

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
CAMPUS LOS ÁNGELES  
ESCUELA DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA VEGETAL



**PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS ENZIMAS  
LIGNOCELULOLÍTICAS DEL HONGO DE PUDRICIÓN BLANCA DE LA  
MADERA *Bjerkandera adusta* EN COCULTIVO CON EL HONGO DE  
PUDRICIÓN PARDA *Gloeophyllum trabeum***

MEMORIA DE TÍTULO PARA  
OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO  
EN BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

BÁRBARA INÉS ARIAS GODOY  
LOS ÁNGELES-CHILE

2024

**“Producción y caracterización de las enzimas lignocelulolíticas del hongo de pudrición blanca de la madera *Bjerkandera adusta* en cocultivo con el hongo de pudrición parda *Gloeophyllum trabeum*”**

Alumna

Bárbara Inés Arias Godoy  
Ingeniera en Biotecnología Vegetal

Profesora Guía

Dra. Ángela Machuca Herrera  
Profesora Asociada  
Bioquímico

Profesora Co-guía

Dra. Adriane Milagres Ferreira  
Profesora Asociada  
Bioquímico

Jefe de Carrera

Pedro Quiroz Hernández  
Profesor Instructor  
Ingeniero de (E) Forestal

Director de Departamento

Dr. Mauricio Rondanelli Reyes  
Profesor Asociado  
Biólogo

## **Agradecimientos**

A mi familia, mi pilar inquebrantable, Mi mami, Pedro, Vicente y Florencia. Su amor ha sido mi fuerza y su aliento, para continuar todos los días estudiando y amando lo que hago. Gracias por ser mi refugio en cada día lluvioso y de tempestad, y mi cocina a leña con pan amasado en cada triunfo.

A las mujeres extraordinarias de mi vida, mis maestras de la fortaleza y la independencia, sobre todo a mi Mami Nena que me mira desde el cielo, gracias por enseñarme a valorar lo que somos y lo que damos, porque cada esfuerzo siempre trae su recompensa. Vuestras lecciones han moldeado mi carácter y me han enseñado el verdadero significado de la valentía.

A mis amigas por impulsarme a ser la mejor versión de mí misma, por hacerme sentir segura y querida cuando estaba rodeada de ellas, por prestarme sus apuntes y compartir un pedacito de sus vidas universitarias conmigo, gracias a Marcela, Vjeruscka, Soe, Coni, Thiare y Soledad.

A mis compañeros de universidad, mis cómplices en risas, en días de estrés y en partidas de taca-taca. Cada uno de ustedes han mejorado de sobremanera mi experiencia universitaria, gracias a Sergio, Cristian, Cristóbal, Maca y Gabriela.

A mis compañeros de laboratorio y amigos en esta travesía científica. Su conocimiento compartido y su colaboración desinteresada han sido el alma de esta investigación, gracias, Profesora Yudith, Christian, Paula y Ángel por siempre tener la disposición de ayudar o de un cafecito.

A mi querida profesora Angela Machuca, por ser más que una guía académica. Sus palabras de aliento, sus charlas y su apoyo incondicional han sido las palabras de aliento para continuar cuando me sentía lejos de casa o perdida, por impulsarme a no rendirme, a dar lo mejor de mí, a aprovechar el máximo de mi potencial y a orientarme no solo en aspectos académicos.

A la profesora Adriane Milagres, mi guía en tierras lejanas, gracias por su enseñanza integral y apoyo durante mi estadía en Brasil. Su guía y compromiso fueron cruciales para el éxito de este proyecto en un entorno internacional. Por apoyarme y recibirme en su laboratorio con los brazos abiertos y dispuesta a trabajar en conjunto en mi investigación.

A mis amigos en Brasil, Nayeli, Pedro, James, Larissa, Verónica, Anna y Fernanda, quienes han sido mi familia lejos de casa. Gracias por las aventuras a Rio de Janeiro, las risas, las pizzas compartidas, el “café da manhã” y por hacer que cada día en tierras extranjeras se sienta como en casa.

Y a mí misma, por cada lágrima, cada paso incierto y cada sonrisa perseverante. Gracias por no rendirte, por encontrar fuerzas cuando parecía no quedar ninguna y por recordarme siempre la capacidad que tengo para superar los obstáculos que me presente la vida. Lograste viajar al extranjero y volver en una pieza, así que venga una nueva aventura, un nuevo reto.

Agradecer al proyecto UCO1966 por financiar la “Beca de fortalecimiento de la movilidad estudiantil de pregrado 2023” de la dirección de relaciones internacionales que hizo posible el desarrollar mi proyecto de título en el extranjero.

También agradecer a la Escuela de Ciencias y Tecnologías y al Departamento de Ciencias y Tecnología Vegetal, por el apoyo financiero brindado tanto al inicio como al termino de mi movilidad internacional.

Finalmente, a la Escuela de Ingeniería Lorena de la Universidad de São Paulo - EEL/USP por recibirme como estudiante de intercambio internacional en el segundo semestre de 2023 y permitirme trabajar en el Departamento de Biotecnología (Debiq) junto a la Profesora Adriane Milagres.

## INDICE DE CONTENIDO

<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Abstract</b>	<b>2</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>3</b>
<b>2. Marco teórico</b>	<b>5</b>
2.1. Hongos de la pudrición de la madera	5
2.2. Importancia de la especie <i>Bjerkandera adusta</i>	7
2.3. Enzimas lignocelulolíticas	8
2.3.1. Celulasas	8
2.3.2. Hemicelulasas	9
2.3.3. Ligninasas	9
2.3.4. Enzimas auxiliares	11
2.4. Cocultivo de especies fúngicas	12
<b>3. Hipótesis</b>	<b>15</b>
<b>4. Objetivos</b>	<b>15</b>
4.1. Objetivo general	15
4.2. Objetivos específicos	15
<b>5. Materiales y Métodos</b>	<b>16</b>
5.1. Especies fúngicas	16
5.2. Crecimiento de las especies fúngicas en monocultivo y cocultivo en medio sólido	16
5.3. Determinación del crecimiento micelial de las especies fúngicas en monocultivo y cocultivo	18
5.4. Medio de cultivo líquido para la producción de enzimas	18
5.5. Ensayo de producción enzimática de las especies fúngicas en cocultivo en medio líquido	19
5.6. Obtención y caracterización de los extractos enzimáticos	19
5.7. Determinación de actividades enzimáticas de los extractos fúngicos	20
5.8. Concentración de proteínas extracelulares solubles y determinación de pH de los extractos fúngicos	21
5.9. Electroforesis PAGE nativa de los extractos enzimáticos	21
5.10. Purificación de los extractos enzimáticos mediante cromatografía de intercambio iónico	23

5.11. Análisis de datos.....	24
<b>6. Resultados.....</b>	<b>25</b>
6.1. Evaluación de la interacción y crecimiento micelial de <i>B. adusta</i> y <i>G. trabeum</i> en medio de cultivo sólido.....	25
6.2. Determinación de actividad enzimática, contenido de proteínas solubles y pH final de los monocultivos y cocultivo en medio líquido.....	28
6.3. Electroforesis PAGE nativa de proteínas y zimogramas de peroxidasas y xilanasas de los monocultivos y cocultivo.....	34
6.4. Purificación de los extractos enzimáticos mediante cromatografía de intercambio iónico.....	37
<b>7. Discusión.....</b>	<b>40</b>
<b>8. Conclusiones.....</b>	<b>47</b>
<b>9. Bibliografía.....</b>	<b>48</b>
<b>10. Anexo.....</b>	<b>64</b>

## INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Diagrama representando la forma de inoculación del cocultivo en placas de Petri, con un disco de agar-micelio de cada hongo en la misma placa, separados por aprox. 5 cm. Gt = *Gloeophyllum trabeum*. Ba = *Bjerkandera adusta*. -----17
- Figura 2.** Diagrama representando las diferentes interacciones entre dos especies/cepas fúngicas, que se cultivan adyacentes (a 5 cm de distancia) (Molla et al., 2001).----- 18
- Figura 3.** Patrón de crecimiento de *B. adusta* y *G. trabeum* en monocultivo y cocultivo, en placas con medio EMA y MDT, pH 5, a los 2 y 10 días de incubación a 28 °C. En los cocultivos, el inóculo de la derecha corresponde a la vista trasera y el de la izquierda a vista frontal. Los tratamientos fueron realizados en duplicado. -----27
- Figura 4.** Cultivos de *B. adusta* y *G. trabeum* al finalizar los 10 días de incubación a 25°C en agitación (120 rpm). Las fotografías superiores corresponden a los caldos de cultivo en matraces Erlenmeyer, y las fotografías inferiores corresponden a la biomasa micelial una vez filtrados los caldos. -----29
- Figura 5.** Actividades enzimáticas oxidativas de peroxidasa (A), manganoso peroxidasa (B), peroxidasa versátil (C) y LPMO (D) en los monocultivos y en el cocultivo de *B. adusta* (Ba) y *G. trabeum* (Gt), a los 10 días de incubación en medio de cultivo líquido MDT suplementado con salvado de trigo (1%). Caldos fúngicos concentrados 5x. Letras sobre cada barra indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ) (análisis ANOVA y Test Tukey). -----30
- Figura 6.** Actividades enzimáticas hidrolíticas de  $\beta$ -glucosidasa (A),  $\beta$ -xilosidasa (B), endoglucanasa (C) y xilanasa (D) en los monocultivos y el cocultivo de *B. adusta* (Ba) y *G. trabeum* (Gt), a los 10 días de incubación en medio

de cultivo líquido MDT suplementado con salvado de trigo (1%). Caldos fúngicos concentrados 5x. Letras sobre cada barra indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ) (análisis ANOVA y Test Tukey).

-----32

**Figura 7.** Contenido de proteínas solubles en los extractos enzimáticos de los monocultivos y del cocultivo de *B. adusta* (Ba) y *G. trabeum* (Gt), a los 10 días de incubación en medio de cultivo líquido MDT suplementado con salvado de trigo (1%). Caldos fúngicos concentrados 5x. Letras sobre cada barra indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ) (análisis ANOVA y Test Tukey).

-----33

**Figura 8.** Determinación de pH final de los extractos enzimáticos de los monocultivos y del cocultivo de *B. adusta* (Ba) y *G. trabeum* (Gt), a los 10 días de incubación en medio de cultivo líquido MDT suplementado con salvado de trigo (1%). Caldos fúngicos concentrados 5x. Letras sobre cada barra indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ) (análisis ANOVA y Test Tukey).

-----34

**Figura 9.** Electroforesis PAGE nativa de los extractos enzimáticos de los monocultivos de *B. adusta* (Ba) y *G. trabeum* (Gt) y del cocultivo (Ba-Gt). (A) Perfil de proteínas extracelulares de los monocultivos y cocultivo, y (B) zimograma para detección de peroxidasas con ABTS 2 mM y  $H_2O_2$  20 mM. MP = Marcador de peso molecular estándar (kDa). Flechas indican las bandas proteicas (A) de *B. adusta* (roja) y del cocultivo (azul) que se corresponderían con las bandas de actividad peroxidasa (B). Caldos fúngicos concentrados 20x.

-----36

**Figura 10.** Electroforesis PAGE nativa de los extractos enzimáticos de los monocultivos de *B. adusta* (Ba) y *G. trabeum* (Gt) y del cocultivo (Ba-Gt). (A) Perfil de proteínas extracelulares de los monocultivos y cocultivo, y (B)



zimograma para detección de xilanasas con xilano 1% (m/v) y revelado con Rojo Congo 1%. MP = Marcador de peso molecular estándar (kDa). Flechas indican la banda de proteínas (A) en *G. trabeum* que se correspondería con la banda de actividad xilanasa (B). Caldos fúngicos concentrados 20x.

-----37

**Figura 11.** Perfil proteico de los extractos enzimáticos purificados por cromatografía de intercambio iónico en un sistema FPLC. (A) *B. adusta*, (B) *G. trabeum* (C) Cocultivo, (1) Pico con actividad de endoglucanasa, (2) Pico con actividad de peroxidasa. Columna de 10 mL de intercambio aniónico DEAE-Sepharose CL6B, eluido con un gradiente de NaCl 500 mM. Caldos fúngicos concentrados 5x.

-----39

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Reactivos utilizados para la preparación de los geles de electroforesis PAGE nativa para proteínas y para detección de peroxidasa. -----	22
<b>Tabla 2.</b> Crecimiento micelial de los hongos <i>B. adusta</i> y <i>G. trabeum</i> en medio MDT a los 2 y 10 días. -----	26

## **Nomenclatura y Abreviaciones**

cm: centímetro

min: minuto

h: hora

g: gramos

L: litros

mg: miligramos

mL: mililitros

μL: microlitro

μg: microgramo

ABTS: Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

Abs: absorbancia

nm: nanómetro

pH: Potencial de Hidrogeno

UV: Ultravioleta

EMA: extracto de malta-agar

°C: grados Celsius

rpm: revoluciones por minuto

DNS: Ácido dinitrosalicílico

UV-VIS: Ultravioleta-visible

DE: desviación estándar

Native PAGE: Electroforesis en condiciones no desnaturizantes

WRF: Pudrición blanca

BRF: Pudrición parda

FPLC: Cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad

## Resumen

El presente estudio investigó la interacción entre dos hongos pudridores de la madera, *Bjerkandera adusta*, de pudrición blanca y *Gloeophyllum trabeum*, de pudrición parda, en la producción de enzimas lignocelulolíticas, hidrolíticas y oxidativas, mediante cocultivo bajo condiciones de fermentación líquida. Para investigar la compatibilidad entre las especies, inicialmente se evaluó el crecimiento de las especies en medio sólido, donde fue posible observar un crecimiento micelial entremezclado de ambos hongos, sin producción de pigmento en la interfaz de los micelios, indicando una compatibilidad parcial, además se obtuvo que el cocultivo no inhibió el crecimiento micelial de ambos hongos, y en algunos casos, promovió un ligero aumento del crecimiento en comparación con el monocultivo. La caracterización de los cocteles enzimáticos concentrados de *B. adusta* en cocultivo en medio líquido, proporcionó una visión detallada de las interacciones y la influencia de *G. trabeum* en su actividad enzimática. En términos de producción enzimática, se registró un aumento significativo en la actividad de las enzimas oxidativas en el cocultivo, destacando un incremento de 2-3 veces en la producción de peroxidasas, respecto al monocultivo de *B. adusta*. Estos resultados sugieren el efecto estimulante de *G. trabeum* (que no produce peroxidasas) sobre *B. adusta* en cocultivo. Por el contrario, en el caso de las enzimas celulólicas y hemicelulólicas se observó una significativa inhibición por efecto del cocultivo, respecto al monocultivo de *G. trabeum*. Las técnicas de electroforesis nativa y zimograma confirmaron la presencia y actividad de peroxidasas sólo en *B. adusta* y el cocultivo, y su ausencia en *G. trabeum*, y la presencia de xilanasas sólo en *G. trabeum*. La purificación de los extractos por cromatografía de intercambio iónico reveló la separación de diferentes fracciones proteicas, algunas de las cuales presentaron actividad de endoglucanasa (en todos los cultivos) y peroxidasas (monocultivo de *B. adusta* y cocultivo). Estos resultados contribuyen a comprender las interacciones fúngicas, en la producción de enzimas lignocelulolíticas, destacando el potencial del cocultivo para aumentar la producción de enzimas oxidativas en *B. adusta* con diversos fines biotecnológicos.

## Abstract

The present study investigated the interaction between two wood-rotting fungi, *Bjerkandera adusta*, white rot, and *Gloeophyllum trabeum*, brown rot, in the production of lignocellulolytic (hydrolytic and oxidative) enzymes by coculture under liquid fermentation conditions. To study the compatibility between the species, their growth was first evaluated in solid medium, where a mixed mycelial growth of both fungi was observed, without pigment production at the interface of the mycelia, indicating a partial compatibility. In addition, it was found that the coculture did not inhibit the mycelial growth of either fungus, and in some cases, promoted a slight increase in growth compared to the monoculture. Characterization of the concentrated enzyme cocktails of *B. adusta* in coculture in liquid medium provided detailed insight into the interactions and influence of *G. trabeum* on their enzymatic activity. In terms of enzyme production, a significant increase in the activity of oxidative enzymes was observed in the coculture, highlighting a 2-3-fold increase in the production of peroxidases in the coculture compared to *B. adusta* monoculture. These results suggest a stimulatory effect of *G. trabeum* (which does not produce peroxidases) on *B. adusta* in coculture. On the contrary, in the case of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes, a significant inhibition was observed due to the effect of the coculture, with respect to the monoculture of *G. trabeum*. Native electrophoresis and zymogram techniques confirmed the presence and activity of peroxidases only in *B. adusta* and coculture, and their absence in *G. trabeum*, and the presence of xylanases only in *G. trabeum*. Purification of the extracts by ion exchange chromatography revealed the separation of different protein fractions, some of which showed endoglucanase activity (in all cultures) and peroxidases (*B. adusta* and coculture). These results contribute to the understanding of fungal interactions in the production of lignocellulolytic enzymes and highlight the potential of coculture to increase the production of oxidative enzymes in *B. adusta* for various biotechnological purposes.

## 1. Introducción

La degradación eficiente de la lignocelulosa es un proceso esencial en la naturaleza que facilita la reciclabilidad de la biomasa vegetal y contribuye al equilibrio del ecosistema. Los hongos basidiomicetos de pudrición blanca, en particular, desempeñan un papel crucial en este proceso al secretar enzimas lignocelulolíticas extracelulares que descomponen las macromoléculas presentes en la madera.

*Bjerkandera adusta*, reconocido por su capacidad para degradar lignina, es un hongo de pudrición blanca que ha despertado interés en la industria biotecnológica debido a su potencial para la producción de enzimas clave en la descomposición de la biomasa lignocelulósica. Sin embargo, la interacción de *B. adusta* con otros microorganismos en su entorno natural podría influir significativamente en su crecimiento, metabolismo y producción de enzimas.

El cocultivo microbiano implica el cultivo de dos o más microorganismos confinados en el mismo entorno, lo que puede considerarse una estrategia experimental que imita la competencia dentro de las comunidades de microorganismos que ocurren en la naturaleza, pero a escala de laboratorio (Selegato & Castro-Gamboa, 2023). Dicha estrategia de manipulación experimental podría fomentar la producción de metabolitos, primarios o secundarios. Los primeros estudios de cocultivo se establecieron principalmente para comprender las interacciones naturales o artificiales entre microorganismos (Rosero-Chasoy et al., 2021). Sin embargo, en la actualidad está bien aceptado que los cocultivos también se pueden aplicar con éxito para mejorar los pasos limitantes de una vía biosintética, inducir la biosíntesis de enzimas y aumentar la producción de proteínas (Ganesan et al., 2017). Recientemente, el cocultivo se ha utilizado ampliamente para extraer potencial biosintético desconocido, como el descubrimiento de nuevos metabolitos secundarios y enzimas que podrían aplicarse en los campos de la medicina, la agricultura y la industria en general (Yu et al., 2021).

En este contexto, el presente estudio se centrará en la evaluación del impacto del cocultivo del hongo de pudrición blanca *B. adusta* con el hongo de pudrición parda *Gloeophyllum trabeum* en la producción de enzimas lignocelulolíticas. La hipótesis subyacente sostiene que esta interacción modificará la producción de enzimas,

generando extractos enzimáticos con diferentes especificidades y mayor actividad catalítica en comparación con el monocultivo. Este abordaje permitirá una comprensión de las interacciones microbianas involucradas en la producción de enzimas lignocelulolíticas utilizando co-cultivo y podría tener implicaciones significativas en la bioconversión de la biomasa lignocelulósica para la obtención de productos de interés industrial.

## **2. Marco teórico**

### **2.1. Hongos de la pudrición de la madera**

Los hongos que degradan la madera desempeñan un papel esencial en los ciclos globales de nutrientes, ya que liberan grandes cantidades de carbono secuestrado por las plantas (presente en el complejo de lignocelulosa) y ponen a disposición los nutrientes unidos en los tejidos de las plantas (Castaño et al., 2022). Debido a sus especiales capacidades para descomponer los materiales recalcitrantes presentes en la madera, también se han utilizado para diferentes aplicaciones como biorremediación, producción de biocombustibles y la industria pulpadora (Jutinico-Shubach et al., 2022).

Los hongos de la división Basidiomycota, principalmente de la subdivisión Agaricomycetes, poseen conjuntos de genes que codifican multienzimas extracelulares que los hacen capaces de descomponer sustratos complejos en la naturaleza, como los polisacáridos de la pared celular vegetal (celulosa y hemicelulosas) y la macromolécula aromática lignina (Kijpornyongpan et al., 2022). Según el tipo de pudrición y crecimiento sobre madera o residuos de plantas herbáceas, las especies se agrupan en hongos de pudrición blanca (“white-rot fungi”, WRF), hongos de pudrición parda (“brown-rot fungi”, BRF) y hongos de pudrición blanda (“soft-rot fungi”, SRF), que descomponen la cobertura vegetal del suelo, junto con hongos ectomicorrízicos y patógenos de plantas arbóreas (Veloz-Villavicencio et al., 2020). Los WRF y BRF se consideran los microorganismos más comunes y eficaces para la biodegradación de la pared celular vegetal, y tienen una gran capacidad para degradar o modificar sus componentes principales, lo cual es un proceso químico complejo (Qi et al., 2022).

Los WRF, son un grupo fisiológico que exhibe una notable capacidad para degradar la lignina y las sustancias similares a la lignina, dando una apariencia blanqueada a la madera. Pueden degradar de forma simultánea tanto la lignina como los polisacáridos (celulosa y hemicelulosa) de la biomasa, o pueden ser altamente selectivos mostrando una capacidad única de degradar la lignina de manera



eficiente, mediante la producción de enzimas extracelulares polisacárido-hidrolasas y oxidasas (Zhuo et al., 2021; Jiyun et al., 2023).

Los sistemas enzimáticos extracelulares descubiertos en los WRF incluyen las hidrolasas necesarias para la descomposición de polisacáridos, y un sistema enzimático ligninolítico reactivo y extracelular característico que rompe enlaces en la lignina y en algunos casos abre los anillos de fenilo (Illuri et al., 2021). Entre las enzimas ligninolíticas destacan la lacasa, la manganeso peroxidasa (MnP) y la lignina peroxidasa (LiP), y otras como la aril alcohol oxidasa (AAO) (Ergun & Urek, 2017). Entre las principales enzimas hidrolíticas, destacan las endoglucanasas, celobiohidrolasas y  $\beta$ -glucosidasas, estas enzimas son capaces de escindir los enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos de las unidades de glucosa que forman la celulosa en celobiosa y celooligosacáridos (Reyes et al., 2021). Con base en las características únicas de los WRF, se ha descubierto desde hace tiempo que estos organismos y sus enzimas extracelulares son prometedores en aplicaciones biotecnológicas que involucran, entre otras, la conversión de sustratos lignocelulósicos con altos contenidos en lignina (Singh et al., 2023).

Los BRF son descomponedores primarios de plantas leñosas y generalmente se los considera un linaje evolutivo derivado de hongos ancestrales de pudrición blanca (Goodell et al., 2020). Por lo general, en la descomposición de la madera por pudrición parda, los polisacáridos se despolimerizan rápidamente con una pérdida significativa de las propiedades mecánicas, y la lignina se despolimeriza y oxida para luego ser repolimerizada (Zhu et al., 2022), dejando un residuo seco de color marrón (Veloz-Villavicencio et al., 2020). A diferencia de los WRF, los BRF han perdido los genes que codifican un tipo de peroxidasas (clase II), y la despolimerización rápida e inicial de los polisacáridos de la pared celular se produce utilizando radicales hidroxilos generados fuera de las hifas a través de la reacción de Fenton ( $H_2O_2/Fe$ ) (Kojima et al., 2020; Goodell et al., 2020). Sin embargo, además de producir radicales hidroxilo para el ataque inicial de la pared celular, estos hongos producen enzimas hidrolíticas del tipo celulasas y hemicelulasas que utilizan para completar la degradación de los polisacáridos de la pared celular (Rizqi et al., 2023). Otros metabolitos reductores de hierro de bajo peso molecular,

incluidos los quelantes del tipo catecolato/hidroxiquinona y los aminofenoles, han sido descritos en estos hongos participando del proceso de despolimerización de la pared celular (Zhu et al., 2022). Entre los BRF, una especie que ha sido ampliamente investigada es *Gloeophyllum trabeum*. Esta especie tiene diversos genes que codifican proteínas con actividad accesoria, y metaboliza la hemicelulosa y la celulosa de la madera mediante un mecanismo de dos pasos que comprende reacciones enzimáticas y no enzimáticas, produciendo finalmente un residuo de lignina marrón (Andlar et al., 2018; Sanhueza et al., 2018).

## **2.2. Importancia de la especie *Bjerkandera adusta***

*Bjerkandera adusta* (Willd. Ex.Fr) P. Karst (Basidiomycota, Homobasidiales, Polyporales, Hapalopilaceae) es uno de los hongos más comunes en el medio ambiente causantes de la podredumbre blanca, principalmente de árboles de hoja caduca, pero también de algunas coníferas (Korniłłowicz-Kowalska et al., 2020). Este hongo produce una deslignificación selectiva de la madera, con reducida capacidad de degradar celulosa (Kang et al., 2021).

Debido a la eficiente capacidad de degradar lignina es capaz de oxidar compuestos xenobióticos, incluidos algunos contaminantes ambientales, lo que lo convierte en un candidato potencial para aplicaciones ambientales, como la decoloración de colorantes en las industrias textil, del cuero, cosmética, farmacéutica y del papel (Gao et al., 2020). La capacidad de degradar lignina y otros compuestos xenobióticos está relacionada con la producción de manganeso peroxidasas (MnP) y lacasas por parte del hongo (Sugano et al., 2021). Dentro de las peroxidasas, la peroxidasa versátil (VP), notificada por primera vez en el género *Bjerkandera* (Pinto et al., 2022), desempeña un papel importante en el proceso de degradación de la lignina. Esta enzima es una hemo-peroxidasa ligninolítica con una arquitectura molecular híbrida que combina características de MnP y LiP (Zhuo & Fan, 2021).

*Bjerkandera adusta* es un hongo mesófilo con un crecimiento óptimo a 25-30 °C, creciendo en condiciones de pH variables (3,5-7,5) con un óptimo en el rango de 5,5-6,5 y una concentración de sal de hasta 3% (Quiroz-Castañeda et al., 2009). En términos de necesidades nutricionales, *B. adusta* es un protótrofo (utiliza azúcares

simples como fuente de C y energía), pero también puede utilizar un amplio espectro de fuentes de C complejas y N-orgánico, que incluyen varios polisacáridos, lípidos, lignina solubilizada, proteínas y quitina (Korniłowicz-Kowalska et al., 2020). Este hongo no produce metabolitos tóxicos, por lo que sus aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética son sencillas y seguras (Babkina et al., 2023).

### **2.3. Enzimas Ligninocelulolíticas**

La sacarificación enzimática de lignocelulosa en azúcares reductores requiere una serie de enzimas especializadas debido a su gran tamaño y complejidad estructural (Zerva et al., 2021). Las enzimas lignocelulósicas se pueden clasificar en celulasas, hemicelulasas y ligninasas según las propiedades de los sustratos sobre los cuales actúan (Wu et al., 2022).

#### **2.3.1. Celulasas**

Las celulasas consisten principalmente en endoglucanasa (endo -1,4- $\beta$ - D -glucanasa, EC3.2.1.4), exoglucanasa (exo -1,4- $\beta$ - D -glucanasa, EC.3.2 .1.91), y  $\beta$ -glucosidasa ( $\beta$ -1,4-glucosidasa, EC.3.2.1.21).

La endo-1,4- $\beta$ -glucanasa (EC 3.2.1.4) juega un papel importante en la hidrólisis de la lignocelulosa, para reducir el grado de polimerización, ya que hidroliza aleatoriamente los enlaces  $\beta$ -1,4-glicosídicos del esqueleto de carbono de la celulosa para generar nuevos extremos reductores y no reductores. (Dadwal et al., 2022; Gu et al., 2021). La celobiohidrolasa o exo-1,4- $\beta$ -glucanasa (EC 3.2.1.91) avanza a lo largo de la celulosa hidrolizando las unidades de celobiosa de los extremos reductores (CBHI, EC 3.2.1.176) y no reductores (CBHII EC 3.2.1.91); actuando en colaboración para degradar la celulosa cristalina y liberar celobiosa como producto principal (Nath et al., 2019).

La  $\beta$ -glucosidasa (EC 3.2.1.21) actúa sobre los productos liberados por la acción de exo- y endo-1,4- $\beta$ -glucanasas. Estas no se denominan celulasas verdaderas ya que no actúan directamente sobre la celulosa, pero su presencia es tan crucial como la de otras enzimas (Datta, 2024). La  $\beta$ -glucosidasa hidroliza los celooligosacáridos y la celobiosa hasta residuos terminales no reductores en  $\beta$ -D-glucósidos y oligosacáridos con liberación de moléculas de glucosa (Uchiyama et al., 2022). La

acción combinada de las enzimas del complejo celulolítico sobre su sustrato, la celulosa, es cooperativa y sinérgica (Kumar & Murthy, 2013).

### **2.3.2. Hemicelulasas**

Entre las hemicelulasas, la endo-1,4- $\beta$ -D-xilanasas (EC.3.2.1.8) es una hidrolasa que escinde enlaces  $\beta$ -1,4- xilosídicos entre dos residuos de D-xilopiranosilo. Los xilanos hidrolizados por xilanasas producen xilosa, xilobiosa, xilotriosa y otros xilooligosacáridos (Li et al., 2022). Las xilanasas se derivan de una amplia gama de organismos y exhiben diferentes plegamientos, especificidad de sustrato, mecanismos catalíticos y propiedades fisicoquímicas. Según la base de datos de enzimas activas de carbohidratos (CAZy), las xilanasas se clasifican en las familias de glucósido hidrolasa (GH) 5, 7, 8, 10, 11 y 43. Entre ellas, la familia GH11 se considera la única familia de "xilanasas verdaderas", que reconocen específicamente sustratos de tipo xilanos (Wu et al., 2020). La endo-1,4- $\beta$ -xilanasas (E.C. 3.2.1.8) puede escindir enlaces internos  $\beta$ -1,4-xilosídicos; por lo tanto, es una de las enzimas más importantes en los procesos de biorrefinerías para obtener azúcares fermentables a partir de los componentes hemicelulósicos de la biomasa (Min et al., 2021).

Las hemicelulasas también incluyen las  $\beta$ -xilosidasas (EC 3.2.1.27), que liberan xilosa a partir de los extremos no reductores de los xilo-oligosacáridos, y las  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas (E.C. 3.2.1.55), que escinden los enlaces de los  $\alpha$ -L-arabinofuranosidos presentes en los polisacáridos que contienen L-arabinosa, como el arabinoxilano (Aytaş et al., 2023). La liberación de los grupos sustituyentes de arabinosa de los arabinoxilanos mejora la acción sinérgica de la actividad de xilanasas (Biely et al., 2016), y reducen la inhibición mediada por xilo-oligosacáridos de las xilanasas y celulasas (Poria et al., 2020). Las  $\beta$ -xilosidasas tienen un papel importante en la degradación de los materiales lignocelulósicos, ya que son enzimas que reducen la inhibición de los productos de las xilanasas sobre la actividad de las celulasas (Jin et al., 2020).

### **2.3.3. Ligninasas**

Las ligninasas son enzimas modificadoras de la lignina, que actúan oxidando y descomponiendo la compleja estructura de esta macromolécula aromática a través

de la formación de especies radicalares, y que incluye enzimas que pertenecen a la familia AA2 de hemoproteínas de clase II, dentro de la superfamilia de las catalasas-peroxidasas (Kijpornyongpan et al., 2022). Las peroxidasas de la clase II incluyen a la lignina peroxidasas (LiP), peroxidasas versátiles (VP) y peroxidasas dependientes de Mn (MnP), todas las cuales contienen protoporfirina IX como grupo protésico en el sitio catalítico (Suryardi et al., 2022).

La lignina peroxidasa (LiP) es capaz de atacar lignina, y es relativamente inespecífica en relación a sus sustratos, oxidando diferentes compuestos aromáticos fenólicos y una variedad de compuestos modelo de lignina no fenólicos, junto con muchas otras moléculas orgánicas (Civzele et al., 2023). El alto potencial redox de las LiP (alrededor de 1,2 V a pH 3) hace que éstas sean capaces de oxidar sustratos que no son oxidados por otras peroxidasas (Curran et al., 2022). El ciclo catalítico de LiP se parece al mecanismo catalítico común a todas las peroxidasas, y es fuertemente dependiente de la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kumar & Chandra, 2022). La manganeso peroxidasa (MnP) tiene una estructura molecular que incluye el mismo grupo hemo de LiP, pero además incluye un sitio de unión a Mn (II) (Sutherland et al. 1997). Los ciclos catalíticos de MnP y LiP son muy similares, pero las peroxidasas dependientes de Mn son únicas al utilizar Mn (II) como sustrato reductor, generando Mn (III), que se difunde desde las enzimas hacia la estructura de lignocelulosa (Rovaletti et al., 2023).

La peroxidasa versátil (VP) combina la arquitectura molecular de LiP y MnP. La enzima VP oxida sustratos típicos de LiP, como, por ejemplo, alcohol veratrílico, metoxibencenos y compuestos de lignina modelo no fenólicos, así como Mn (II) (Chan et al., 2019). La especificidad de sustrato de las VP es similar a la de LiP, incluida la oxidación de compuestos con potencial redox alto y medio. Sin embargo, la VP también oxida colorantes azoicos y otros compuestos no fenólicos con alto potencial redox en ausencia de mediadores (Đurđić et al., 2020). El ciclo catalítico básico de las VP es similar al de otras peroxidasas, con la formación de compuestos intermediarios I y II, pero es más complejo debido a un conjunto más diversificado de sustratos potenciales (Chaudière, 2023).

La lacasa oxida una variedad de compuestos aromáticos, incluidos restos fenólicos que normalmente se encuentran en la lignina, aminas aromáticas, bencenotioles e hidroxindoles, utilizando oxígeno molecular como aceptor de electrones (Liu et al., 2022). Las lacasas son metaloproteínas que pertenecen al grupo de las polifenoloxidasas y que contienen Cu (I y II) en el sitio catalítico, y por eso se denominan oxidasas multicobre azules. Estas enzimas reaccionan principalmente con fragmentos fenólicos libres de lignina debido a la naturaleza aleatoria de la lignina y al menor potencial redox de las lacasas (Gutiérrez-Antón et al., 2023). Sin embargo, en presencia de algunos mediadores de baja masa molecular, las lacasas también pueden atacar compuestos aromáticos no fenólicos, con altos potenciales redox (Civzele et al., 2023). La oxidación de sustratos por la lacasa es una reacción de un solo electrón que genera un radical libre. El producto inicial de la reacción suele ser un radical fenoxi inestable que puede convertirse en quinona en una segunda reacción catalizada por la enzima (Janusz et al., 2020).

#### **2.3.4. Enzimas auxiliares**

Las enzimas auxiliares son proteínas accesorias no hidrolíticas que pueden mejorar la actividad de las celulasas porque estas proteínas son capaces de provocar modificaciones que reducen la cristalinidad de la celulosa y aumentar la accesibilidad de las enzimas a ella (Harris et al., 2014). Dentro de estas enzimas se encuentran las monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMO). Actualmente las LPMOs se clasifican según su secuencia de aminoácidos como familias de actividad auxiliar (AA), AA9, AA10, AA15 y AA16 en la base de datos de enzimas activas de carbohidratos (CAZy) (Lombard et al., 2014). El número de familias de AA se ha ampliado con el descubrimiento de la familia AA14 que comprende LPMO fúngicas (Couturier et al., 2018).

Estas enzimas catalizan la despolimerización oxidativa de diversos carbohidratos poliméricos como celulosa, hemicelulosa, quitina y almidón (Breslmayr et al., 2018). Estas enzimas tienen la capacidad única de actuar en interfaces sólido-líquido, lo que significa que pueden degradar polisacáridos que están incrustados en una estructura insoluble, a veces incluso cristalina. Esto se puede lograr debido a la arquitectura del sitio activo plano y abierto de las LPMO, que es adecuada para

interactuar con múltiples cadenas de polisacáridos en una red cristalina ordenada (Kuusk et al., 2023). La LPMO implica la formación de una poderosa especie reactiva de oxígeno en el ion cobre, posiblemente un cobre (II)-oxilo ( $[\text{CuO}]^+$ ) (Hedegård & Ryde, 2017), en un arreglo molecular que incluye residuos de histidina, expuesto al disolvente que forma parte de una superficie plana de unión al sustrato. Esto permite a las LPMO catalizar la ruptura de enlaces glicosídicos en polisacáridos mientras se encuentran en una red cristalina regular (Liu et al., 2023). Estas enzimas son ubicuas en la naturaleza, siendo su actividad detectadas en plantas, hongos, bacterias, animales, etc. En el caso de los hongos, su presencia ha sido detectada mediante la caracterización de dos enzimas del basidiomiceto de pudrición blanca *Trametes coccineus* (Couturier et al., 2018). Al igual que en el basidiomiceto de pudrición blanca *Phanerochaete chrysosporium* (Wu et al., 2013). También se ha caracterizado una LPMO activa en xiloglucano de un hongo de pudrición parda *Gloeophyllum trabeum*. Siendo también estudiada en *Bjerkandera adusta* para sondear los determinantes moleculares de la unión del sustrato dentro de dos subgrupos AA9 LPMO (Frandsen et al., 2021).

#### **2.4. Cocultivo de especies fúngicas**

Los hongos saprobios son reconocidos por producir una enorme diversidad de enzimas hidrolíticas y oxidativas capaces de deconstruir la compleja estructura de las paredes celulares de los materiales lignocelulósicos en la naturaleza. Durante el proceso de descomposición *in situ* el ataque ocurre por la acción combinada y secuencial de diversos microorganismos, incluidos hongos y bacterias (Ferdes et al., 2020). Sin embargo, los estudios de degradación de materiales lignocelulósicos *in vitro* con diferentes fines biotecnológicos generalmente consideran el uso de una sola especie/cepa de hongo (monocultivo), previamente seleccionada, lo que puede significar una limitante en la producción de todas las enzimas y proteínas necesarias para sacarificar eficientemente la biomasa (Druzhinina & Kubicek, 2017).

A diferencia del monocultivo, el cocultivo de microorganismos considera la presencia de al menos dos cepas/especies diferentes en el mismo sistema de cultivo *in vitro* simultáneamente, lo que intenta simular artificialmente el complejo entorno microbiano en su ambiente natural. El cocultivo se ha considerado como

una forma alternativa de compensar las variaciones genómicas entre las cepas de microorganismos, potenciar la expresión enzimática y, por tanto, complementar las actividades enzimáticas. Se espera que el cultivo conjunto de hongos con diferentes potenciales catalíticos pueda contribuir a obtener cócteles de enzimas con un rendimiento y eficiencia mejoradas (Intasit et al., 2021). El cocultivo confina dos especies de hongos a un área con nutrientes y ambiente limitados, lo que hará que interactúen a través de por lo menos dos estrategias: antagonismo o sinergismo. En la primera de las estrategias, los hongos pueden biosintetizar metabolitos que podrían inhibir el crecimiento del otro hongo en co-cultivo, actuando como antagonistas, y en la segunda, puede producirse una interacción positiva sinérgica entre ellos (Intasit et al., 2021). Además de tener el potencial de aumentar la eficiencia de la hidrólisis enzimática, el co-cultivo también podrían servir para mejorar la eficiencia de la fermentación (Peláez et al., 2022).

Durante el proceso de cocultivo, los metabolitos producidos por una cepa podrían considerarse moléculas exógenas elicitoras en relación con la(s) de la(s) otra(s) cepa(s), para estimular la expresión de genes silenciados, a fin de generar nuevos productos naturales bioactivos (Kim, 2023). Cabe señalar que las estrategias de cocultivo han demostrado ser simples y eficientes, sin la necesidad de manipulaciones genéticas complejas ni el uso de reactivos químicos inductores costosos, y se han aplicado ampliamente y con éxito en el campo del descubrimiento de productos naturales derivados de nuevos microorganismos (Peng et al., 2021). En otras palabras, muchos grupos de genes biosintéticos permanecen silenciosos en las condiciones tradicionales de fermentación en monocultivo en el laboratorio, lo que limita severamente la diversidad química de los metabolitos secundarios obtenidos a través de la fermentación microbiana. El cocultivo de un consorcio de cepas de hongos, con diferentes características genéticas y fenotípicas, ha sido sugerido para producir cócteles de enzimas con actividades mejoradas (Peláez et al., 2021). Según Sanitá-Lima y Coutinho de Lucas (2022), el cocultivo de diferentes especies de hongos permite la generación de extractos enzimáticos ricos en varios tipos de enzimas, tales como celulasas, xilanasas y enzimas modificadoras de lignina.



Teniendo en cuenta los beneficios y el interés que surge por el uso de cocultivos para la producción enzimática, esta propuesta tiene como objetivo caracterizar los extractos enzimáticos producidos por el hongo de pudrición blanca ligninolítico *B. adusta* creciendo en forma individual (monocultivo) y en cocultivo con otra especie fúngica, en este caso de pudrición parda como es *G. trabeum*. Existe un amplio campo de investigación abierto a nuevos hallazgos, principalmente a la caracterización enzimática de nuevas especies fúngicas aplicando la estrategia del cocultivo. Resulta particularmente urgente estudiar, producir y caracterizar nuevos cócteles enzimáticos de hongos saprobios, que puedan resultar una alternativa a los cócteles comerciales, muchas veces de valor muy elevado, y que tienen una amplia aplicación en la transformación de la biomasa lignocelulósica (Maleki et al., 2020).

### **3. Hipótesis**

La producción de enzimas lignocelulolíticas extracelulares por el hongo de pudrición blanca de la madera *Bjerkandera adusta* se verá modificada en cocultivo con el hongo de pudrición parda *Gloeophyllum trabeum*, lo que resultará en la generación de extractos enzimáticos con diferentes especificidades y mayor actividad catalítica en comparación con el monocultivo.

### **4. Objetivos**

#### **4.1. Objetivo general**

Evaluar el crecimiento y la producción de enzimas lignocelulolíticas (hidrolíticas y oxidativas), por el hongo de pudrición blanca *B. adusta* en monocultivo y en cocultivo con *Gloeophyllum trabeum*, bajo condiciones de fermentación líquida.

#### **4.2. Objetivos específicos**

- Evaluar la interacción de *B. adusta* con *G. trabeum*, en cocultivo en medio sólido.
- Evaluar la producción de enzimas hidrolíticas y oxidativas extracelulares en *B. adusta* en monocultivo y en cocultivo con *G. trabeum*, bajo condiciones de fermentación líquida.
- Caracterizar los perfiles proteicos y actividades enzimáticas en los extractos parcialmente purificados de *B. adusta*, producidos en monocultivo y cocultivo.

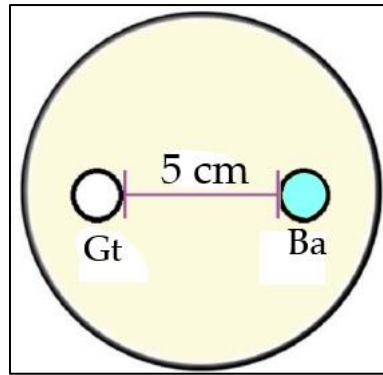
## **5. Materiales y Métodos**

### **5.1. Especies fúngicas.**

Se utilizó el basidiomiceto de pudrición blanca *Bjerkandera adusta* (cepa 30) y el basidiomiceto de pudrición parda *Gloeophyllum trabeum* (ATCC 11539), pertenecientes a la colección de cultivos del Laboratorio de Biotecnología de Hongos de la Universidad de Concepción, Campus Los Ángeles. Estas cepas fueron replicadas en medio extracto de malta y agar, 1% m/v (EMA), e incubadas por 10 días a 25°C para la obtención de cultivos stock.

### **5.2. Crecimiento de las especies fúngicas en monocultivo y cocultivo en medio sólido.**

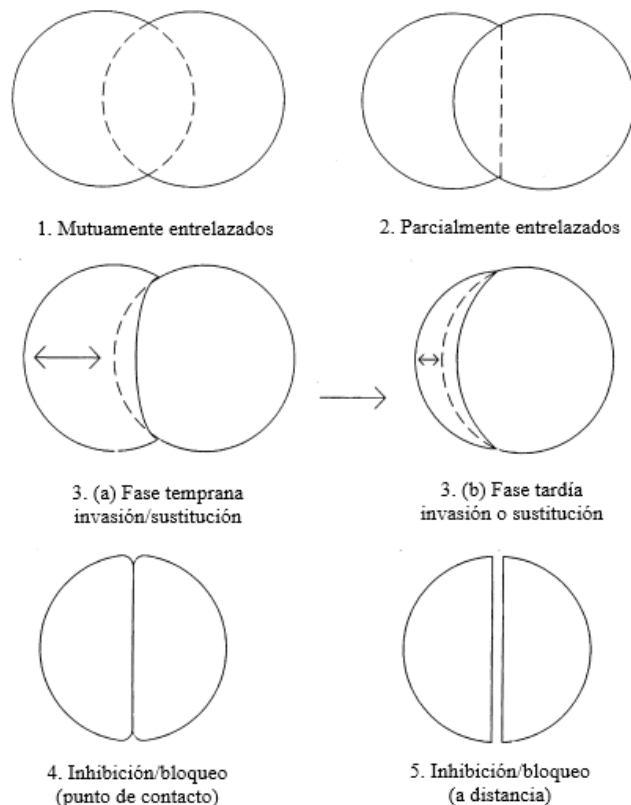
La compatibilidad de *B. adusta* con *G. trabeum* fue evaluada a través de las interacciones (positivas, negativas o neutras) entre ambas cepas en medio de cultivo sólido, en placas de Petri (9 cm) conteniendo medio MDT (composición de acuerdo con ítem 5.4) con agar (1,5%) (pH 5). Las placas se inocularon utilizando un disco de agar/micelio (5 mm) de *B. adusta* y *G. trabeum*, dispuestos uno frente al otro, y a aprox. 2 cm del borde de la placa, separados por una distancia de aprox. 5 cm de distancia entre sí (Fig. 1). Los cultivos control correspondieron a los monocultivos de ambas especies fúngicas, que se inocularon a 2 cm del borde de la placa, utilizando un disco de agar/micelio (5 mm). Además, se contó con un ensayo control en medio EMA, para monitorear el crecimiento micelial de los hongos. Todos los ensayos se realizaron en triplicado y las placas se incubaron a estufa (Binder BD 240) a 25°C, en oscuridad.



**Figura 1.** Diagrama representando la forma de inoculación del cocultivo en placas de Petri, con un disco de agar-micelio de cada hongo en la misma placa, separados por aprox. 5 cm. Gt = *Gloeophyllum trabeum*. Ba = *Bjerkandera adusta*.

Se realizaron registros fotográficos a los 2 y 10 días, evaluando los tipos de interacción entre las colonias fúngicas, utilizando una clave basada en las observaciones de Molla et al. (2001), donde se reconocieron 6 modos distintos de interacción (Fig. 2):

- I. Crecimiento micelial mutuamente entremezclado de las colonias de ambos hongos, sin signos macroscópicos de interacción.
- II. Crecimiento micelial parcialmente entrelazado de las colonias, un hongo se comporta como dominante respecto al otro.
- III. (i) Crecimiento entremezclado, donde el micelio del hongo de interés crece por encima o por debajo del micelio del hongo opuesto.  
(ii) Crecimiento entremezclado, donde el hongo de interés cesa su crecimiento y es sobrecrecido por el micelio del hongo opuesto.
- IV. Inhibición leve del crecimiento micelial cuando los hongos se acercan hasta casi entrar en contacto, formando una línea claramente visible de demarcación, de 1-2 mm, entre las dos colonias fúngicas.
- V. Inhibición micelial mutua a una distancia > 2 mm.



**Figura 2.** Diagrama representando las diferentes interacciones entre dos especies/cepas fúngicas, que se cultivan adyacentes (a 5 cm de distancia) (Molla et al., 2001).

### 5.3. Determinación del crecimiento micelial de las especies fúngicas en monocultivo y cocultivo.

Las mediciones en medio sólido en monocultivo y cocultivo se realizaron a los 2 y 10 días, mientras los hongos crecían activamente. El parámetro registrado fue el diámetro máximo de las colonias (cm) (monocultivo y cocultivo). Todas las mediciones fueron realizadas según Molla et al. (2001).

### 5.4. Medio de cultivo líquido para la producción de enzimas.

Todos los ensayos de producción y caracterización de enzimas (ítem 5.4-5.12) se llevaron a cabo en el Laboratorio de Bioquímica, del Departamento de Biotecnología, de la EEL -USP, Brasil, bajo la supervisión de la prof. Dra. Adriane Milagres.

Para los ensayos de producción de enzimas lignocelulolíticas por *B. adusta* se utilizó el medio MDT (Medio definido para *Trametes*) descrito por Roy y Archibald (1993). La composición del medio MDT consistió en 9 g/L de glucosa, 5 mM glutamina, 5

mM NaCl, 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM ácido succínico, 2,4 µM tiamina, y 1 mL/L de una solución 5 veces concentrada de sales (20 µM FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2 µM CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 5 µM ZnCl<sub>2</sub>, 20 µM MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 6 µM CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0,1 µM NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, y 0,5 µM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O). El pH del medio fue ajustado a 5,0 con NaOH. Para estimular la producción de enzimas lignocelulolíticas se utilizó como sustrato inductor salvado de trigo, el que se adicionó al medio MDT en concentración final de 1% (m/v). La esterilización de los medios se realizó en autoclave a 120°C durante 15 min.

### **5.5. Ensayo de producción enzimática de las especies fúngicas en cocultivo en medio líquido.**

Para los ensayos de producción de enzimas por *B. adusta* en monocultivo y cocultivo se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 mL, los que contenían 100 mL de medio MDT (pH 5) y 1 g de salvado de trigo. Los matraces (monocultivo y cocultivo) se inocularon en triplicado, con 4 discos de agar/micelio (5 mm) por especie, en forma simultánea, es decir 8 inóculos en total. Todos los inóculos fueron tomados de placas stock con cultivo activo de cada cepa fúngica. La incubación fue realizada en agitación a 120 rpm, y a una temperatura de 25°C, durante 10 días, en una incubadora refrigerada de piso (Spencer scientific H300, freezer/cooler).

### **5.6. Obtención y caracterización de los extractos enzimáticos.**

Al completarse los 10 días de incubación, los caldos enzimáticos fueron filtrados, usando papel filtro en un sistema Kitasato con bomba de vacío, y éstos fueron envasados y almacenados a 4°C. Los filtrados fueron posteriormente concentrados 5 veces por un sistema de ultrafiltración Amicon® Stirred Cell setup (MilliporeSigma), utilizando una membrana con diámetro nominal de poros de 10 kDa. La caracterización enzimática de los extractos concentrados fue realizada a través de la determinación de la actividad endoglucanasa (EG), xilanasas, peroxidasa, lacasa, peroxidasa versátil, manganeso peroxidasa (MnP), β-glucosidasa, β-xilosidasa y monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMO).

Adicionalmente, en los extractos también fue determinada la concentración de proteínas solubles y el pH final.

### **5.7. Determinación de actividades enzimáticas de los extractos fúngicos.**

Las enzimas hidrolíticas endoglucanasas (EG) fueron analizadas utilizando como sustrato enzimático carboximetilcelulosa (CMC) al 0,44% (m/v) (Tan et al, 1987), y las xilanasas utilizando como sustrato enzimático xilano de bétula (birchwood) al 1% (m/v) (Bailey et al., 1992). Ambos sustratos fueron preparados en buffer acetato de Na 50 mM (pH 5) y los azúcares reductores resultantes de la hidrólisis de los sustratos se midieron mediante el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) a 540 nm (Miller, 1959). Los valores de absorbancia se transformaron en concentración de glucosa (mg/mL) o xilosa (mg/mL), respectivamente, utilizando curvas de calibración de cada uno de los azúcares.

Las actividades de  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -xilosidasa se midieron utilizando el mismo método, de acuerdo con Mallerman et al. (2015), pero con diferentes sustratos enzimáticos. En el caso de la  $\beta$ -glucosidasa se utilizó p-nitrofenil-  $\beta$ -D-glucopiranosido (pNPG) y para la  $\beta$ -xilosidasa se utilizó p-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosido (pNPX). La lectura de absorbancia se realizó a 410 nm ( $\epsilon_{410\text{nm}} = 15.366 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), y los valores se transformaron en concentraciones de p-nitrofenol liberado utilizando la ecuación de Lambert-Beer.

La actividad peroxidasa fue analizada a través de la oxidación del 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) 5 mM, en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Bourbonnais y Paice, 1990). La cinética de oxidación del sustrato se midió a 420 nm durante 5 min ( $\epsilon_{420 \text{ nm}} = 36.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). La actividad de lacasa fue analizada a través de la oxidación de ABTS, en ausencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , siguiendo la misma metodología de peroxidasa. La actividad de manganeso peroxidasa (MnP) fue determinada por la oxidación de rojo de fenol 0,1% en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  2mM (Khindaria et al., 1994). La lectura de absorbancia se realizó a 610 nm ( $\epsilon_{610\text{nm}} = 22.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). La actividad de peroxidasa versátil (VP) fue medida siguiendo la metodología de Mester y Field (1997), utilizando 2,6-dimetoxifenol (2,6-DMP) como sustrato enzimático en presencia y ausencia de sulfato de manganeso (II) ( $\text{MnSO}_4$ ).

La oxidación del sustrato se siguió durante 5 min a 469 nm ( $\epsilon_{469\text{nm}} = 49600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). La actividad VP se expresó como la diferencia de la actividad en presencia y ausencia de  $\text{MnSO}_4$ .

La actividad de la enzima monooxigenasa lítica de polisacáridos (LPMO) se determinó de acuerdo con Breslmayr et al. (2018), utilizando 2,6-dimetoxifenol (2,6-DMP) 1,0 mM como sustrato en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  5 mM, y la oxidación del sustrato se siguió durante 5 min a 469 nm ( $\epsilon_{469\text{nm}} = 53.200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

Todos los ensayos se realizaron utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (Hitachi U-2900). En todos los casos, una unidad de actividad enzimática (UI) se definió como la cantidad de enzima que produce 1  $\mu\text{mol}$  de producto por min.

### **5.8. Concentración de proteínas extracelulares solubles y determinación de pH de los extractos fúngicos**

En los extractos concentrados se determinó la concentración de proteínas solubles extracelulares utilizando el método de Bradford (Bradford et al. 1976), con el reactivo Coomassie Brilliant Blue G-250, y leyendo la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro UV/Visible (TU-1810 Split Beam). Se construyó una curva de calibración con albúmina sérica bovina (BSA), para transformar los valores de absorbancia en concentración de proteínas (mg/mL).

El pH de los extractos fúngicos (monocultivos y cocultivo) fue medido en un pHmetro de mesón Quimis Q400AS, el cual fue debidamente calibrado con buffer pH 9,18, 6,86 y 4,01.

### **5.9. Electroforesis PAGE nativa de los extractos enzimáticos.**

Para la caracterización de los perfiles proteicos de los extractos enzimáticos concentrados de *B. adusta*, obtenidos del monocultivo y cocultivo, se utilizó la técnica de electroforesis en gel de acrilamida, bajo condiciones no desnaturantes (PAGE nativa). Esta electroforesis permitió además estimar los pesos moleculares de las proteínas presentes en los extractos fúngicos y detectar la presencia de las enzimas peroxidasa y xilanasas, a través de la visualización de la actividad catalítica de las enzimas con ABTS y xilano, respectivamente.



Las muestras obtenidas de los extractos fueron inicialmente concentradas 5 veces mediante una membrana de 10 kDa utilizando el sistema Amicon® Stirred Cell (MilliporeSigma) (ítem 5.6), y posteriormente fueron concentrados otras 20 veces mediante una unidad de filtración centrífuga Microcon de 30 kDa. De estas muestras, se cargaron volúmenes de 20 µL en los geles de electroforesis. También se cargó en el gel 40 µL de un marcador de PM (14,1 – 97 kDa) (Low molecular weight calibration kit for sds electrophoresis-Cytiva 17-0446-01 (GE healthcare). Para la electroforesis PAGE nativa se utilizaron los componentes y soluciones detallados en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Reactivos utilizados para la preparación de los geles de electroforesis PAGE nativa para proteínas y para detección de actividad enzimática.

Gel de corrida (para 10 mL)	Gel de amplificación (3 mL)	Buffer de corrida 10x (pH 8,3)	Colorante Azul de Coomassie
ABTS 2 mM, 2,4 mL (o xilano 1%) Acrilamida 30%, 5,0 mL Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8), 2,5 mL Persulfato de amonio 10%, 0,1mL TEMED 0,004 mL	Agua 2,13 mL Acrilamida 30%, 0,5 mL Tris-HCl 1 M (pH 6,8), 0,38 mL Persulfato de amonio 10%, 0,03 mL TEMED 0,003 mL	187,7 g - Glicina 30,3 g - buffer TRIS	2 g de azul de Coomassie  400 mL de agua destilada

Los geles de corrida fueron instalados en el Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell. Las muestras se prepararon con un buffer de glicerol y azul de bromofenol, cargándolas en sus respectivos pocillos y dejándolas correr a 120 V durante 40-60 min, dependiendo de la naturaleza de la proteína. Posterior a la electroforesis, se dividió el gel en dos mitades. La primera mitad del gel se tiñó con azul de Coomassie para detección de proteínas durante 1 h, seguido de un lavado con 500 mL de metanol y 100 mL de agua. Después de 1 h, la primera mitad del gel, ya decolorado, se separó para el análisis de bandas.

La segunda mitad del gel se utilizó para llevar a cabo el zimograma que permitiría visualizar la actividad de la peroxidasa. Para ello, se procedió a acidificar el medio que contenía el gel, ya que la actividad catalítica de la peroxidasa es mayor a pH 5. Se agregó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 mM al gel y se incubó durante 30 min a 50 °C, observando los cambios en la coloración del gel. En este caso, la actividad de peroxidasa se visualizó como la aparición de bandas color verde oscuro en el gel, debido a la oxidación del ABTS por la peroxidasa. Para obtener una imagen comparativa de ambos geles, se reunieron nuevamente y se capturo la imagen del gel mediante un Gel Doc EZ Gel Documentation System y el software Image Lab 5.2.1.

Una segunda corrida electroforética (PAGE nativa) fue realizada en idénticas condiciones (Tabla 1), excepto porque el gel de corrida se preparó utilizando xilano 1% en vez de ABTS. Luego de la electroforesis, a la primera mitad del gel se le realizó el mismo tratamiento con azul de Coomassie antes mencionado. La segunda mitad del gel se utilizó para llevar a cabo el zimograma que permitiría visualizar la actividad de xilanasas. Para ello el gel se sometió a tinción con rojo Congo al 1% durante 30-40 min. Luego, al igual que para la detección de peroxidasa, se procedió a acidificar el medio a pH 5. Después de 30 min de incubación a 50°C, se procedió a realizar un lavado con NaCl 10 M para permitir una mejor visualización de las bandas de actividad xilanasas. En este caso, la actividad xilanasas se visualiza por la aparición de bandas transparentes en el gel colorido.

#### **5.10. Purificación de los extractos enzimáticos mediante cromatografía de intercambio iónico.**

Todos los pasos de purificación de los extractos enzimáticos se llevaron a cabo en un sistema de Cromatografía Líquida de Proteínas a Alta Velocidad con detector UV (FPLC por sus siglas en inglés) (Ákta Start/Cytiva). Antes de iniciar la purificación por FPLC, se procedió a concentrar 5 veces los extractos enzimáticos utilizando el sistema Amicon® Stirred Cell setup (MilliporeSigma) con una membrana de polietersulfona de 10 kDa de corte. La purificación consistió en una cromatografía de intercambio iónico utilizando una columna de 10 mL (tamaño 10 cm) rellena con resina de intercambio aniónico DEAE-Sepharose CL6B (GE Healthcare Life

Science). La columna se equilibró con un tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 6,0). Se prepararon series cromatográficas mediante inyecciones de 2 mL del extracto enzimático concentrado, recolectando fracciones de 1 mL. Para la elución de las proteínas, se empleó un gradiente de NaCl 500 mM, aplicándolo a la columna de 20 en 20% hasta completarse el 100% de NaCl. La velocidad de flujo a la cual se realizó la corrida cromatográfica fue de 1 mL/min. Las fracciones de cada pico se recogieron de manera automatizada y se analizaron midiendo la absorbancia a 280 nm. Finalmente, se evaluó la actividad enzimática de endoglucanasa y peroxidasa del primer y último pico eluído por la columna.

#### **5.11. Análisis de datos**

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95 % para comparar la varianza de los datos experimentales por triplicado utilizando el programa Statistica Versión 10, para comparar la producción enzimática del cocultivo y los monocultivos. Se utilizó el Test Tukey para determinar las diferencias significativas. Las diferencias con valores de  $P \leq 0,05$  se consideraron significativas.

## 6. Resultados

### 6.1 Evaluación de la interacción y crecimiento micelial de *B. adusta* y *G. trabeum* en medio de cultivo sólido.

La morfología de los micelios y el crecimiento (cm) de las colonias de *B. adusta* y *G. trabeum* fueron evaluados durante 10 días en los medios de cultivo EMA, utilizado como un medio base estándar, y MDT, utilizado como un medio específico para producción de enzimas por hongos de pudrición de la madera, enriquecido en nutrientes minerales y vitaminas.

Los patrones de crecimiento de *B. adusta* y *G. trabeum* se evaluaron individualmente y en cocultivo. El crecimiento individual de *B. adusta* se caracteriza por la formación de micelio abundante y algodonoso, blanco, y que a los 10 días de cultivo ocupa casi la totalidad de la placa (Fig. 3). En tanto que *G. trabeum* inicialmente presenta un micelio blanco, pero adquiere un color amarillento al pasar los días. El desarrollo del micelio en este caso fue mucho menor al de *B. adusta* a los 10 días de cultivo (Fig. 3).

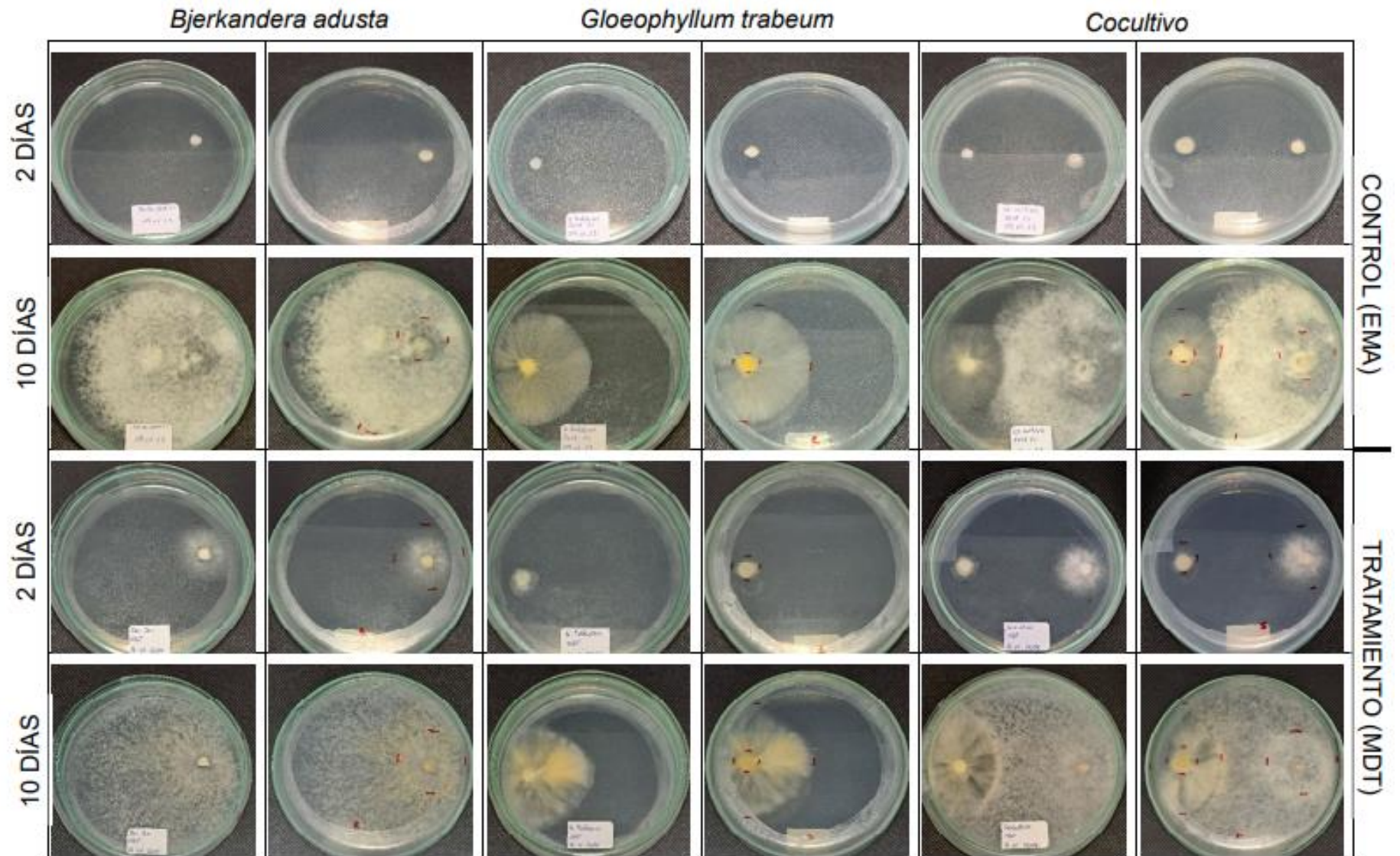
Al comparar el crecimiento en ambos medios de cultivo, se observan diferencias entre ambas especies. En medio MDT, se puede apreciar que *B. adusta* en monocultivo presenta un crecimiento de las colonias más rápido (Tabla 2) y homogéneo al terminar el periodo de incubación, respecto al crecimiento en medio EMA. Sin embargo, la densidad micelial aparente fue mucho menor en MDT que en EMA (Fig. 3). En el caso de *G. trabeum* en monocultivo, al finalizar el tiempo de incubación, se observó un micelio más abundante y con mayor pigmentación amarilla en el medio MDT, pero con una densidad aparente similar en ambos medios (Fig. 3). En cuanto al crecimiento de sus colonias, éste fue similar en ambos medios, pero fue aproximadamente 50% menor que el de *B. adusta* (Tabla 2).

En el cocultivo, tanto en medio EMA como MDT ambas especies crecieron en los medios sin mostrar una zona de inhibición o bloqueo, al finalizar el tiempo de incubación. Además, no se observó pigmentación en la interfaz de los micelios en cocultivo, de esta manera se puede apreciar un patrón de crecimiento entremezclado, sugiriendo que las cepas son totalmente compatibles (Fig. 3). En

este caso, el micelio del hongo de interés (*B. adusta*) crece por encima o por debajo del micelio del hongo opuesto (Fig. 3). No se observaron cambios en la densidad aparente de los micelios en cocultivo respecto a los crecimientos en monocultivo de ambas especies. En cuanto al crecimiento de las colonias (cm), solamente se observó una leve tendencia a la disminución respecto a los monocultivos, a los 2 o 10 días de incubación (Tabla 2).

**Tabla 2.** Crecimiento micelial de los hongos *B. adusta* y *G. trabeum* en monocultivo y cocultivo.

	Control EMA (cm)		Tratamiento MDT (cm)	
	Diámetro de las colonias		Diámetro de las colonias	
	2 Días	10 Días	2 Días	10 Días
<i>B. adusta</i>	2,20 ± 0,100	9,80 ± 0,10	3,33 ± 0,115	11,66 ± 0,473
<i>G. trabeum</i>	1,20 ± 0,173	5,33 0,321	1,17 ± 0,153	5,033 ± 0,493
<i>B. adusta</i> Cocultivo	1,667 ± 0,551	7,30 0,458	3,27 ± 0,058	9,60 ± 0,265
<i>G. trabeum</i> Cocultivo	1,033 ± 0,058	4,167 0,351	1,167 ± 0,21	5,567 ± 1,002

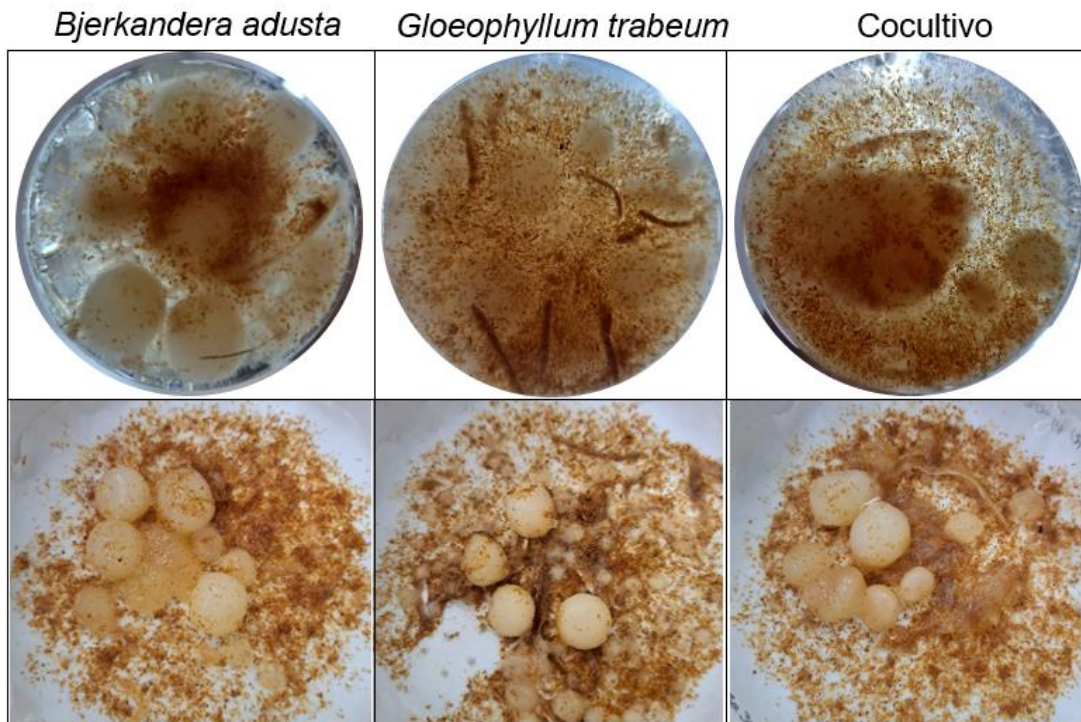


**Figura 3.** Patrón de crecimiento de *B. adusta* y *G. trabeum* en monocultivo y cocultivo, en placas con medio EMA y MDT, pH 5, a los 2 y 10 días de incubación a 28 °C. En los cocultivos, el inóculo de la derecha corresponde a *B. adusta* y el de la izquierda a *G. trabeum*. Las fotografías de cada hongo son las placas Petri por el frente (izquierda) y por el reverso (derecha).

## 6.2 Determinación de actividad enzimática, contenido de proteínas solubles y pH final de los monocultivos y cocultivo en medio líquido.

Para determinar la producción de enzimas lignocelulolíticas (oxidativas e hidrolíticas) por *B. adusta* en cocultivo con *G. trabeum*, los hongos se cultivaron durante 10 días en medio MDT (pH 5) suplementado con salvado de trigo (1% m/v), bajo agitación (120 rpm). Los cultivos control de este ensayo correspondieron a los monocultivos de ambas especies, incubados bajo idénticas condiciones. Al completarse el periodo de incubación se procedió a filtrar y concentrar 5x los caldos enzimáticos de cada hongo y del cocultivo.

Durante el cultivo se observó que ambas especies crecieron formando *pellets* esféricos propios de un cultivo en agitación (Fig. 4). *B. adusta* en la condición de agitación tuvo un crecimiento micelial en *pellets* abundante, sin pigmentación del micelio ni del caldo de cultivo, manteniéndolo incoloro hasta finalizar el periodo de cultivo. *G. trabeum* presentó un menor crecimiento del micelio, pero el caldo de cultivo presentó una pigmentación anaranjada. En el cocultivo se observó un crecimiento abundante, semejante al de *B. adusta* en monocultivo, y se presentaron cambios en la pigmentación del caldo de cultivo, siendo de un color ámbar (Fig. 4).

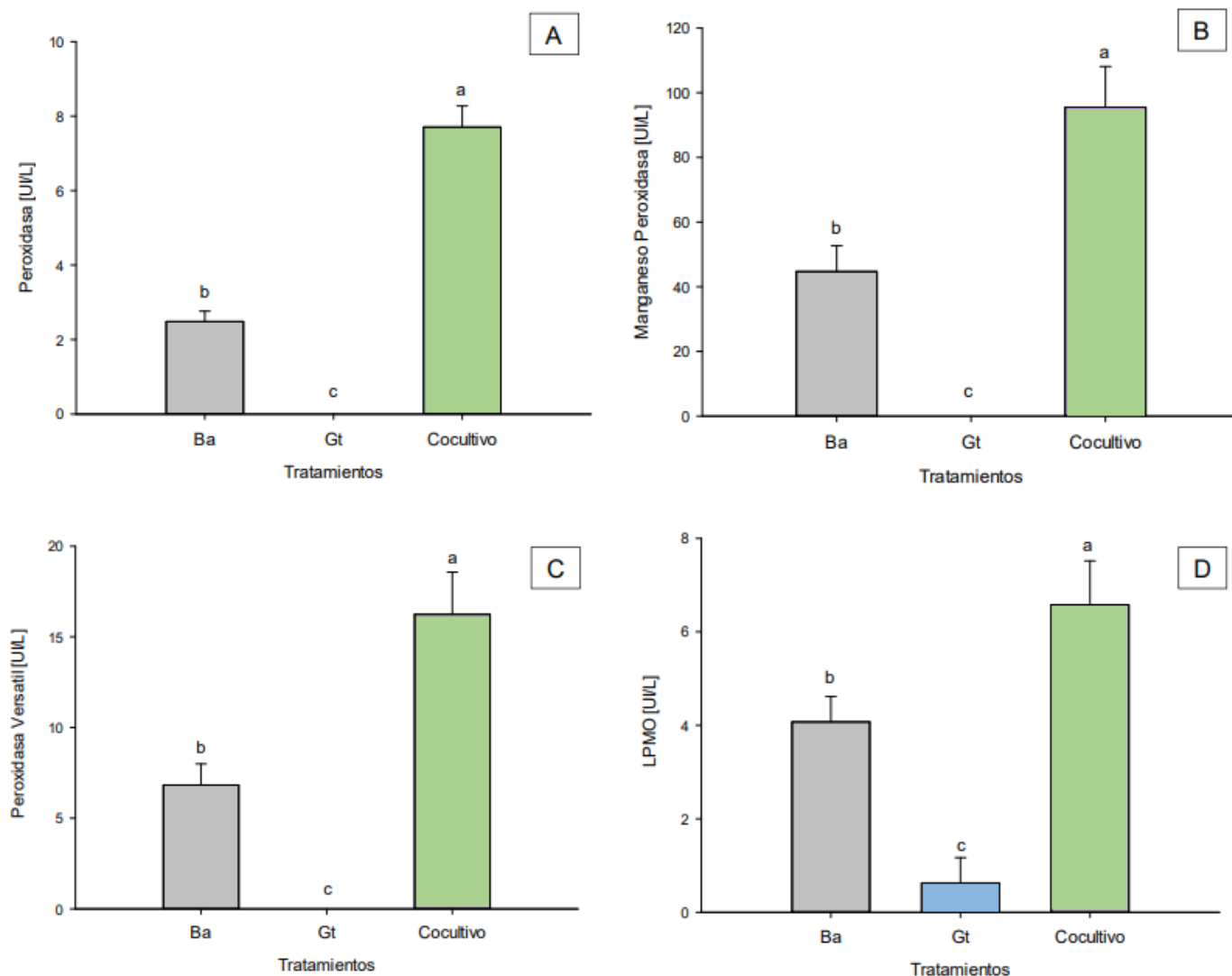


**Figura 4.** Cultivos de *B. adusta* y *G. trabeum* al finalizar los 10 días de incubación a 25°C en agitación (120 rpm). Las fotografías superiores corresponden a los caldos de cultivo en matraces Erlenmeyer, y las fotografías inferiores corresponden a la biomasa micelial una vez filtrados los caldos.

Al determinar la actividad enzimática a los 10 días de incubación, fue posible detectar la mayoría de las enzimas oxidativas sólo en los caldos extracelulares de *B. adusta* en monocultivo. En cambio, en los caldos del monocultivo de *G. trabeum* sólo fue posible detectar la actividad de la enzima auxiliar LPMO, aunque su actividad fue significativamente menor que la de *B. adusta* (Fig. 5). En *G. trabeum* no se detectó actividad de peroxidasa, manganeso peroxidasa ni peroxidasa versátil, bajo las condiciones experimentales utilizadas (Fig. 5 A, B y C). En los cocultivos de *B. adusta* y *G. trabeum* fue posible detectar un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de todas las enzimas oxidativas evaluadas (Fig. 5). Para el caso de las peroxidasas el aumento de actividad fue de entre 3 veces (peroxidasa) a 2,3 veces (peroxidasa versátil y MnP) en los cocultivos respecto al monocultivo de *B. adusta*. Cabe destacar que, aunque la presencia de lacasa fue medida en todos los cultivos, dicha actividad no fue detectada bajo las condiciones experimentales utilizadas.



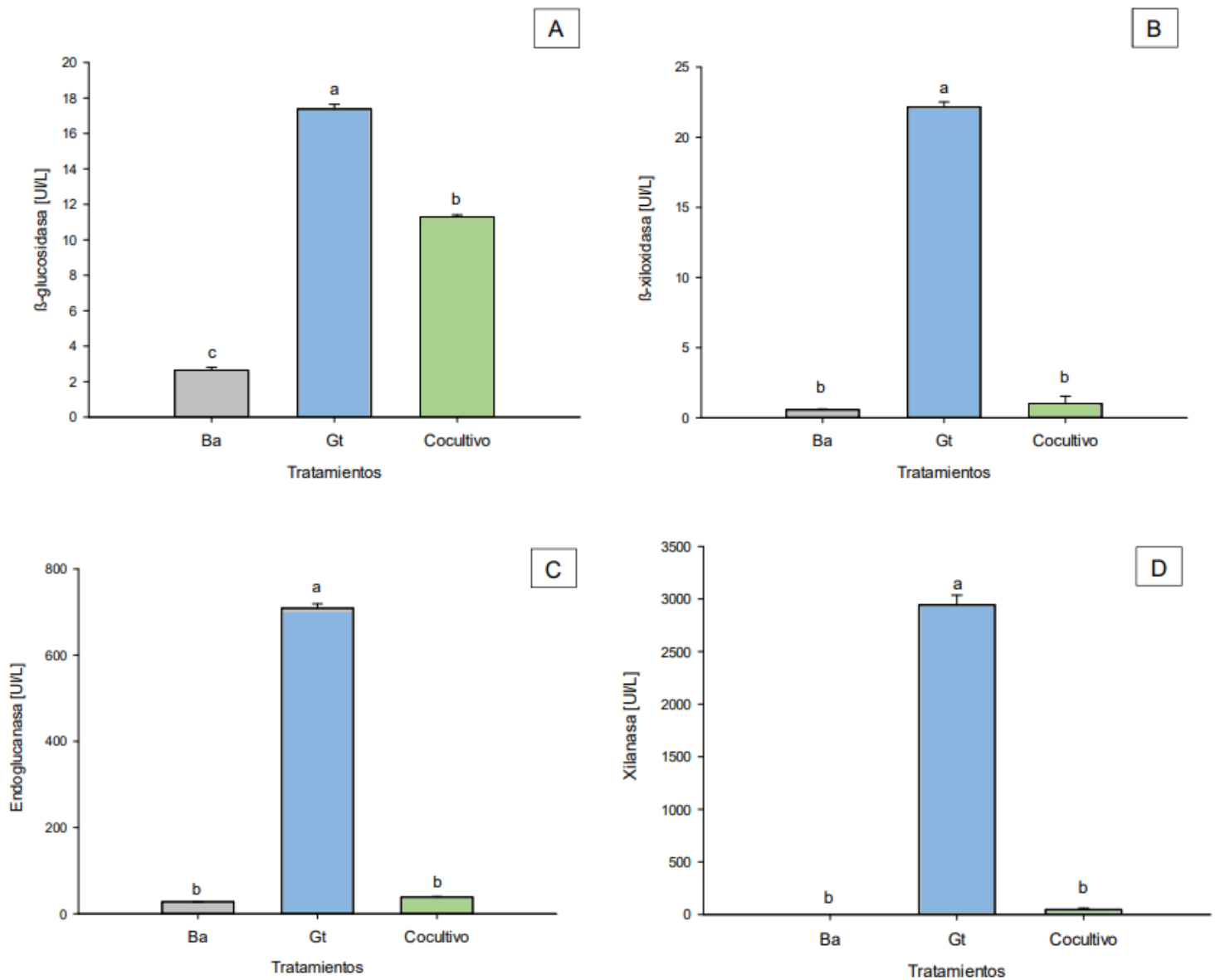
Para el caso de LPMO (Fig. 5 D) la actividad en el cocultivo de ambos hongos (6,579 UI/L) fue mayor a la suma de las actividades enzimáticas de los monocultivos de *B. adusta* (4,073 UI/L) y *G. trabeum* (0,627 UI/L). Cabe señalar que ésta fue la única actividad oxidativa de las evaluadas que fue detectada en el monocultivo de *G. trabeum* (Fig. 5 D).



**Figura 5.** Actividades enzimáticas oxidativas de peroxidasa (A), manganeso peroxidasa (B), peroxidasa versátil (C) y LPMO (D), de los monocultivos y cocultivo concentrado (5x) de *B. adusta* (Ba) y *G. trabeum* (Gt), a los 10 días de incubación en medio de cultivo líquido MDT suplementado con salvado de trigo (1%). Caldos fúngicos concentrados 5x. Letras sobre cada barra indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ) (análisis ANOVA y Test Tukey).

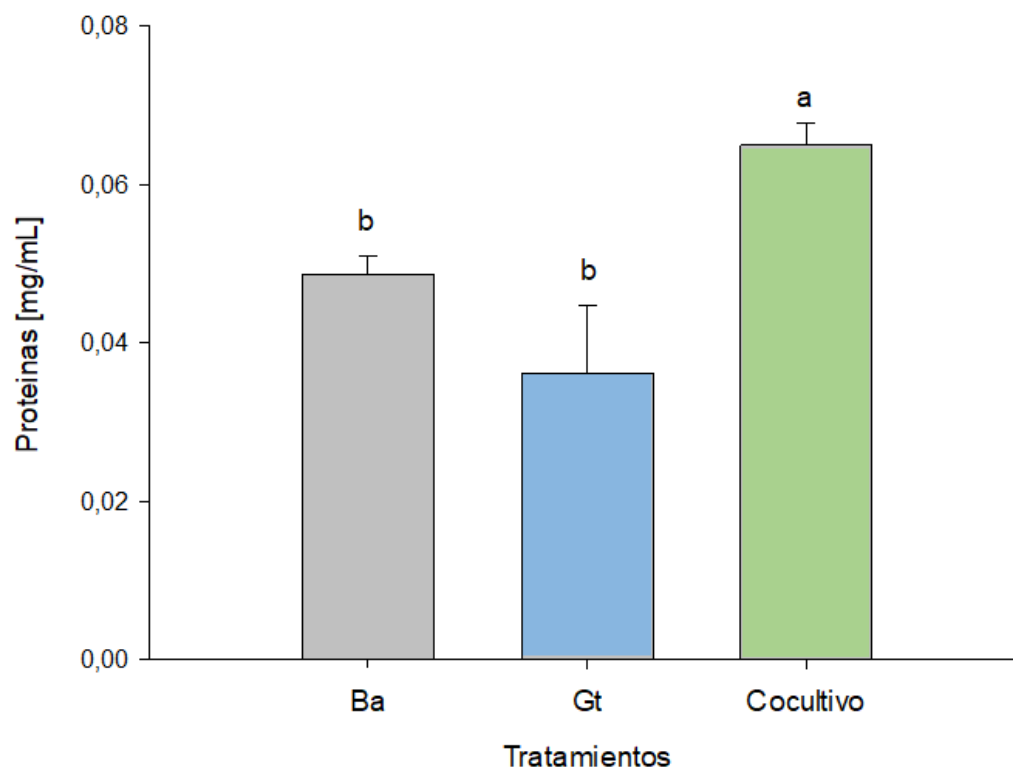
Al determinar la actividad de las enzimas hidrolíticas del complejo celulolítico ( $\beta$ -glucosidasa y endoglucanasa) y hemicelulolítico ( $\beta$ -xilosidasa y xilanasa), a los 10 días de incubación, en los caldos extracelulares de los monocultivos de *B. adusta*, *G. trabeum* y el cocultivo, todas las enzimas fueron detectadas, con diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los extractos (Fig. 6). A diferencia de las enzimas oxidativas, las mayores actividades de todas las enzimas hidrolíticas fueron detectadas en los monocultivos de *G. trabeum*, actividades que fueron significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) que en los monocultivos de *B. adusta*. *B. adusta* en monocultivo presentó muy bajas actividades de  $\beta$ -glucosidasa (2,65 UI/L),  $\beta$ -xilosidasa (0,57 UI/L) y endoglucanasa (27,6 UI/L), y no fue posible detectar actividad de xilanasa en este hongo (Fig. 6 D).

En el caso del cocultivo de ambas especies fúngicas la actividad de las enzimas hidrolíticas se redujo significativamente ( $p < 0,05$ ) a los 10 días de cultivo, respecto a las del monocultivo de *G. trabeum*, pero no tuvieron diferencias estadísticas respecto a las de *B. adusta* (Fig. 6). Solamente en el caso de la actividad de la enzima  $\beta$ -glucosidasa, la actividad del cocultivo fue mayor a la de *B. adusta*, pero menor que la de *G. trabeum*, con diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ) en todos los casos (Fig. 6 A).



**Figura 6.** Actividades enzimáticas hidrolíticas de  $\beta$ -glucosidasa (A),  $\beta$ -xilosidasa (B), endoglucanasa (C) y xilanasa (D) en los monocultivos y el cocultivo de *B. adusta* (Ba) y *G. trabeum* (Gt), a los 10 días de incubación en medio de cultivo líquido MDT suplementado con salvado de trigo (1%). Caldos fúngicos concentrados 5x. Letras sobre cada barra indican diferencias significativas entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ) (análisis ANOVA y Test Tukey).

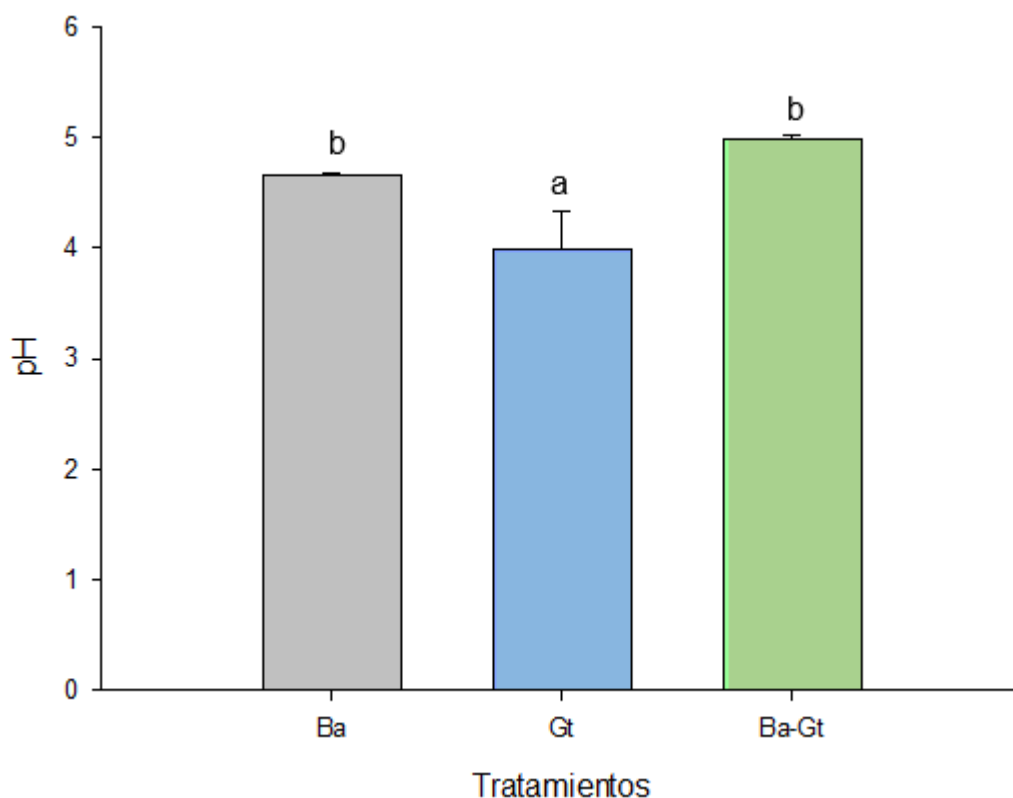
Para las proteínas solubles extracelulares de los caldos (Fig. 7), no se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los monocultivos de *B. adusta* (0,049 mg/mL) y *G. trabeum* (0,036 mg/mL). Sin embargo, sí se observaron diferencias en la concentración de proteínas de los dos monocultivos respecto al cocultivo. Los valores en general fueron bajos, y en el cocultivo se detectó la mayor concentración de proteínas (0,065 mg/mL).



**Figura 7.** Contenido de proteínas solubles en los extractos enzimáticos de los monocultivos y del cocultivo de *B. adusta* (Ba) y *G. trabeum* (Gt), a los 10 días de incubación en medio de cultivo líquido MDT suplementado con salvado de trigo (1%). Caldos fúngicos concentrados 5x. Letras sobre cada barra indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ) (análisis ANOVA y Test Tukey).

El pH final de los cultivos fúngicos no tuvo grandes modificaciones respecto al pH inicial (pH 5), excepto en el caso del monocultivo de *G. trabeum* que fue el que más acidificó el medio (pH 3,98). Así, sólo se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre el pH del monocultivo de *G. trabeum* respecto al monocultivo de *B.*

*adusta* (pH 4,65) y el cocultivo (pH 4,98). No se observaron diferencias entre el pH del monocultivo de *B. adusta* respecto al cocultivo (Fig. 8).



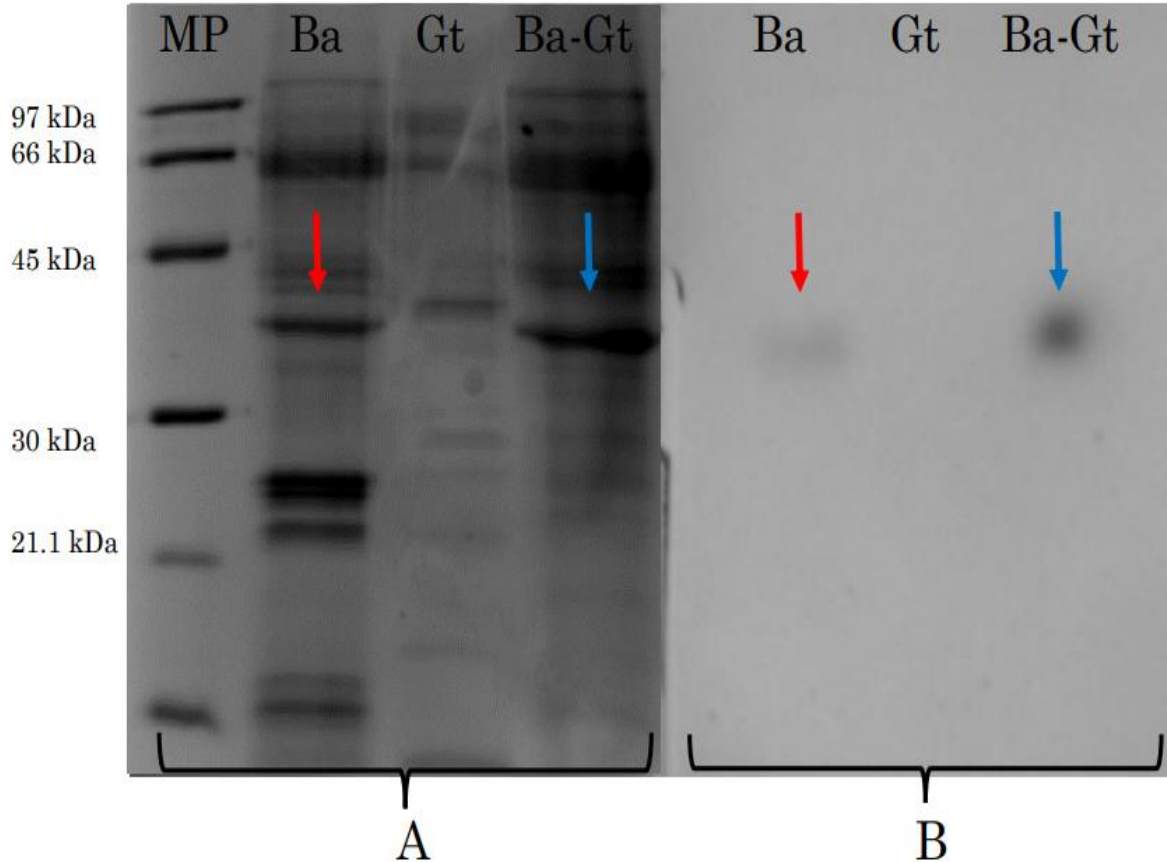
**Figura 8.** Determinación de pH final de los extractos enzimáticos de los monocultivos y del cocultivo de *B. adusta* (Ba) y *G. trabeum* (Gt), a los 10 días de incubación en medio de cultivo líquido MDT suplementado con salvado de trigo (1%). Caldos fúngicos concentrados 5x. Letras sobre cada barra indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ) (análisis ANOVA y Test Tukey).

### 6.3. Electroforesis PAGE nativa de proteínas y zimogramas de peroxidasas y xilanasas de los monocultivos y cocultivo.

Para analizar el perfil de proteínas en los extractos fúngicos en monocultivo y cocultivo, se realizó una electroforesis en condiciones no desnaturalantes (PAGE nativa). Esta técnica permitió además estimar la masa molecular de las proteínas, y detectar enzimas del tipo peroxidasas y xilanasas en los extractos fúngicos a través de zimogramas.

En la electroforesis de proteínas se observa una gran cantidad de bandas de diferente intensidad en el extracto del monocultivo de *B. adusta*, que se distribuyen en un rango aproximado de masa molecular entre 20 - 66 kDa, de acuerdo con el marcador estándar utilizado (Fig. 9 A). Por el contrario, en los extractos del monocultivo de *G. trabeum* las bandas de proteínas aparecen en menor número e intensidad que en *B. adusta*, y las bandas más importantes se distribuyen en un rango de 40 - 90 kDa aproximadamente (Fig. 8A). El perfil proteico del cocultivo de los hongos muestra varias bandas intensas, con una distribución semejante a las del extracto de *B. adusta*, pero sólo en el rango de masa molecular  $\geq 35$  kDa. Por debajo de los 30 kDa, las bandas proteicas intensas que aparecen en el extracto de *B. adusta* desaparecen completamente en el cocultivo. Al comparar el perfil proteico de *G. trabeum* con el perfil del cocultivo, también se observa la desaparición de por lo menos una banda, la de menor masa molecular (aprox. 40 kDa) (Fig. 8 A).

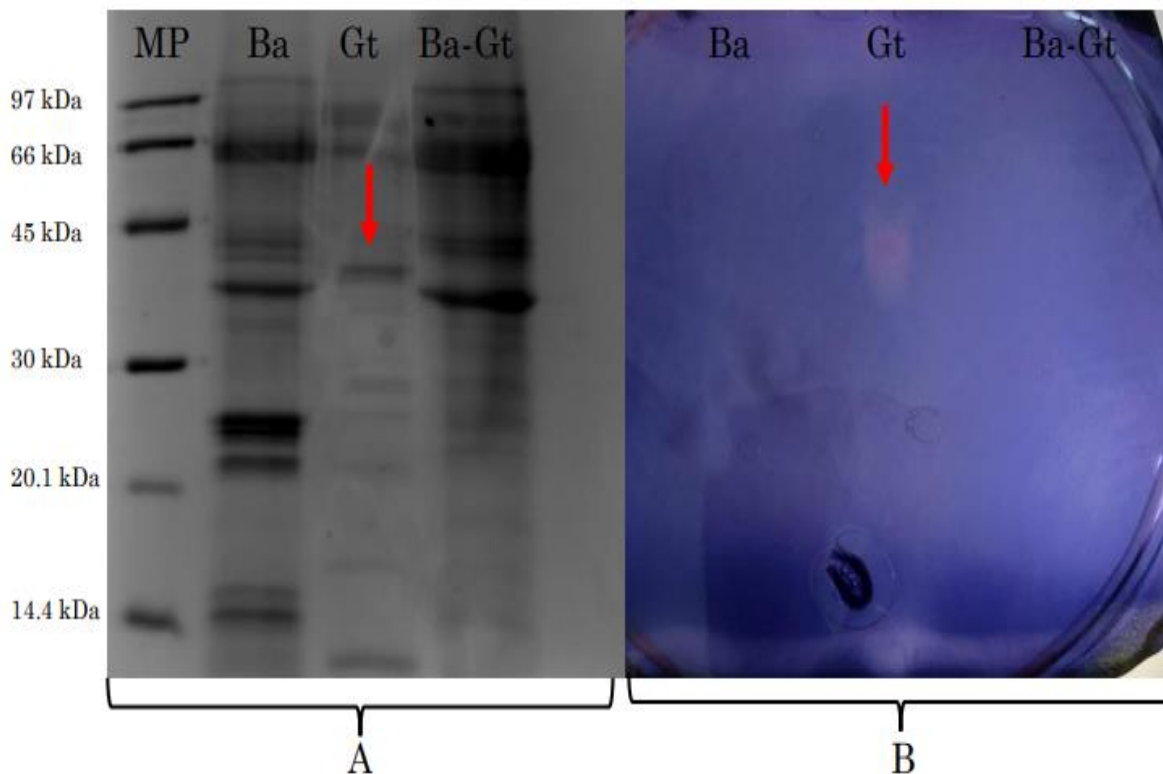
La realización del zimograma para peroxidasas utilizando ABTS como sustrato enzimático, permitió detectar visualmente la presencia de la enzima en el gel, por la aparición de una mancha de color, resultado de la oxidación del sustrato (Fig. 9 B). En este caso, se observa una reacción positiva sólo en los extractos del monocultivo de *B. adusta* y en el cocultivo, donde la reacción fue de mayor intensidad. De esta forma se confirma la presencia de peroxidasas en los extractos de *B. adusta* y del cocultivo, y su ausencia en los extractos de *G. trabeum*. Además, se puede observar que la actividad de peroxidasa se correspondería con las bandas de mayor intensidad en el extracto de *B. adusta* y del cocultivo, que se encuentran en el rango de masa molecular aproximada de 35 kDa.



**Figura 9.** Electroforesis PAGE nativa de los extractos enzimáticos de los monocultivos de *B. adusta* (Ba) y *G. trabeum* (Gt) y del cocultivo (Ba-Gt). (A) Perfil de proteínas extracelulares de los monocultivos y cocultivo, y (B) zimograma para detección de peroxidasas con ABTS 2 mM y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 mM. MP = Marcador de peso molecular estándar (kDa). Flechas indican las bandas proteicas (A) de *B. adusta* (roja) y del cocultivo (azul) que se corresponderían con las bandas de actividad peroxidasa (B). Caldos fúngicos concentrados 20x.

La realización del zimograma para xilanasas utilizando xilano como sustrato enzimático, permitió detectar visualmente la presencia de la enzima en el gel, a través de la aparición de un halo transparente en el gel luego de la revelación con Rojo Congo, producido por la hidrólisis del xilano (Fig. 10 B). El halo de reacción positiva en este caso sólo apareció en los extractos del monocultivo de *G. trabeum* (flecha roja), indicando la presencia de xilanasas en estos extractos. La xilanasas

aparece en una región que correspondería a un rango de masa molecular entre 35-45 kDa (Fig. 10 B).



**Figura 10.** Electroforesis PAGE nativa de los extractos enzimáticos de los monocultivos de *B. adusta* (Ba) y *G. trabeum* (Gt) y del cocultivo (Ba-Gt). (A) Perfil de proteínas extracelulares de los monocultivos y cocultivo, y (B) zimograma para detección de xilanasas con xilano 1% (m/v) y revelado con Rojo Congo 1%. MP = Marcador de peso molecular estándar (kDa). Flechas indican la banda de proteínas (A) en *G. trabeum* que se correspondería con la banda de actividad xilanasas (B). Caldos fúngicos concentrados 20x.

#### 6.4. Purificación de los extractos enzimáticos mediante cromatografía de intercambio iónico.

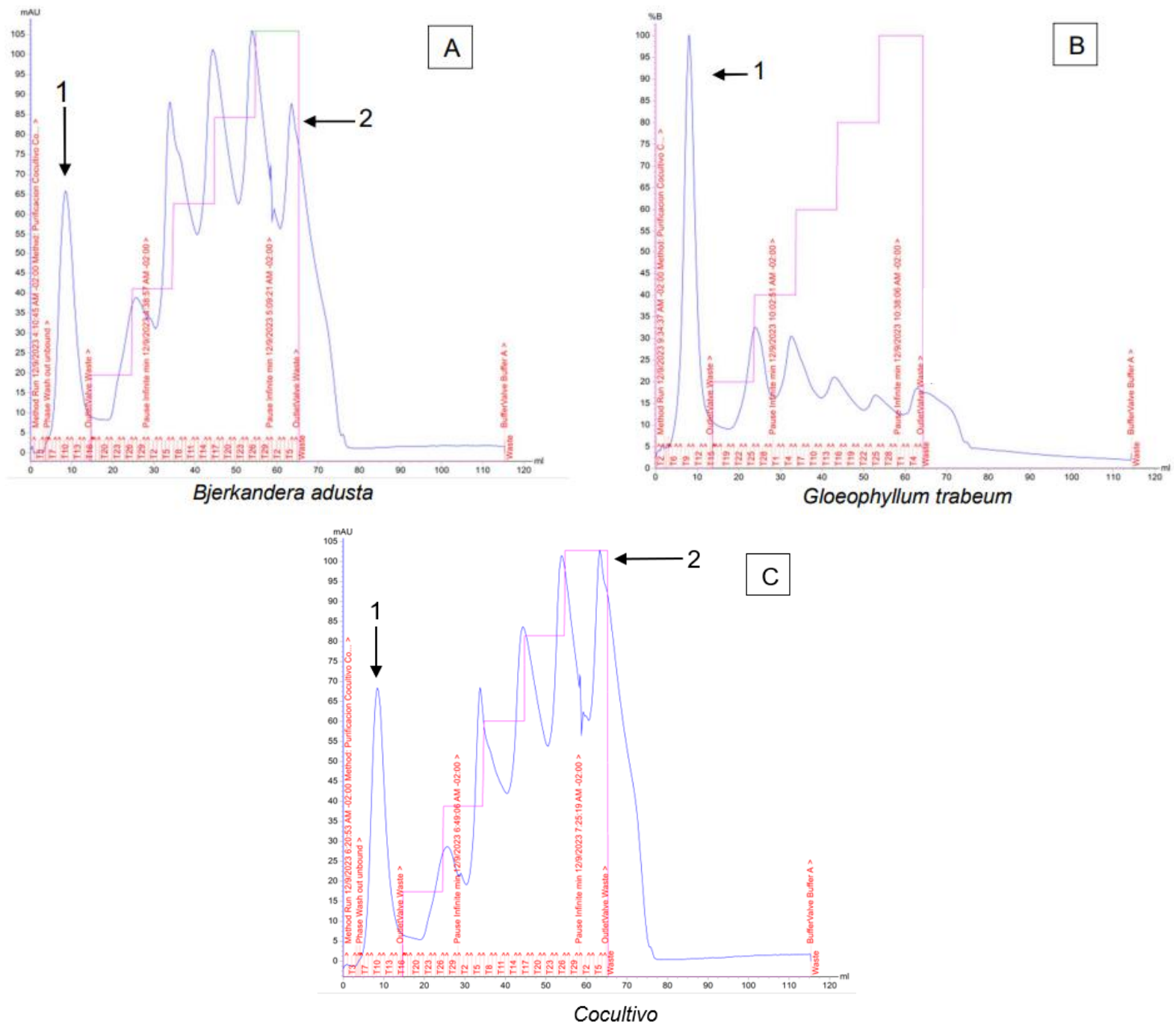
El perfil proteico de los extractos enzimáticos de los monocultivos y cocultivos de *B. adusta* y *G. trabeum* fue analizado por cromatografía en columna de intercambio aniónico (DEAE-Sepharose) en un sistema FPLC. La cromatografía de intercambio aniónico (Fig. 11) se llevó a cabo utilizando una columna equilibrada con un tampón



fosfato de sodio 10 mM (pH 6), seleccionado de acuerdo con el rango de punto isoeléctrico (pI) de las peroxidasas (pI 3,3- 3,7). Durante el proceso, se obtuvieron distintos picos de elución, los cuales fueron recolectados y algunos de ellos (primero y último) fueron evaluados para determinación de actividad enzimática. Los cromatogramas de los monocultivos de ambos hongos y del cocultivo, muestran la aparición de un primer pico (N°1) de proteínas que salen de la columna antes de la aplicación del gradiente de NaCl (Fig. 11 A, B, C), y que fue de mayor magnitud en *G. trabeum* (Fig. 11 B). El último pico (N°2), que corresponde a proteínas que se adhirieron firmemente a la columna y solo eluyen cuando se aplica 100% de NaCl, aparece sólo en los extractos de *B. adusta* y en el cocultivo (Fig. 11 A y C), siendo de mayor magnitud en el cocultivo.

Debido a que la actividad hidrolítica de endoglucanasa fue previamente detectada en los extractos de ambos hongos y en el cocultivo (Fig. 6), y las peroxidasas solo se detectaron en *B. adusta* y el cocultivo (Fig. 5), estas fueron las enzimas analizadas en las fracciones eluidas de la columna. De esta forma se determinó que el primer pico (N°1) correspondió a una endoglucanasa, y el ultimo pico (N°2) correspondió a una peroxidasa. Con esto se verificó que las enzimas hidrolíticas fueron las que no se adhirieron a la columna y las peroxidasas se adhirieron firmemente, haciendo efectiva la purificación de ésta.

En el cromatograma de *G. trabeum* (Fig. 11 B) no aparece el pico N°2 de actividad de peroxidasa, lo cual es coherente con los resultados previos (Fig. 5), y no aparecen otros picos adheridos a la columna al aplicar el gradiente de NaCl. Pero este hongo si presenta una alta actividad enzimática de endoglucanasa (pico N°1), que eluyó de la columna antes de aplicar el gradiente de NaCl.



**Figura 11.** Perfil proteico de los extractos enzimáticos purificados por cromatografía de intercambio iónico en un sistema FPLC. (A) *B. adusta*, (B) *G. trabeum* (C) Cocultivo, (1) Pico con actividad de endoglucanasa, (2) Pico con actividad de peroxidasa. Columna de 10 mL de intercambio aniónico DEAE-Sepharose CL6B, eluido con un gradiente de NaCl 500 mM. Caldos fúngicos concentrados 5x.

## 7. Discusión

El presente estudio se enfocó en abordar la interacción en cocultivo entre dos hongos de pudrición de la madera, el hongo de pudrición blanca *Bjerkandera adusta* y el hongo de pudrición parda *Gloeophyllum trabeum*, centrándose en el perfil de producción de enzimas lignocelulolíticas extracelulares de *B. adusta* por efecto del cocultivo. La producción de enzimas hidrolíticas y oxidativas fue analizada en los monocultivos de ambos hongos y en el cocultivo, utilizando condiciones de fermentación líquida. Además de caracterizar los cocteles enzimáticos purificados de *B. adusta* producidos en cocultivo, proporcionando información de las interacciones y la influencia de *G. trabeum* en la actividad enzimática de *B. adusta*. Los hongos pudridores de madera en la naturaleza interactúan entre sí y también con otros microorganismos como bacterias, cuando se produce el ataque a los sustratos lignocelulósicos. En esta acción ellos interactuar, estableciendo relaciones sinérgicas y antagonistas con el entorno, lo cual puede desencadenar cambios en sus patrones de secreción de enzimas (Embacher et al., 2023). Antecedentes en la literatura demuestran los cambios producidos en los cocteles enzimáticos secretados por algunos hongos cuando se encuentran en cocultivo, con especies cercanas o lejanas filogenéticamente (Zoglowek et al., 2016; Pinheiro et al., 2021). En este estudio, las especies escogidas para evaluar el efecto del cocultivo en la producción de enzimas, corresponden a especies cercanas pertenecientes al *Phyllum Basidiomycota*, sólo que una especie es un eficiente productor de enzimas ligninolíticas (*B. adusta*) y el otro de enzimas hidrolíticas (celulasas) (*G. trabeum*).

Como ensayo inicial se realizó una prueba de crecimiento de *B. adusta* y *G. trabeum* en medio sólido (placas Petri), para evaluar el tipo de interacción entre ambos hongos de acuerdo con la clasificación de Molla et al. (2001). En esta evaluación se probaron dos medios de cultivo diferentes: medio estándar EMA rico en carbohidratos, y medio MDT, enriquecido en nutrientes minerales y vitaminas, específico para la producción de enzimas lignocelulolíticas. Esto se realizó con la finalidad de determinar si el tipo de medio de cultivo podía afectar la interacción entre ambos hongos en cocultivo. Este primer ensayo de interacción es fundamental

para determinar que los hongos puedan convivir en el mismo ambiente sin generar una inhibición/bloqueo en el crecimiento del otro. En este ensayo se obtuvo un crecimiento micelial entremezclado de los hongos, donde el micelio del hongo de interés (*B. adusta*) creció por encima o por debajo del micelio del hongo en cocultivo (*G. trabeum*). Según Molla et al. (2001), este es un patrón de entremezcla mutua parcial, por lo que se considera que las cepas son parcialmente compatibles. Además, no se observó una pigmentación en la interfaz de los micelios del cocultivo, y este es un alcance importante, ya que según Boddy & Hiscox (2016), este tipo de cambio morfológico se asocia a un fenómeno competitivo, donde los hongos basidiomicetos se defienden de organismos antagonistas, en respuesta al estrés químico, mediante la liberación de enzimas oxidativas. Por otro lado, el crecimiento de las colonias (cm) de los hongos se redujo levemente en los cocultivos, respecto a los monocultivos, principalmente en el caso de *B. adusta*. No se observaron diferencias en los patrones de crecimiento y/o interacción en los cocultivos, por efecto del tipo de medio (EMA y MDT), pero si se observaron mayores crecimientos de las colonias en medio MDT respecto al medio EMA, tanto en los monocultivos como en los cocultivos.

La cepa 122 del hongo *B. adusta*, la misma utilizada en este estudio, había demostrado previamente capacidad de producir enzimas lignocelulolíticas en ensayos cualitativos (Guillen et al. 2011), sin embargo, no se había realizado una caracterización de sus extractos enzimáticos. Además, anteriormente se probó la combinación cocultivada de *B. adusta* y *Dichomitus squalens*, ambos de pudrición blanca, donde se observó que *B. adusta* crece rápidamente y no se observó pigmentación en la interfaz de los micelios del cocultivo (Qi-He et al., 2011). El interés biotecnológico de las especies de *Bjerkandera* surge de su capacidad para degradar xenobióticos aromáticos, así como lignina y extractos de la madera de eucalipto (Heinfling et al., 1998; Sugawara et al., 2019), y recientemente plásticos (Ruiz 2023).

En la naturaleza, los hongos saprobios pudridores de madera a menudo producen tanto enzimas oxidativas como hidrolíticas simultáneamente, ya que estos dos tipos

de enzimas trabajan en conjunto para degradar la lignocelulosa de manera eficiente (González-González & Miranda 2022). En algunos casos, la producción de una enzima puede ser inducida por la presencia de la otra (Andlar et al., 2018). En este estudio *B. adusta* y *G. trabeum* se evaluaron en cocultivo, en medio MDT líquido suplementado con salvado de trigo. Este suplemento se eligió porque contiene nutrientes como azúcares solubles (arabinosa, glucosa y xilosa), alto contenido de proteínas y almidón que proporciona fuentes de aminoácidos, nitrógeno y carbono en proporción adecuada para sustentar el crecimiento y la producción de enzimas (Babu et al., 2018).

En relación a la producción de enzimas oxidativas (peroxidasa, MnP, peroxidasa versátil y LPMO), todas estas enzimas se detectaron en los cultivos de *B. adusta*, en cambio en los cultivos de *G. trabeum* solo se detectó LPMO, aunque no en una alta cantidad, como era esperado de acuerdo con antecedentes previos. Cabe destacar que, bajo las condiciones de cultivo utilizadas aquí, *B. adusta* no produjo actividad de lacasa, lo que concuerda con los antecedentes de la literatura que señalan que este hongo es un eficiente productor de peroxidasas, pero no de lacasas (Tripathi et al., 2012; Kang et al., 2019; Hirakawa et al., 2023). En cocultivo, se produjo en promedio un aumento de 2-3 veces en las actividades de las enzimas oxidativas, respecto a los monocultivos. Estos resultados sugieren que la presencia de *G. trabeum* en el cocultivo tuvo un efecto estimulante sobre la producción de enzimas oxidativas por *B. adusta*, particularmente de peroxidasas. Sugano et al. (2021), investigaron la producción de manganeso peroxidasa (MnP) del hongo de pudrición blanca, *B. adusta*, y del hongo de pudrición parda, *Gloeophyllum sepiarium*, registrándose actividades bajas en los monocultivos, en *B. adusta*, la mayor actividad de MnP se detectó al día 7 (1,2  $\mu\text{kat/L}$ ). Sin embargo, cuando se cultivó *B. adusta* con *G. sepiarium*, la actividad de MnP aumentó a 2,3  $\mu\text{kat/L}$  el día 10. Un efecto similar ocurrió cuando *B. adusta* se cocultivo con otro basidiomiceto de pudrición blanca, *D. squalens*, donde se observó una estimulación de la expresión de MnP, a diferencia de los monocultivos que no mostraron expresión de MnP (Qi-He et al., 2011). Como se identificó anteriormente, *B. adusta* puede

producir una nueva enzima diferente de MnP y LiP, denominada peroxidasa versátil (VP), que no sólo oxida  $Mn^{2+}$  a  $Mn^{3+}$ , sino que también oxida compuestos no fenólicos de alto potencial redox (como alcohol veratrílico) en ausencia de iones  $Mn^{2+}$ . Por tanto, se supone que *B. adusta* juega un papel clave en la producción de enzimas oxidativas (Tinoco et al., 2007), principalmente del tipo peroxidasa. La mayoría de los procesos ecológicos en la naturaleza son simbióticos o competitivos y, como tales, los consorcios de hongos bajo condiciones controladas que se asemejan a las sinergias metabólicas naturales pueden ser muy útiles en la producción eficiente de una gran variedad de enzimas lignocelulolíticas (Troiano et al., 2020). Estas enzimas oxidativas han despertado mucho interés al ser producidas en cocultivos de hongos, debido a que esta técnica es ventajosa sobre el uso de una sola cepa de hongos durante numerosos procesos biotecnológicos, como la producción de enzimas ligninolíticas, la producción de metabolitos y degradación de la lignina (Wiberth et al., 2019). Además, el cocultivo es una estrategia “ambientalmente amigable”, ya que no requiere el uso de la adición de inductores de naturaleza química, y muchas veces tóxicos, a los medios de cultivo.

En cuanto a la producción de enzimas hidrolíticas (endoglucanasa, xilanas,  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -xilosidasa) se observaron grandes diferencias entre las especies en monocultivo y cocultivo. La mayor actividad de enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas fue detectada en los cultivos de *G. trabeum*, como era esperado, y en los cultivos de *B. adusta* no se detectó xilanas, y las actividades restantes fueron significativamente inferiores a las de *G. trabeum*. A diferencia de las enzimas oxidativas, en este caso el cocultivo no estimuló la producción de enzimas hidrolíticas, sino que por el contrario provocó una fuerte y significativa inhibición. Esto puede deberse a la selectividad de las interacciones entre especies durante el cocultivo. Aunque se ha descrito que un determinado microorganismo puede funcionar activando genes silenciosos en otro en cocultivo, lo que conduce a la inducción en la producción de algunas enzimas (Peng et al., 2021), en otros casos podría suceder el caso contrario. Como evidenciado por Detain et al. (2022), quienes observaron una inhibición de la actividad enzimática de xilanas producida

por *Streptomyces griseorubens* y *Streptomyces coelicolor*, cuando se cultivaron con *Aspergillus niger*. Los autores concluyeron que el mecanismo preciso detrás de esa interacción microbiana no está claro, pero una hipótesis que se plantea es que podría deberse a la presencia de moléculas de señalización o el contacto directo entre los dos socios microbianos en el cocultivo (Detain et al., 2022). Según Vinale et al. (2017) la estrategia de cocultivo no sólo puede estimular la acumulación de diversas moléculas en microorganismos, sino que también puede disminuir significativamente los rendimientos de algunos metabolitos secundarios originales, en comparación con el monocultivo.

Para analizar los perfiles proteicos extracelulares, estimar la masa molecular de las proteínas y verificar la presencia de las enzimas en los cultivos fúngicos, se realizó una electroforesis PAGE nativa de proteínas y zimogramas para peroxidasas y xilanasas. Los perfiles proteicos de los monocultivos presentaron grandes diferencias entre ellos, en cuanto a cantidad de bandas proteicas e intensidad, y también con el cocultivo. Los extractos de *B. adusta* presentaron el mayor número e intensidad de bandas proteicas, seguidos por el cocultivo y *G. trabeum*. Además, en *B. adusta* las bandas proteicas mostraron una amplia variedad de tamaños, distribuyéndose entre 14-66 kDa aproximadamente, con las de mayor intensidad sobre los 20 kDa. Las bandas proteicas de *G. trabeum* presentaron una distribución de masas moleculares estimadas, diferentes a las de *B. adusta*, en un rango > 40-90 kDa. En tanto que las del cocultivo se concentraron entre 35-90 kDa aproximadamente. Estos resultados sugieren que en cocultivo hay bandas proteicas del monocultivo de *B. adusta* que desaparecen (<35 kDa), y otras que aparecen (> 66 kDa), que podrían corresponder a proteínas de *G. trabeum* o a otras estimuladas en *B. adusta* por efecto del cocultivo.

Los zimogramas de los extractos fueron fundamentales para demostrar la presencia de actividad peroxidasa sólo en los cocultivos y el monocultivo de *B. adusta*, y de actividad xilanasas sólo en el monocultivo de *G. trabeum*. El zimograma también reveló la tendencia cocultivo >>> *B. adusta* para la intensidad de la reacción de peroxidasa con ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y que ambas reacciones ocurrieron en el mismo rango

de masa molecular estimada, correspondiente a aprox. 35 kDa. Las peroxidases exhiben un rango de masa molecular entre 35 kDa y 48 kDa (Tuomela & Hatakka, 2019), lo que concuerda con lo obtenido aquí para *B. adusta*. El valor de 35 kDa estimado para la masa molecular de la enzima mediante electroforesis es similar al de otras peroxidases descritas sólo para especies de *Bjerkandera* (Heinfling et al., 1998; Moreira et al., 2006; Wang et al., 2002).

El cocultivo de hongos de pudrición blanca y parda podría aprovechar las capacidades complementarias de estos hongos para la degradación de la lignina y la celulosa. Además, podría generar estrés oxidativo en ambos hongos asociados y acelerar un cambio metabólico, estimulando en consecuencia la producción de enzimas ligninolíticas (Barbelli-Lopez et al., 2024). Esto confirma que el cocultivo de hongos tiene varias ventajas, como producir enzimas oxidativas en un solo lote, lo que ahorra tiempo, energía e insumos en el proceso (Peláez et al., 2021). Sin embargo, el resultado final parece depender de muchos factores como la combinación particular de especies, el modo de interacción entre especies y las condiciones microambientales o nutricionales del sustrato (Chi et al., 2007)

Respecto a la actividad xilanasa, el zimograma mostró que la enzima del monocultivo de *G. trabeum* presenta una masa molecular comprendida entre 35- 45 kDa. El rango de masa molecular de las xilanasas fúngicas descrita en la literatura se encuentra entre 29 y 36 kDa (Sakthiselvan et al., 2015). La ausencia de reacción positiva para xilanasa en el cocultivo, sugiere que la significativa producción de xilanasa por *G. trabeum* se vio suprimida por efecto del cocultivo con *B. adusta*. Según Qi et al. (2023), esto puede deberse a que diferentes hongos podrían descomponer diferentes componentes de la biomasa lignocelulósica por su propia vía a través de mecanismos de acción e infección fúngica, debido a un proceso de interacción extremadamente complejo entre los hongos y los sustratos de madera, en el que los componentes químicos y las estructuras del sustrato, incluidos los productos de descomposición, podrían afectar y regular la expresión y actividades enzimáticas e inducir diversos efectos en la biodegradación.

La purificación de proteínas tiene como objetivo aislar selectivamente una proteína obtenida a partir de una mezcla compleja que comprende muchos componentes



(Janson, 2012). Durante el proceso de purificación de proteínas de los monocultivos y el cocultivo por cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-Sepharose) se observó en todos los cromatogramas la elución de diferentes fracciones. En todos los cromatogramas (de monocultivos y cocultivo) se obtuvo un primer pico (pico 1) de proteínas, que no se adhirió a la columna y que presentó actividad de endoglucanasa, obteniéndose el mayor de estos picos en los extractos de *G. trabeum* (Figura 10B). El último pico eluido de la columna (pico 2), que fue eluido con 100% de NaCl, presentó actividad de peroxidasa, y sólo apareció en los cromatogramas de los extractos de *B. adusta* y en el cocultivo. Cabe destacar que al resto de los picos que también eluyeron de la columna con el gradiente de NaCl, no se les determinó actividad enzimática, pero podrían corresponder a otras peroxidasas presentes en *B. adusta* y en el cocultivo. De acuerdo a los antecedentes recolectados por Barichievich et al. (1990) la enzima endoglucanasa presente en *G. trabeum*, tenía un punto isoeléctrico entre 4 y 6 y una masa molecular de 20 a 60 kDa, respectivamente, además exhibió un pH óptimo de 5,9 y 6,5. De acuerdo con el valor de pI habría cabido esperar entonces que la endoglucanasa se adsorbiera a la columna, pero no fue así. Por lo tanto, podría ser que la proteína o parte de ella haya salido en el lavado de la columna debido a que la capacidad de adsorción de la columna sea baja. O que el pI de las enzimas de esta cepa de *B. adusta* sean distintos de los descritos en la literatura. Independiente de esto, esta purificación preliminar de los extractos de *B. adusta* y el cocultivo, permitió la separación de peroxidasas y endoglucanasas, por lo que representa una estrategia cuyos parámetros podrían ser optimizados para la separación de las enzimas (hidrolíticas y oxidativas) desde los extractos de *B. adusta* en monocultivo y cocultivo, para avanzar con su posterior caracterización bioquímica.

En resumen, el cocultivo de *B. adusta* y *G. trabeum* podría aprovechar las capacidades enzimáticas complementarias de cada especie para la degradación de la lignina y la celulosa, aunque el resultado final siempre dependerá de múltiples factores como el tipo de especies en cocultivo y las condiciones ambientales del cultivo.

## 8. Conclusiones

Este estudio se centró en analizar la interacción en cocultivo entre dos hongos de pudrición de la madera, *Bjerkandera adusta* y *Gloeophyllum trabeum*, y su efecto en el crecimiento y la producción de enzimas lignocelulolíticas extracelulares por las especies en cocultivo, de cuyos resultados se puede concluir lo siguiente:

- Las pruebas iniciales de interacción en medio sólido entre *B. adusta* y *G. trabeum* fueron fundamentales para determinar que las especies en cocultivo tuvieron un crecimiento entremezclado de micelios, sin pigmentación en la interfaz, lo que indicó ausencia de competencia o inhibición, y por lo tanto un patrón de compatibilidad parcial entre las cepas.
- El cocultivo de *B. adusta* y *G. trabeum* en medio líquido MDT estimuló un aumento significativo en la producción de enzimas oxidativas en comparación con el monocultivo de *B. adusta*, sugiriendo un efecto estimulante de *G. trabeum*. Sin embargo, en el caso de las enzimas hidrolíticas, éstas fueron significativamente inhibidas en el cocultivo respecto al monocultivo de *G. trabeum*, sugiriendo un efecto represor de *B. adusta* sobre *G. trabeum*.
- Los perfiles proteicos determinados por electroforesis PAGE-nativa y los zimogramas de los extractos fúngicos, confirmaron la presencia de actividad peroxidasa sólo en *B. adusta* y el cocultivo, y su completa ausencia en *G. trabeum*. Al mismo tiempo, permitieron confirmar la presencia de xilanasas sólo en *G. trabeum*.
- La cromatografía de intercambio aniónico permitió la purificación de proteínas con actividad enzimática, revelando picos de actividad de endoglucanasa para todos los cultivos y de peroxidasas para *B. adusta* y el cocultivo.
- Este estudio no sólo evaluó la compatibilidad de crecimiento entre *B. adusta* y *G. trabeum*, sino que también la capacidad del cocultivo para estimular eficazmente la producción de enzimas oxidativas en *B. adusta*, obteniéndose un extracto enzimático con potencial biotecnológico para el tratamiento de residuos industriales, como colorantes sintéticos.

## 9. Bibliografía

- Agrawal, D., Tsang, A., & Chadha, B. S. (2021). Economizing the lignocellulosic hydrolysis process using heterologously expressed auxiliary enzymes feruloyl esterase D (CE1) and  $\beta$ -xylosidase (GH43) derived from thermophilic fungi *Scytalidium thermophilum*. *Bioresource technology*, 339, 125603. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125603>
- Andlar, M., Rezić, T., Marđetko, N., Kracher, D., Ludwig, R., & Šantek, B. (2018). Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Engineering in life sciences*, 18(11), 768–778. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800039>
- Aytaş, Z.G., Tuncer, M., Kul, Ç.S., Cilmeli, S., Aydın, N., Doruk, T., & Adıgüzel, A.O. (2023). Partial characterization of  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -xylosidase, and  $\alpha$ -l-arabinofuranosidase from *Jiangella alba* DSM 45237 and their potential in lignocellulose-based biorefining. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*.
- Aza, P., & Camarero, S. (2023). Fungal Laccases: Fundamentals, Engineering and Classification Update. *Biomolecules*, 13(12), 1716. <https://doi.org/10.3390/biom13121716>
- Babkina, V. V., Albuquerque, W., Haiduk, Y. M., Michalak, W., Ghezellou, P., Zorn, H., & Zhuk, T. S. (2023). Fungal lyophilisates as catalysts for organic synthesis: Preparative oxidations with the white-rot fungus *Bjerkandera adusta*. *Molecular Catalysis*, 549, 113451.
- Babu, C. R., Ketanapalli, H., Beebi, S. K., & Kolluru, V. C. (2018). Wheat bran composition and nutritional quality: a review. *Adv. Biotechnol. Microbiol*, 9(1), 1-7.
- Bailey, M.J., Biely, P., & Poutanen, K. (1992). Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*, 23, 257-270.
- Barbelli-Lopez, M. S., Peralta, M. P., Levin, L., & Lechner, B. E. (2024). Effect of co-cultivation of white and brown rot species on basidiome production, lignocellulolytic enzyme activity and dye decolourisation. *Bioresource Technology*, 130397.

- Belhamiche, N., Duchiron, F. R. A. N. C. I. S., & Benallaoua, S. A. I. D. (2021). Effect of some agro-industrial residues on mycelial growth and production of lignocellulolytic enzymes by a fungus native to Algerian forest. *Environ Pollut*, 10, 11-20.
- Biely, P., Singh, S., & Puchart, V. (2016). Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: state of the art. *Biotechnology Advances*, 34(7), 1260-1274.
- Bissaro, B., & Eijsink, V. G. H. (2023). Lytic polysaccharide monooxygenases: enzymes for controlled and site-specific Fenton-like chemistry. *Essays in biochemistry*, 67(3), 575–584. <https://doi.org/10.1042/EBC20220250>
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248 – 254
- Breslmayr, E., Hanžek, M., Hanrahan, A. (2018). A fast and sensitive activity assay for lytic polysaccharide monooxygenase. *Biotechnol Biofuels*. 11(79). <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1063-6>
- Briganti, L., Capetti, C., Pellegrini, V. O. A., Ghio, S., Campos, E., Nascimento, A. S., & Polikarpov, I. (2021). Structural and molecular dynamics investigations of ligand stabilization via secondary binding site interactions in *Paenibacillus xylanivorans* GH11 xylanase. *Computational and structural biotechnology journal*, 19, 1557–1566. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.03.002>
- Boddy, L., & Hiscox, J. (2016). Fungal ecology: principles and mechanisms of colonization and competition by saprotrophic fungi. *Microbiology spectrum*, 4(6), 4-6.
- Bourbonnais, R., & Paice, M. G. (1990). Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS letters*, 267(1), 99–102.
- Castaño, J. D., Muñoz-Muñoz, N., Kim, Y. M., Liu, J., Yang, L., & Schilling, J. S. (2022). Metabolomics Highlights Different Life History Strategies of White and Brown Rot Wood-Degrading Fungi. *mSphere*, 7(6), e0054522. <https://doi.org/10.1128/msphere.00545-22>

- Chan, J. Paice, M. Zhang, X. (2019). Enzymatic oxidation of lignin: challenges and barriers toward practical applications. *Chemistry Europe*. <https://doi.org/10.1002/cctc.201901480>
- Chaudière J. (2023). Biological and Catalytic Properties of Selenoproteins. *International Journal of Molecular Sciences*. 24(12):10109. <https://doi.org/10.3390/ijms241210109>
- Chen, A., Wang, D., Ji, R., Li, J., Gu, S., Tang, R., & Ji, C. (2021). Structural and Catalytic Characterization of TsBGL, a  $\beta$ -Glucosidase From *Thermofilum* sp. ex4484\_79. *Frontiers in microbiology*, 12, 723678. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.723678>
- Chi, Y., Hatakka, A., & Maijala, P. (2007). Can co-culturing of two white-rot fungi increase lignin degradation and the production of lignin-degrading enzymes?. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 59(1), 32-39.
- Choinowski, T., Blodig, W., Winterhalter, K. H., & Piontek, K. (1999). The crystal structure of lignin peroxidase at 1.70 Å resolution reveals a hydroxy group on the C $\beta$  of tryptophan 171: a novel radical site formed during the redox cycle. *Journal of molecular biology*, 286(3), 809-827.
- Civzele, A. Stipnice-Jekimova, A.A. Mezule, L. (2023). Fungal Ligninolytic Enzymes and Their Application in Biomass Lignin Pretreatment. *J. Fungi*. 9, 780. <https://doi.org/10.3390/jof9070780>
- Couturier, M., Ladeveze, S., Sulzenbacher, G., Ciano, L., Fanuel, M., Moreau, C., & Berrin, J. G. (2018). Lytic xylan oxidases from wood-decay fungi unlock biomass degradation. *Nature chemical biology*, 14(3), 306-310.
- Curran, L. M. C., Pham, L. T. M., Sale, K. L., & Simmons, B. A. (2022). Review of advances in the development of laccases for the valorization of lignin to enable the production of lignocellulosic biofuels and bioproducts. *Biotechnology advances*, 54, 107809. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107809>
- Dadwal, A., Sharma, S., & Satyanarayana, T. (2020). Progress in Ameliorating Beneficial Characteristics of Microbial Cellulases by Genetic Engineering Approaches for Cellulose Saccharification. *Frontiers in microbiology*, 11, 1387. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01387>

- Datta R. (2024). Enzymatic degradation of cellulose in soil: A review. *Heliyon*, 10(1), e24022. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e24022>
- De Jong, E., Field, J. A., & de Bont, J. A. (1992). Evidence for a new extracellular peroxidase. Manganese-inhibited peroxidase from the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. BOS 55. *FEBS letters*, 299(1), 107–110. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)80111-s](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80111-s)
- Detain, J., Rémond, C., Rodrigues, C. M., Harakat, D., & Besaury, L. (2022). Co-elicitation of lignocellulolytic enzymatic activities and metabolites production in an *Aspergillus-Streptomyces* co-culture during lignocellulose fractionation. *Current research in microbial sciences*, 3, 100108. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100108>
- Durđić, K. Ece, S. Ostafe, R. Vogel, S. Schillberg, S. Fischer, R. Prodanović, R. (2020). Improvement in oxidative stability of versatile peroxidase by flow cytometry-based high-throughput screening system. *Biochemical Engineering Journal*. Vol 157. Pp 10755. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107555>
- Druzhinina, I. S., & Kubicek, C. P. (2017). Genetic engineering of *Trichoderma reesei* cellulases and their production. *Microbial biotechnology*, 10(6), 1485-1499.
- El-Gendi, H., Saleh, A. K., Badierah, R., Redwan, E. M., El-Maradny, Y. A., & El-Fakharany, E. M. (2021). A Comprehensive Insight into Fungal Enzymes: Structure, Classification, and Their Role in Mankind's Challenges. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 8(1), 23. <https://doi.org/10.3390/jof8010023>
- Embacher, J., Zeilinger, S., Kirchmair, M., Rodriguez-r, L. M., & Neuhauser, S. (2023). Wood decay fungi and their bacterial interaction partners in the built environment—A systematic review on fungal bacteria interactions in dead wood and timber. *Fungal Biology Reviews*, 45, 100305.
- Ergun, S. O., & Urek, R. O. (2017). Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using *Pleurotus ostreatus*. *Annals of Agrarian Science*, 15(2), 273-277.
- Ferdeş, M., Dincă, M. N., Moiceanu, G., Zăbavă, B. Ş., & Paraschiv, G. (2020). Microorganisms and enzymes used in the biological pretreatment of the substrate to enhance biogas production: A review. *Sustainability*, 12(17), 7205.

- Frandsen, K. E. H., Haon, M., Grisel, S., Henrissat, B., Lo Leggio, L., & Berrin, J. G. (2021). Identification of the molecular determinants driving the substrate specificity of fungal lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs). *The Journal of biological chemistry*, 296, 100086. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.015545>
- Ganesan, V., Li, Z., Wang, X., & Zhang, H. (2017). Heterologous biosynthesis of natural product naringenin by co-culture engineering. *Synthetic and systems biotechnology*, 2(3), 236–242. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2017.08.003>
- Gao, T., Qin, D., Zuo, S., Peng, Y., Xu, J., Yu, B., & Dong, J. (2020). Decolorization and detoxification of triphenylmethane dyes by isolated endophytic fungus, *Bjerkandera adusta* SWUSI4 under non-nutritive conditions. *Bioresources and Bioprocessing*, 7, 1-12.
- Gonzales-Gonzales M del R, Miranda R (2022) Cellulases, hemicellulases and ligninolytic enzymes: mechanism of action, optimal processing conditions and obtaining value-added compounds in plant matrices. *MOJ Food Process Technol* 10:30–37. <https://doi.org/10.15406/mojfpt.2022.10.00270>
- Goodell, B., Winandy, J. E., & Morrell, J. J. (2020). Fungal degradation of wood: Emerging data, new insights and changing perceptions. *Coatings*, 10(12), 1210.
- Gu, X. Lu, H. Zhang, L. Meng, X. (2021). A Thermophilic GH5 Endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* and Its Synergistic Hydrolysis of Mannan-Containing Polysaccharides. *Catalysts*. 11(7):862. <https://doi.org/10.3390/catal11070862>
- Guillén Y, Götz P, Machuca A (2011) Screening for lignocellulolytic enzymes and metal tolerance in isolated of Wood-rot fungi from Chile. *Interciencia* 36: 860-868.
- Gutiérrez-Antón, M., Santiago-Hernández, A., Rodríguez-Mendoza, J., Cano-Ramírez, C., Bustos-Jaimes, I., Aguilar-Osorio, G., Campos, J. E., & Hidalgo-Lara, M. E. (2023). Improvement of Laccase Production by *Thielavia terrestris* Co3Bag1. Enhancing the Bio-Catalytic Performance of the Native Thermophilic TtLacA via Immobilization in Copper Alginate Gel Beads. *Journal of fungi* (Basel, Switzerland), 9(3), 308. <https://doi.org/10.3390/jof9030308>

- Harris, P. V., Xu, F., Kreel, N. E., Kang, C., & Fukuyama, S. (2014). New enzyme insights drive advances in commercial ethanol production. *Current opinion in chemical biology*, 19, 162-170.
- Hedegård, E. D., & Ryde, U. (2017). Targeting the reactive intermediate in polysaccharide monooxygenases. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 22, 1029-1037. <https://doi.org/10.1007/s00775-017-1480-1>
- Heinfling, A., Martínez, M. J., Martínez, A. T., Bergbauer, M., & Szewzyk, U. (1998). Purification and characterization of peroxidases from the dye-decolorizing fungus *Bjerkandera adusta*. *FEMS Microbiology Letters*, 165(1), 43-50. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13125.x>
- Hirakawa, M. P., Rodriguez, A., Tran-Gyamfi, M. B., Light, Y. K., Martinez, S., Diamond-Pott, H., Simmons, B. A., & Sale, K. L. (2023). Phenothiazines Rapidly Induce Laccase Expression and Lignin-Degrading Properties in the White-Rot Fungus *Phlebia radiata*. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 9(3), 371. <https://doi.org/10.3390/jof9030371>
- Illuri, R., Kumar, M., Eyini, M., Veeramanikandan, V., Almaary, K. S., Elbadawi, Y. B., Biraqdar, M. A., & Balaji, P. (2021). Production, partial purification and characterization of ligninolytic enzymes from selected basidiomycetes mushroom fungi. *Saudi journal of biological sciences*. 28(12), 7207–7218.
- Intasit, R., Cheirsilp, B., Suyotha, W., Boonsawang, P. (2021). Synergistic production of highly active enzymatic cocktails from lignocellulosic palm wastes by sequential solid state-submerged fermentation and co-cultivation of different filamentous fungi. *Biochemical Engineering Journal*. 173, 108086
- Janusz, G., Pawlik, A., Świdarska-Burek, U., Polak, J., Sulej, J., Jarosz-Wilkolazka, A., & Paszczyński, A. (2020). Laccase Properties, Physiological Functions, and Evolution. *International journal of molecular sciences*, 21(3), 966. <https://doi.org/10.3390/ijms21030966>
- Janusz, G., Pawlik, A., Sulej, J., Świdarska-Burek, U., Jarosz-Wilkolazka, A., & Paszczyński, A. (2017). Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. *FEMS microbiology reviews*, 41(6), 941-962.



- Janson, J. C. (Ed.). (2012). Protein purification: principles, high resolution methods, and applications. John Wiley & Sons.
- Jin, X., Song, J., Ma, J., & Liu, G. (2020). Thermostable  $\beta$ -xylosidase from *Aspergillus fumigatus*: Purification, characterization and potential application in lignocellulose bioethanol production. *Renewable Energy*, 155, 1425-1431.
- Jiyun, Q., Xiaoyuan, Z., Yonghui, Z., Chen, Z., Jialong, W., Shuduan, D., Bei, L., Mizi, F., Yan, X. (2023). Selectively enzymatic conversion of wood constituents with white and brown rot fungi. *Industrial Crops and Products*. 199.
- Jutinico-Shubach, L. M., Castaño, J. D., Juarez, T., Mariño, M., Gómez-León, J., & Blandón, L. M. (2022). A novel basydiomycete isolated from mangrove swamps in the Colombian Caribbean shows promise in dye bioremediation. *Bioremediation Journal*, 26(3), 179-197.
- Kang, B. R., Kim, S. B., Song, H. A., & Lee, T. K. (2019). Accelerating the Biodegradation of High-Density Polyethylene (HDPE) Using *Bjerkandera adusta* TBB-03 and Lignocellulose Substrates. *Microorganisms*, 7(9), 304. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090304>
- Kang, B. R., Kim, S. Y., Kang, M., & Lee, T. K. (2021). Removal of pharmaceuticals and personal care products using native fungal enzymes extracted during the ligninolytic process. *Environmental research*, 195, 110878. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.110878>
- Khindaria, A., Grover, T. A., & Aust, S. D. (1994). Oxalate-dependent reductive activity of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 314(2), 301–306. <https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1446>
- Kijpornyongpan, T., Schwartz, A., Yaguchi, A., & Salvachúa, D. (2022). Systems biology-guided understanding of white-rot fungi for biotechnological applications: A review. *iScience*, 25(7), 104640. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104640>
- Kim, H. M., Lee, K. H., Kim, K. H., Lee, D. S., Nguyen, Q. A., & Bae, H. J. (2014). Efficient function and characterization of GH10 xylanase (Xyl10g) from

- Gloeophyllum trabeum in lignocellulose degradation. *Journal of Biotechnology*, 172, 38-45.
- Kim, R. (2023). Advanced Organotypic In Vitro Model Systems for Host–Microbial Coculture. *BioChip J.* <https://doi.org/10.1007/s13206-023-00103-5>
- Kojima, Y., Várnai, A., Ishida, T., Sunagawa, N., Petrovic, D. M., Igarashi, K., Jellison, J., Goodell, B., Alfredsen, G., Westereng, B., Eijsink, V. G., & Yoshida, M. (2016). A Lytic Polysaccharide Monooxygenase with Broad Xyloglucan Specificity from the Brown-Rot Fungus *Gloeophyllum trabeum* and Its Action on Cellulose-Xyloglucan Complexes. *Applied and environmental microbiology*, 82(22), 6557–6572. <https://doi.org/10.1128/AEM.01768-16>
- Kojima, Y., Várnai, A., Eijsink, V. G., & Yoshida, M. (2020). The Role of Lytic Polysaccharide Monooxygenases in Wood Rotting Basidiomycetes. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 32(188), E135-E143.
- Korniłowicz-Kowalska, T., & Rybczyńska-Tkaczyk, K. (2020). Growth conditions, physiological properties, and selection of optimal parameters of biodegradation of anticancer drug daunomycin in industrial effluents by *Bjerkandera adusta* CCBAS930. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 23(2), 287–301. <https://doi.org/10.1007/s10123-019-00102-3>
- Kumar, D., & Murthy, G. S. (2013). Stochastic molecular model of enzymatic hydrolysis of cellulose for ethanol production. *Biotechnology for biofuels*, 6(1), 63. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-63>
- Kumar, A., & Chandra, R. (2022). Extremophilic nature of microbial ligninolytic enzymes and their role in biodegradation. *Microbial Biodegradation and Bioremediation*. (Second Edition). Pp 571-589.
- Kuusk, S., Eijsink, V. G. H., & Väljamäe, P. (2023). The "life-span" of lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) correlates to the number of turnovers in the reductant peroxidase reaction. *The Journal of biological chemistry*, 299(9), 105094. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.105094>
- Lenka, J.L. (2022). Identification and characterisation of lignin degrading bacteria and enzymes from larval guts of the African Palm Weevil (*Rhynchophorus*

- phoenicis). School of Science, Engineering and Environment. University of Salford.
- Li, C., & Arakawa, T. (2019). Agarose native gel electrophoresis of proteins. *International journal of biological macromolecules*, 140, 668-671.
- Li, Y., Song, W., Han, X., Wang, Y., Rao, S., Zhang, Q., Zhou, J., Li, J., Liu, S., & Du, G. (2022). Recent progress in key lignocellulosic enzymes: Enzyme discovery, molecular modifications, production, and enzymatic biomass saccharification. *Bioresource technology*, 363, 127986. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127986>
- Liu, Y., Harnden, K. A., Van Stappen, C., Dikanov, S. A., & Lu, Y. (2023). A designed Copper Histidine-brace enzyme for oxidative depolymerization of polysaccharides as a model of lytic polysaccharide monooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 120(43), e2308286120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2308286120>
- Liu, X., Zain Ul Arifeen, M., Xue, Y., & Liu, C. (2022). Genome-wide characterization of laccase gene family in *Schizophyllum commune* 20R-7-F01, isolated from deep sediment 2 km below the seafloor. *Frontiers in microbiology*, 13, 923451. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.923451>
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic acids research*, 42(D1), D490-D495. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178>
- Maleki, M., Shahraki, M. F., Kavousi, K., Ariaeenejad, S., & Hosseini Salekdeh, G. (2020). A novel thermostable cellulase cocktail enhances lignocellulosic bioconversion and biorefining in a broad range of pH. *International Journal of Biological Macromolecules*, 154, 349–360. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.100>
- Mallerman, J., Papinutti, L., & Levin, L. (2015). Characterization of  $\beta$ -glucosidase produced by the white rot fungus *Flammulina velutipes*. *Journal of microbiology and biotechnology*, 25(1), 57–65. <https://doi.org/10.4014/jmb.1401.01045>
- Mattila, H., Österman-Udd, J., Mali, T., & Lundell, T. (2022). Basidiomycota Fungi and ROS: Genomic Perspective on Key Enzymes Involved in Generation and

- Mitigation of Reactive Oxygen Species. *Frontiers in fungal biology*, 3, 837605. <https://doi.org/10.3389/ffunb.2022.837605>
- Mester, T & Field, J. (1997). Optimization of manganese peroxidase production by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55, *FEMS Microbiology Letters*, 155(2), 161–168. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb13873.x>
- Miller, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31 (3). 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Min, K., Kim, H., Park, H. J., Lee, S., Jung, Y. J., Yoon, J. H., ... & Joo, J. C. (2021). Improving the catalytic performance of xylanase from *Bacillus circulans* through structure-based rational design. *Bioresource Technology*, 340, 125737.
- Molla, A. H., Fakhru'l-Razi, A., Abd-Aziz, S., Hanafi, M. M., & Alam, M. Z. (2001). In-vitro compatibility evaluation of fungal mixed culture for bioconversion of domestic wastewater sludge. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17, 849-856. <https://doi.org/10.1023/A:1013844306960>
- Moreira, P. R., Bouillenne, F., Almeida-Vara, E., Malcata, F. X., Frère, J. M., & Duarte, J. C. (2006). Purification, kinetics and spectral characterisation of a new versatile peroxidase from a *Bjerkandera* sp. isolate. *Enzyme and microbial technology*, 38(1-2), 28-33.
- Nath, P., Dhillon, A., Kumar, K., Sharma, K., Jamaldeen, S. B., Moholkar, V. S., & Goyal, A. (2019). Development of bi-functional chimeric enzyme (CtGH1-L1-CtGH5-F194A) from endoglucanase (CtGH5) mutant F194A and  $\beta$ -1,4-glucosidase (CtGH1) from *Clostridium thermocellum* with enhanced activity and structural integrity. *Bioresource technology*, 282, 494–501. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.051>
- Paës, G., Berrin, J. G., & Beaugrand, J. (2012). GH11 xylanases: structure/function/properties relationships and applications. *Biotechnology advances*, 30(3), 564-592.
- Peláez, R. D. R., Wischral, D., Cunha, J. R. B., Mendes, T. D., Pacheco, T. F., Siqueira, F. G. de, & Almeida, J. R. M. de. (2022). Production of Enzymatic

- Extract with High Cellulolytic and Oxidative Activities by Co-Culture of *Trichoderma reesei* and *Panus lecomtei*. *Fermentation*, 8(10), 522.
- Peláez, R.D., Wischral, D., Mendes, T.D., Pacheco, T.F., Urben, A.F., Helm, C.V., Mendonça, S., Balan, V., & Siqueira, F.G. (2021). Co-culturing of micro- and macro-fungi for producing highly active enzyme cocktail for producing biofuels. *Bioresource Technology Reports*.
- Peng, X. Y., Wu, J. T., Shao, C. L., Li, Z. Y., Chen, M., & Wang, C. Y. (2021). Co-culture: stimulate the metabolic potential and explore the molecular diversity of natural products from microorganisms. *Marine life science & technology*, 3(3), 363–374.
- Pinheiro, V. E., Horvath, I. S., Lundin, M., & Polizeli, M. D. L. T. D. M. (2021). Screening and cocktail optimization using experimental mixture design: enzymatic saccharification as a biological pretreatment strategy. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 15(5), 1447-1460.
- Pinto, P. A., Bezerra, R. M. F., Fraga, I., Amaral, C., Sampaio, A., & Dias, A. A. (2022). Solid-State Fermentation of Chestnut Shells and Effect of Explanatory Variables in Predictive Saccharification Models. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(5), 2572.
- Porter, C.L. (1924). Concerning the characters of certain fungi as exhibited by their growth in the presence of other fungi. *American Journal of Botany* 11, 168–188.
- Prabhu, G., Bhat, D., Bhat, R. M., & Selvaraj, S. (2022). A critical look at bioproducts co-cultured under solid state fermentation and their challenges and industrial applications. *Waste and Biomass Valorization*, 13(7), 3095-3111.
- Qi-He, C., Krügener, S., Hirth, T., Rupp, S., & Zibek, S. (2011). Co-cultured production of lignin-modifying enzymes with white-rot fungi. *Applied biochemistry and biotechnology*, 165(2), 700–718. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9289-9>
- Qi, J., Jia, L., Liang, Y., Luo, B., Zhao, R., Zhang, C., We, J., Zhou, Y., Fan, M., & Xia, Y. (2022). Fungi's selectivity in the biodegradation of *Dendrocalamus*

- sinicus decayed by white and brown rot fungi. *Industrial Crops and Products*, 188, 115726.
- Qi, J., Li, F., Jia, L., Zhang, X., Deng, S., Luo, B., Zhou, Y., et al. (2023). Fungal Selectivity and Biodegradation Effects by White and Brown Rot Fungi for Wood Biomass Pretreatment. *Polymers*, 15(8), 1957.
- Quiroz-Castañeda, R., Balcázar-López, E., Dantán-González, E., Martínez, A., Folch-Mallol, J., & Martínez Anaya, C. (2009). Characterization of cellulolytic activities of *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus* on solid wheat straw medium. *Electronic Journal of Biotechnology*, 12(4), 5-6. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-34582009000400005>
- Rech, K. S., de Oliveira, C. F., Moura, P. F., de Oliveira, C. D. S. P., Hirota, B. C. K., de Oliveira, M., ... & Miguel, M. D. (2021). Optimisation of *Bjerkandera adusta* culture conditions for the production of  $\alpha$ - $\alpha$ -trehalose. *Natural product research*, 35(21), 4206-4209.
- Reyes, C., Poulin, A., Nyström, G., Schwarze, F. W. M. R., & Ribera, J. (2021). Enzyme Activities of Five White-Rot Fungi in the Presence of Nanocellulose. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 7(3), 222.
- Ritschkoff, A. C., Buchert, J., & Viikari, L. (1994). Purification and characterization of a thermophilic xylanase from the brown-rot fungus *Gloeophyllum trabeum*. *Journal of biotechnology*, 32(1), 67-74.
- Rizqi, H. D., Purnomo, A. S., & Ulfi, A. (2023). The effect of bacteria addition on DDT biodegradation by BROWN-ROT fungus *Gloeophyllum trabeum*. *Heliyon*, 9(7), e18216. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e18216>
- Rosero-Chasoy, G., Rodríguez-Jasso, R. M., Aguilar, C. N., Buitrón, G., Chairez, I., & Ruiz, H. A. (2021). Microbial co-culturing strategies for the production high value compounds, a reliable framework towards sustainable biorefinery implementation - an overview. *Bioresource technology*, 321, 124458. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124458>
- Rovaletti, A. De Gioia, L. Fantucci, P. Greco, C. Vertemara, J. Zampella, G. Arrigoni, F. Bertini, L. (2023). Recent Theoretical Insights into the Oxidative Degradation

- of Biopolymers and Plastics by Metalloenzymes. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 6368. <https://doi.org/10.3390/ijms24076368>
- Roy, B. P., & Archibald, F. (1993). Effects of Kraft Pulp and Lignin on *Trametes versicolor* Carbon Metabolism. *Applied and environmental microbiology*, 59(6), 1855–1863. <https://doi.org/10.1128/aem.59.6.1855-1863.1993>
- Ruiz, V. (2023). Capacidad degradativa de plasticos del hongo pudridor de la madera *Bjerkandera adusta*. Universidad de Concepción. Escuela de Ciencias y tecnologías. Departamento de ciencias y tecnología vegetal. Campus Los Angeles.
- Sakthiselvan, P., Naveena, B., & Partha, N. (2015). Molecular characterization of a Xylanase-producing fungus isolated from fouled soil. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 45(4), 1293–1302. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822014000400020>
- Sanhueza, C., Carvajal, G., Soto-Aguilar, J., Lienqueo, M. E., & Salazar, O. (2018). The effect of a lytic polysaccharide monooxygenase and a xylanase from *Gloeophyllum trabeum* on the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic residues using a commercial cellulase. *Enzyme and microbial technology*, 113, 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.11.007>
- Sanitá-Lima, M., & Coutinho de Lucas, R. (2022). Co-cultivation, Co-culture, Mixed Culture, and Microbial Consortium of Fungi: An Understudied Strategy for Biomass Conversion. *Frontiers in microbiology*. 12, 837685.
- Selegato, D. M., & Castro-Gamboa, I. (2023). Enhancing chemical and biological diversity by co-cultivation. *Frontiers in microbiology*, 14, 1117559. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1117559>
- Singh, A. K., Iqbal, H. M. N., Cardullo, N., Muccilli, V., Fernández-Lucas, J., Schmidt, J. E., Jesionowski, T., & Bilal, M. (2023). Structural insights, biocatalytic characteristics, and application prospects of lignin-modifying enzymes for sustainable biotechnology. *International journal of biological macromolecules*, 242(Pt 3), 124968. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124968>
- Stahl, P.D. & Christensen, M. (1992). In vitro mycelial interactions among members of a soil microfungal community. *Soil Biology and Biochemistry* 24, 309–316.

- Sugano, J., Maina, N., Wallenius, J., & Hildén, K. (2021). Enhanced Lignocellulolytic Enzyme Activities on Hardwood and Softwood during Interspecific Interactions of White- and Brown-Rot Fungi. *Journal of Fungi*, 7(4), 265.
- Sugawara, K., Igeta, E., Amano, Y., Hyuga, M., & Sugano, Y. (2019). Degradation of antifungal anthraquinone compounds is a probable physiological role of DyP secreted by *Bjerkandera adusta*. *AMB Express*, 9(1), 56. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0779-4>
- Suryadi, H., Judono, J. J., Putri, M. R., Ecclesia, A. D., Ulhaq, J. M., Agustina, D. N., & Sumiati, T. (2022). Biodelignification of lignocellulose using ligninolytic enzymes from white-rot fungi. *Heliyon*. 8(2), e08865.
- Sutherland, G. R., Zapanta, L. S., Tien, M., & Aust, S. D. (1997). Role of calcium in maintaining the heme environment of manganese peroxidase. *Biochemistry*, 36(12), 3654-3662.
- Tan, L., Mayers, P., Saddler, J. (1987). Purification and characterization of a thermostable xylanase from athermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* *Canadian Journal of Microbiology* 33: 689-692.
- Tinoco, R., Verdin, J., & Vazquez-Duhalt, R. (2007). Role of oxidizing mediators and tryptophan 172 in the decoloration of industrial dyes by the versatile peroxidase from *Bjerkandera adusta*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 46(1-4), 1-7.
- Tripathi, A., Upadhyay, R. C., & Singh, S. (2012). Extracellular Ligninolytic Enzymes in *Bjerkandera adusta* and *Lentinus squarrosulus*. *Indian journal of microbiology*, 52(3), 381–387. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0232-0>
- Troiano, D., Orsat, V., & Dumont, M. J. (2020). Status of filamentous fungi in integrated biorefineries. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 117, 109472.
- Tocco, D. Carucci, C. Monduzzi, M. Salis, A. Sanjust, E. (2021). Recent Developments in the Delignification and Exploitation of Grass Lignocellulosic Biomass. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 2021 9 (6), 2412-2432.
- Tuomela, M., & Hatakka, A. (2019). Fungal enzymes for bioremediation. In *Comprehensive Biotechnology*, Third Edition (pp. 224-239). Elsevier.



- Uchiyama, T., Uchihashi, T., Ishida, T., Nakamura, A., Vermaas, J. V., Crowley, M. F., Samejima, M., Beckham, G. T., & Igarashi, K. (2022). Lytic polysaccharide monooxygenase increases cellobiohydrolases activity by promoting decrystallization of cellulose surface. *Science advances*, 8(51), eade5155. <https://doi.org/10.1126/sciadv.ade5155>
- Veloz Villavicencio, E., Mali, T., Mattila, H. K., & Lundell, T. (2020). Enzyme Activity Profiles Produced on Wood and Straw by Four Fungi of Different Decay Strategies. *Microorganisms*, 8(1), 73.
- Vinale, F., Nicoletti, R., Borrelli, F., Mangoni, A., Parisi, O. A., Marra, R., ... & Woo, S. L. (2017). Co-culture of plant beneficial microbes as source of bioactive metabolites. *Scientific reports*, 7(1), 14330.
- Wang, Y., Vazquez-Duhalt, R., & Pickard, M. A. (2002). Purification, characterization, and chemical modification of manganese peroxidase from *Bjerkandera adusta* UAMH 8258. *Current microbiology*, 45, 77-87.
- Welinder, K. Plant peroxidases: structure-function relationships. In: Penel C, Gaspar T, Greppin H (eds.) *Plant Peroxidases, Topics and Detailed Literature on Molecular, Biochemical and Physiological Aspects*. Geneve: Université de Genève, 1992.
- Wu, M., Beckham, G. T., Larsson, A. M., Ishida, T., Kim, S., Payne, C. M., Himmel, M. E., Crowley, M. F., Horn, S. J., Westereng, B., Igarashi, K., Samejima, M., Ståhlberg, J., Eijsink, V. G., & Sandgren, M. (2013). Crystal structure and computational characterization of the lytic polysaccharide monooxygenase GH61D from the Basidiomycota fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *The Journal of biological chemistry*, 288(18), 12828–12839. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.459396>
- Wiberth, C. C., Casandra, A. Z. C., Zhiliang, F., & Gabriela, H. (2019). Oxidative enzymes activity and hydrogen peroxide production in white-rot fungi and soil-borne micromycetes co-cultures. *Annals of Microbiology*, 69(2), 171-181.
- Wu, D., Wei, Z., Mohamed, T. A., Zheng, G., Qu, F., Wang, F., & Song, C. (2022). Lignocellulose biomass bioconversion during composting: Mechanism of

- action of lignocellulase, pretreatment methods and future perspectives. *Chemosphere*, 286, 131635.
- Wu, X., Zhang, Q., Zhang, L., Liu, S., Chen, G., Zhang, H., & Wang, L. (2020). Insights Into the Role of Exposed Surface Charged Residues in the Alkali-Tolerance of GH11 Xylanase. *Frontiers in microbiology*, 11, 872. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00872>
- Yamamoto, S., Nakanishi, K., & Matsuno, R. (1988). Ion-exchange chromatography of proteins. CRC press.
- Yu, G., Sun, Y., Han, H., Yan, X., Wang, Y., Ge, X., Qiao, B., & Tan, L. (2021). Coculture, An Efficient Biotechnology for Mining the Biosynthesis Potential of Macrofungi via Interspecies Interactions. *Frontiers in microbiology*, 12, 663924. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.663924>
- Zelinka, S. L., Jakes, J. E., Kirker, G. T., Bishell, A. B., Boardman, C. R., Lai, B., ... & Goodell, B. (2021). Oxidation states of iron and manganese in lignocellulose altered by the brown rot fungus *Gloeophyllum trabeum* measured in-situ using X-ray absorption near edge spectroscopy (XANES). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 158, 105162.
- Zerva, A., Pentari, C., Ferousi, C., Nikolaivits, E., Karnaouri, A., & Topakas, E. (2021). Recent advances on key enzymatic activities for the utilisation of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 342, 126058.
- Zhu, Y., Li, W., Meng, D., Li, X., & Goodell, B. (2022). Non-enzymatic modification of the crystalline structure and chemistry of Masson pine in brown-rot decay. *Carbohydrate polymers*, 286, 119242. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119242>
- Zhu, N., Zhu, Y., Li, B., Jin, H., & Dong, Y. (2021). Increased enzyme activities and fungal degraders by *Gloeophyllum trabeum* inoculation improve lignocellulose degradation efficiency during manure-straw composting. *Bioresource technology*, 337, 125427. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125427>
- Zhuo, R., & Fan, F. (2021). A comprehensive insight into the application of white rot fungi and their lignocellulolytic enzymes in the removal of organic pollutants. *The Science of the total environment*. 778, 146132.

Zoglowek, M., Hansen, G. H., Lübeck, P. S., & Lübeck, M. (2016). Fungal consortia for conversion of lignocellulose into bioproducts. *Fungal Biotechnology for Biofuels*. *Mycology: Current and Future Developments*; Silva, RN, Ed, 329-365.