Figura 1. Morfología macroscópica del aislado A7 crecido en diferentes medios de cultivo pH 4.5 a 28 °C durante 7 días. PDA (agar papa dextrosa), YPD (extracto de levadura de peptona y dextrosa) y MMM (Medio Mínimo de Mathur sales).



En la Tabla 1 se describen las características de la morfología del aislado A7 en cada medio. En breve, en los tres medios se observó una colonia circular con características regulares a excepción del medio PDA donde el borde de la colonia fue irregular; en los tres medios la elevación fue plana y el borde tanto en YPD y MMM liso, mientras que en el medio PDA fue ondulado. Por otra parte,

en MMM y PDA, la superficie se notó suave en comparación con el medio YPD donde presentó una superficie surcada partiendo del centro. El color de la colonia fue dependiente de la naturaleza y la composición del medio, presentándose una variedad de colores en el anverso o el reverso de la colonia (PDA y YPD), mientras que en MMM no se observó una variación en su coloración.

Tabla 1. Descripción de las características macroscópicas de A7 en diferentes medios de cultivo.

Medio	Forma	Elevación	Borde	Superficie	Color anverso	Color reverso
PDA	Circular irregular	Plana	Ondular	Suave	Verde opaco con halo blanco	Café
YPD	Circular	Plana	Lisa	Surcada	Blanco	Naranja
MMM	Circular	Plana	Lisa	Suave	Beige	Beige

Por otra parte, se analizó el crecimiento radial de la colonia a los siete días en los diferentes medios; el cual depende de la composición del medio de cultivo. En MMM se obtuvo un crecimiento menor,

en contraste, se observó un crecimiento mayor en los medios ricos, como el PDA y YPD (Fig. 2). En la figura 3 se muestra el crecimiento fúngico del día 3 y 7.

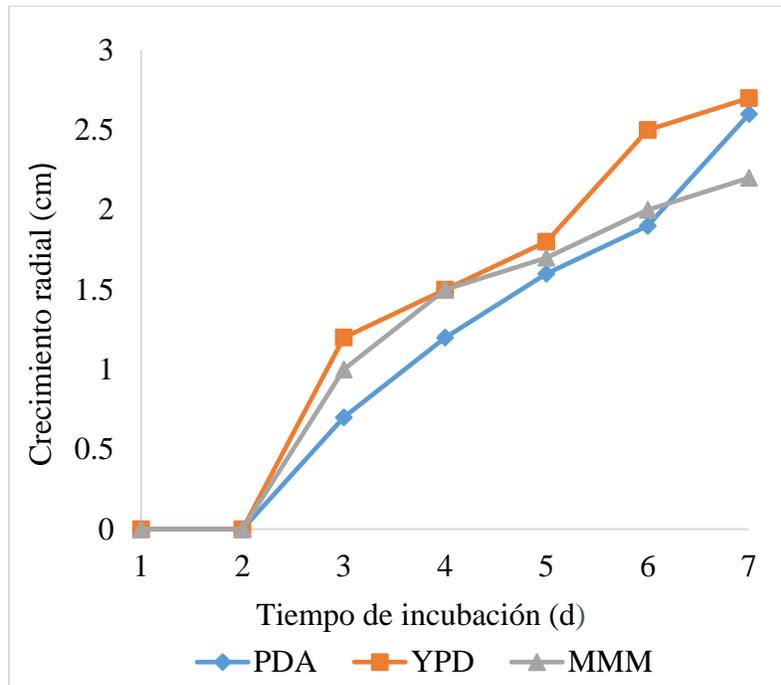


Figura 2. Curva de crecimiento radial de A7 en diferentes medios de cultivo durante 7 días a 28°C

Aislado A7	Día 3	Día 7
PDA		
YPD		
MMM		

Figura 3. Crecimiento radial de A7 en diferentes medios de cultivo



En la condición de crecimiento en anaerobiosis de A7, se tomaron imágenes del cultivo a los 3, 15 y 30 días de incubación (Figura 4). En las tres fuentes de carbono (0.1 %): GLC, CD y CA, se observó un crecimiento en el palillo de madera (empleado para que el inóculo permaneciera en la parte inferior), y

también un crecimiento en el aceite, dando estos resultados una pauta importante para inferir que A7 podría secretar enzimas con características de celulasas, debido a su crecimiento en el palillo de madera (celulosa) y, de lipasas, por su crecimiento en el aceite mineral.

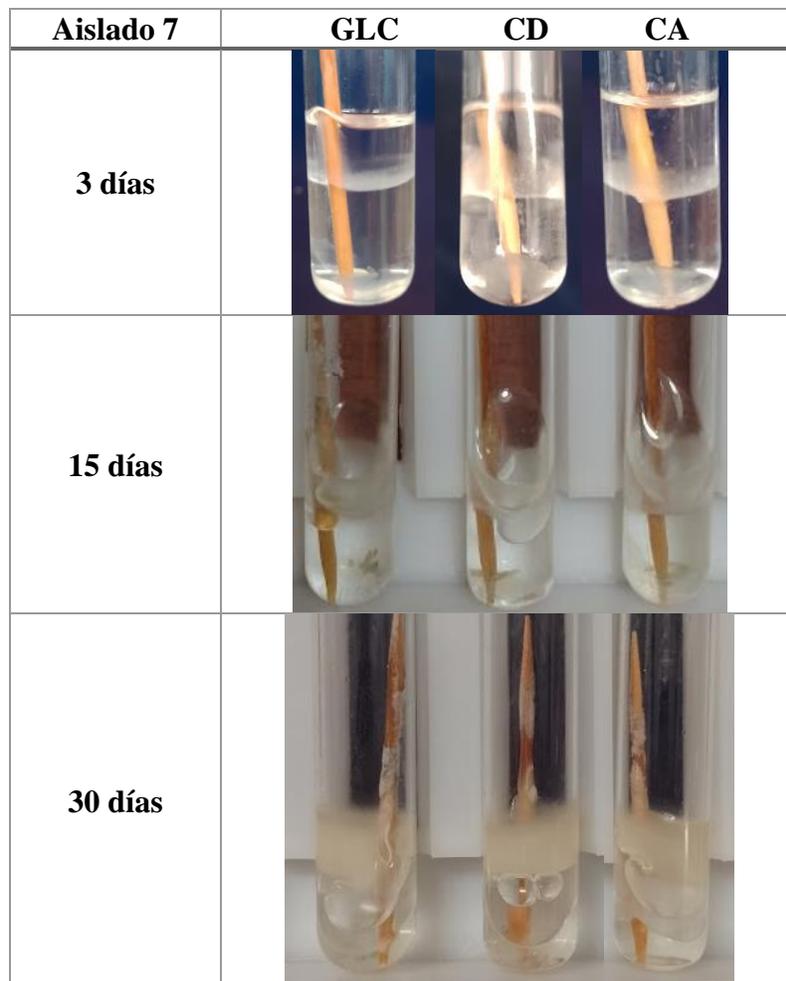


Figura 4. Crecimiento de A7 en condiciones de anaerobiosis



3.2 Caracterización microscópica

La caracterización microscópica se realizó mediante la tinción de azul de lactofenol por microscopia de campo claro (Figura 5). La tinción permitió observar que A7 presenta conidios con morfología circular, el micelio es septado con hifas hialinas, así

como la presencia de conidióforos, métula y fiálides; características del género *Penicillium*.

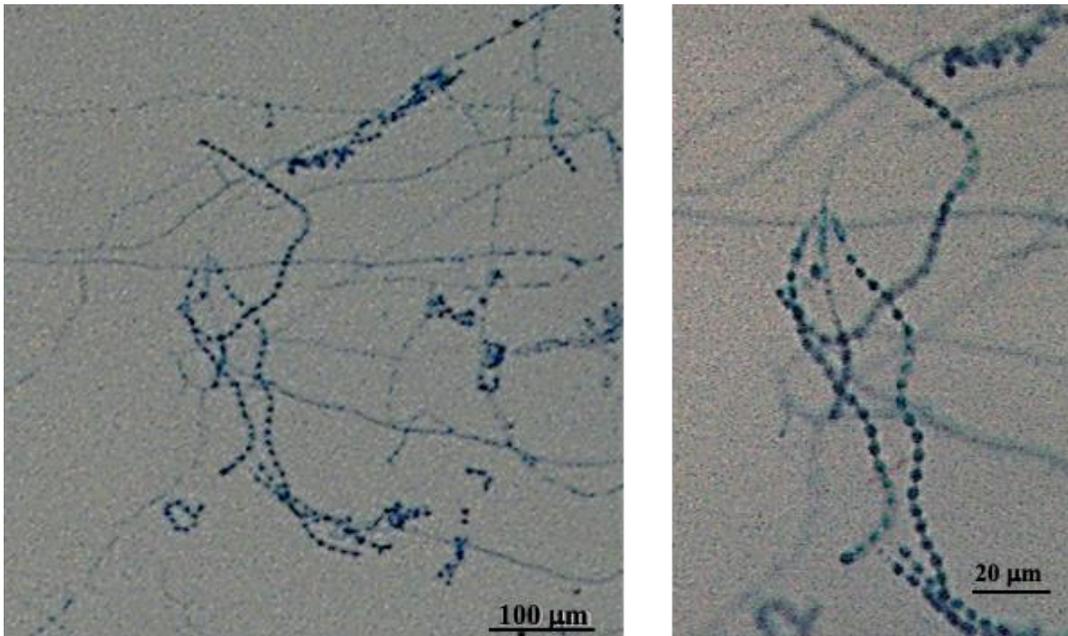


Figura 5. Morfología microscópica de A7 teñido con azul de lactofenol

3.3 Crecimiento de A7 en MMM adicionado con diferentes polímeros naturales y sintético

Previo al crecimiento de A7 en MMM con los diferentes polímeros naturales y sintéticos, se observaron las estructuras químicas y características macroscópicas y microscópicas de los polímeros naturales y

sintéticos que se utilizaron como fuente de carbono, además las imágenes microscópicas fueron usadas como una referencia de su forma en los análisis de la interacción polímero - A7 (Tabla 2).

Tabla 2. Polímeros naturales y sintéticos utilizados como fuente de carbono para el cultivo de A7.

Polímeros Sintéticos				
	Polietilentereftalato (PET)	Poliestireno (PS)	Polietileno (PE)	Celofán amargo (CA)
Fórmula Química	$(C_{10}H_8O_4)_n$	$(C_8H_8)_n$	$(C_2H_4)_n$	
Estructura Química				
Fotografía Macroscópica				
Fotografía Microscópica Barra= 100mm				
Polímeros Naturales				
	Glucosa (GLC)	Celofán Dulce (CD)	Carboximetilcelulosa (CMC)	Celulosa (Cel)
Fórmula Química	$C_6H_{12}O_6$		CH_2CO_2H	$(C_6H_{10}O_5)_n$
Estructura Química	 No polímero			
Fotografía Macroscópica				
Fotografía Microscópica Barra= 100mm				

Por otra parte, se realizó el crecimiento de A7 con los diferentes polímeros naturales y sintéticos y transcurrido el periodo de los 15 días de incubación se recuperó el SN y la pastilla y se analizó microscópica y macroscópicamente. En la interacción macroscópica, se cuantificó el crecimiento cualitativamente como se muestra en la figura 6; observando un mayor

crecimiento en la fuente de carbono con CEL seguido de CD, CA y CMC. Al analizar la interacción microscópica A7 – polímero se observó un crecimiento de A7 sobre el polímero, el cual se encuentra embebido en el micelio (Figura 7, cabeza de flecha roja); además de la aparición de artrosporas probablemente por el estrés de A7 al estar en contacto con el polímero.

Incubación	GLC	PET	PS	PE	CD	CA	CMC	CEL
0 días								
15 días								
Crecimiento	++	+	+	+	++	++	++	+++
0								

Figura 6. Crecimiento micelial de A7 en los polímeros sintéticos como Tereftalato de Polietileno (PET), Poliestireno (PS), Polietileno de alta densidad (PE), Celofán Amargo (CA, poliestireno de baja densidad), y polímeros naturales como Celofán Dulce (CD), Carboximetilcelulosa (CMC), Celulosa Cristalina (Cel) y como control se utilizó la glucosa (GLC).

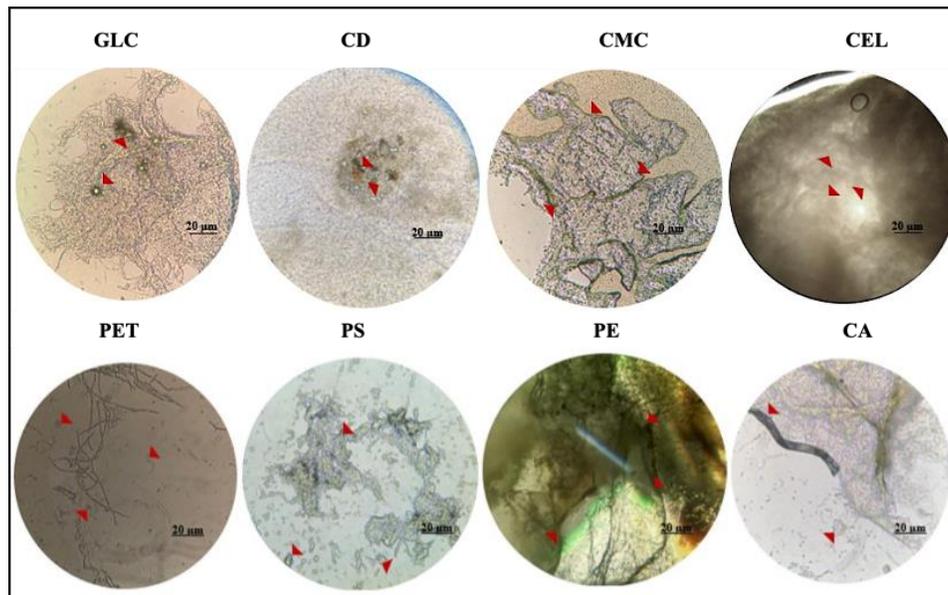


Figura 7. Análisis microscópico de la interacción A7 – polímero en microscopía de campo claro (40x), crecidos en MMM con 0.1 % de polímero (p/v) durante 15 días de incubación a 28 °C y 125 rpm. Las cabezas de flechas rojas indican el polímero. Barra: 20 µm

3.4 Patrón electroforético de las proteínas secretadas de A7 crecido en polímeros naturales y sintéticos

El análisis de las proteínas secretadas por A7 en los cultivos en presencia de polímeros naturales y sintéticos (Fig. 8) muestra que en la glucosa (GLC) hay una menor cantidad de bandas de proteínas, las cuales se pueden observar en todas las condiciones de cultivo, sugiriendo que se trata de proteínas constitutivas. En los sobrenadantes recuperados de los cultivos adicionados con polímeros sintéticos

(PET, PS, PE) el número y cantidad de proteínas (con base en la intensidad de su tinción) existe un mayor número de proteínas con respecto al control, pero menor número e intensidad con respecto a los sobrenadantes recuperados en los cultivos con polímeros celulósicos (CMC, CEL, CD y CA); observando masas relativas en el rango de 103- 32 kDa.

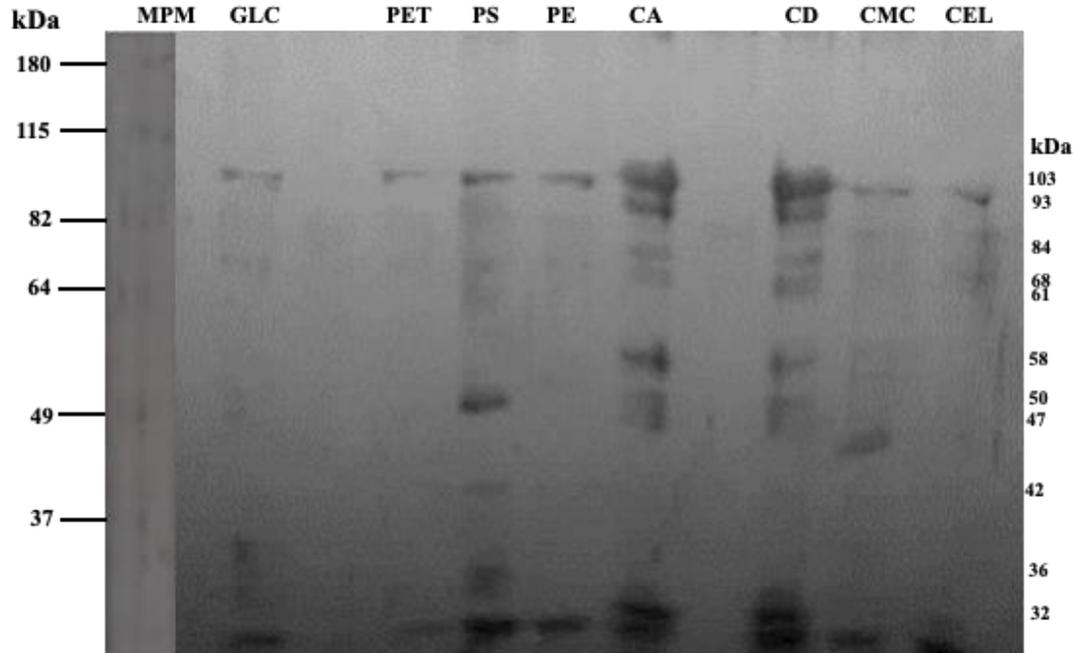


Figura 8. Perfil electroforético de las proteínas secretadas de A7 después de 15 días de incubación en MMM adicionado con glucosa o los diferentes polímeros naturales y sintéticos

3.5 Determinación de la proteína secretada por A7 en polímeros naturales y sintéticos

En la determinación de la proteína secretada tras 15 días de incubación (Tabla 3), se observó una mayor secreción de proteínas en los polímeros naturales en comparación de los polímeros sintéticos siendo mayoritariamente la cantidad de proteína en CEL. Cabe señalar que,

aunque el CA no sea un polímero natural, se tuvo una secreción igual en comparación con el CD que si es un polímero natural. En los polímeros sintéticos como PET, PS y PE no se obtuvo una gran cantidad de proteínas secretadas.



Tabla 3. Proteína secretada de A7 en los diferentes polímeros naturales y sintéticos

Polímero	Proteína (ng/20 µL)
Glucosa (GLC)	5.816
Tereftalato de Polietileno (PET)	3.231
Poliestireno (PS)	5.346
Polietileno (PE)	3.509
Celofán Dulce (CD)	8.338
Celofán Amargo (CA)	8.808
Carboximetilcelulosa (CMC)	5.090
Celulosa (CEL)	17.718

De acuerdo con los resultados, A7 tiene un mayor crecimiento en los polímeros naturales: CD, CMC, CEL y CA; además, una mayor secreción de proteínas en dichas condiciones de cultivo. Por lo tanto, se procedió a analizar el crecimiento de A7 con los polímeros naturales (CD, CMC, CEL y CA) en cultivo estático y en agitación. Para ello, durante 21 días, cada semana se recuperó una alícuota del

cultivo para determinar la cantidad de proteína secretada, así como el perfil total de las proteínas secretadas. En la figura 9, se muestra el crecimiento cualitativo desde los 7 a los 21 días donde se observó una mayor masa micelial en la superficie del cultivo estático en GLC, CD, CA; mientras que en la condición de agitación la masa micelial fue menor.

Condición Incubación	Estático					Agitación				
	GLC	CD	CA	CMC	CEL	GLC	CD	CA	CMC	CEL
0 días										
7 días										
14 días										
21 días										
Crecimiento	+	++	+++	++	+++	+	+++	++	++	+++

Figura 9. Cultivo de A7 en polímeros naturales en condición de agitación y estático a 28 °C. Celofán Dulce (CD), Carboximetilcelulosa (CMC), Celulosa Cristalina (Cel) y como control se utilizó la Glucosa (GLC)

Al comparar el perfil electroforético de las proteínas secretadas por A7, en ambas condiciones, estático y en agitación, se observó una mayor secreción de proteínas en el cultivo estático (Fig. 10). Cabe señalar, por ejemplo, que con la fuente de carbono de CMC en ambas condiciones de cultivo, se observaron cuatro bandas de proteínas mayoritarias de 103, 68, 50 y 42

kDa que se secretan en ambas condiciones (agitación y estático), sin embargo, se observó la secreción de otras proteínas en el rango de 68 – 18 kDa en el cultivo estático que no se presentan en el cultivo de agitación. En cada una de las fuentes de carbono de los polímeros y con glucosa, se observó dicho comportamiento en la secreción de proteínas.

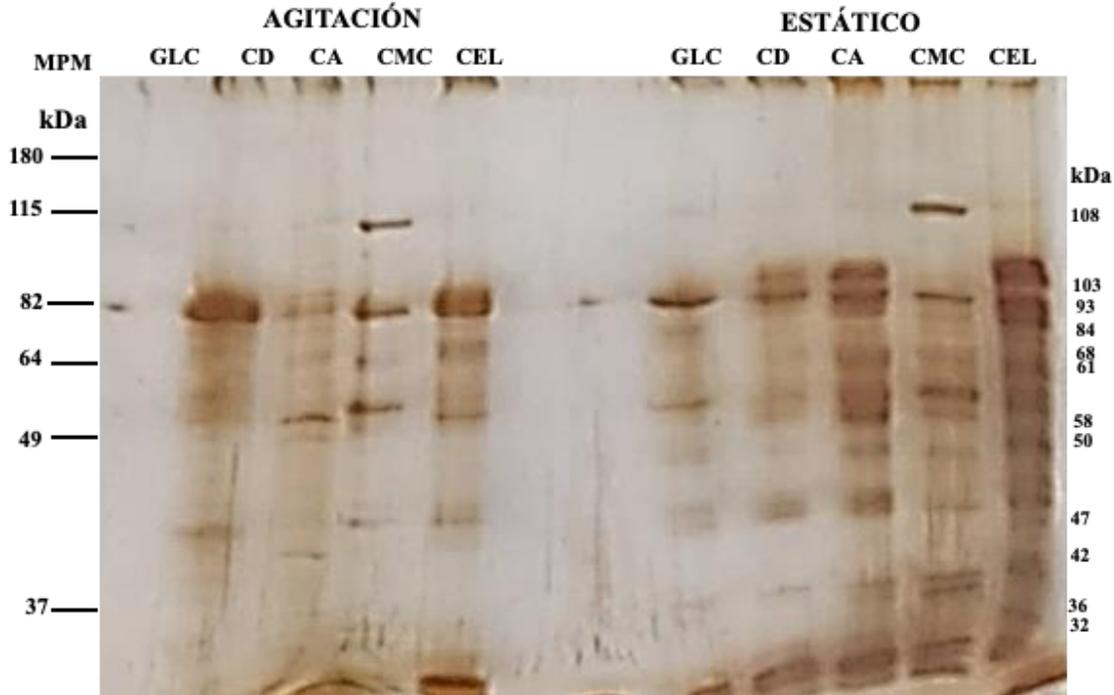


Figura 10. Perfil electroforético de las proteínas secretadas de A7 en cultivo de agitación y estático con los polímeros naturales

3.5 Determinación de la actividad enzimática secretada de β -Glucosidasa y Celobiosidasa

Las alícuotas recolectadas tras 21 días de cultivo en MMM adicionado con las diferentes fuentes de carbono: polímeros naturales o sintéticos y como control la GLC, fueron utilizadas para determinar las actividades enzimáticas en ambas condiciones de cultivo. Como se observa en la Tabla 4, si bien, el A7 creció en diferentes medios de cultivo, en estático

solo se detectaron actividad en presencia de carboximetilcelulosa (CMC) siendo mayor la actividad de β -Glucosidasa que de Celobiosidasa, en cambio, en agitación (Tabla 5) se observó una mayor actividad de β -Glucosidasa con CMC y CD. En las otras fuentes de carbono no fue detectada la actividad (ND).



Tabla 4. Determinación de la actividad enzimática secretada de A7 crecido con polímeros naturales y sintéticos en condiciones de cultivo estático. ND: No detectada

Estático	β-Glucosidasa	Celobiosidasa
Fuente de carbono adicionada al MMM	Actividades/μL	Actividades/μL
Glucosa (GLC)	ND	ND
Celofán dulce (CD)	ND	ND
Celofán amargo (CA)	ND	ND
Carboximetilcelulosa (CMC)	0.1830	0.0585
Celulosa cristalina (CEL)	ND	ND

Tabla 5. Determinación de la actividad enzimática secretada de A7 crecido con polímeros naturales y sintéticos en agitación. ND: No detectada

Agitación	β-Glucosidasa	Celobiosidasa
Fuente de carbono adicionada al MMM	Actividades/μL	Actividades/μL
Glucosa (GLC)	ND	ND
Celofán dulce (CD)	0.0869	ND
Celofán amargo (CA)	ND	ND
Carboximetilcelulosa (CMC)	0.1784	0.0209
Celulosa cristalina (CEL)	ND	ND

4. Conclusiones

La caracterización del Aislado 7 (A7) indicó que es un hongo filamentoso con características morfológicas pertenecientes al género *Penicillium*. Por otra parte, se observó una secreción diferencial de proteínas, dependiente del sustrato utilizado como fuente de carbono,

con pesos moleculares de 108-18 kDa. Además, la mayor secreción de proteínas se observó en la condición de cultivo estático, por otra parte, se determinó que la CMC es el mejor sustrato para inducir la actividad de β-Glucosidasa y Celobiosidasa en MMM.



5. Agradecimientos

Al estímulo de investigación y vinculación otorgado por la Universidad de Guanajuato en la convocatoria de becas y estímulos estudiantiles 2023 con folio 01897/2023 en el periodo Enero – Junio 2023, otorgado al estudiante de la Lic. en Q.F.B. Juan Magaña Martínez.

Referencias bibliográficas

Abizanda Pardo Eva (2021, 29 junio). Biorremediación de plásticos: ¿Qué nos aporta la proteómica? Sección de Biología, Trabajo de fin de grado. Universidad de La Laguna.

Acosta, A. (2019). Aplicaciones biotecnológicas a la degradación de residuos plásticos.

Ali, S., Bukhari, D. A., & Rehman, A. (2023). Call for biotechnological approach to degrade plastic in the era of COVID-19 pandemic, *Saudi J Biol Sci*, 30 (3), 103583.

Aradilla Zapata, D., Oliver Pujol, R., & Estrany Coda, F. (2012). Polímeros biodegradables: una alternativa de futuro a la sostenibilidad del medio ambiente. *Técnica Industrial*, 297, 76–80.

Calderon-Tinajero I. M. (2023). Caracterización de la actividad celulítica en un aislado fúngico. Tesis de licenciatura. Universidad de Guanajuato

Eriksen, M., Lebreton, L. C. M., Carson, H. S., Thiel, M., Moore, C. J., Borerro, J. C., Galgani, F., & Reisser, J. (2014). Plastic Pollution in the World's Oceans: More than 5 Trillion Plastic Pieces Weighing over 250,000 Tons Afloat at Sea. *PLoS ONE*, 9 (12), e111913.

Francisco, CCC (2019). Biodegradación de Tereftalato de Polietileno mediante la aplicación de *Fusarium culmorum* Tesis de licenciatura. Universidad de César Vallejo

Góngora Pérez, Juan Pablo. (2014). La industria del plástico en México y el mundo. *Comercio Exterior*, volumen 64, número 5, septiembre y octubre de 2014.

Ma J, Gong Z, Wang Z, Liu H, Chen G, Guo G (2022a) Elucidating degradation properties, microbial community, and mechanism of microplastics in sewage sludge under different terminal electron acceptors conditions. *Bioresour Technol* 346, 26624.

Pérez-Méndez M. L. (2021). Caracterización bioquímica y molecular



de diferentes aislados fúngicos. Tesis de licenciatura. Universidad de Guanajuato

Mohanani, N., Montazer, Z., Sharma, P. K., & Levin, D. B. (2020). Microbial and Enzymatic Degradation of Synthetic Plastics, *Frontiers in Microbiology*, 11, 580709.

Palm, G. J., Reisky, L., Böttcher, D., Müller, H., Michels, E. A. P., Walczak, M. C., Berndt, L., Weiss, M. S., Bornscheuer, U. T., & Weber, G. (2019). Structure of the plastic-degrading *Ideonella sakaiensis* MHETase bound to a substrate. *Nature communications*, 10(1), 1717.

Unidad de Cultura Científica e Innovación de la Universidad de Burgos. (2020, 29 de

julio). Historia y evolución de los plásticos - Historia de los materiales. Historia De Los Materiales. Recuperado el 18 de septiembre de 2023 de: <https://historiamateriales.ubuinvestiga.es/plasticos/#:~:text=Durante%20las%20d%C3%A9cadas%20de%20los,metilo%20polimerizado%2C%20conocido%20como%20Plexigl%C3%A1s>

Yoshida, S., Hiraga, K., Taniguchi, I., & Oda, K. (2021). *Ideonella sakaiensis*, PETase, and MHETase: From identification of microbial PET degradation to enzyme characterization. *Methods in enzymology*, 648, 187–205.