



Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

Posgrado en ciencias biológicas

Degradación de di(2-etilhexil) ftalato por hongos
comestibles desarrollados en fermentación sumergida

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO (A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Gabriela Córdoba Sosa

DIRECTOR DE TESIS

DRA. CARMEN SÁNCHEZ HERNÁNDEZ

ASESORES DE TESIS

DR. SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ

DR. RUBÉN DÍAZ GODÍNEZ



Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta
Posgrado en ciencias biológicas

Degradación de di(2-etilhexil) ftalato por hongos
comestibles desarrollados en fermentación sumergida

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO (A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Gabriela Córdoba Sosa

DIRECTOR DE TESIS
DRA. CARMEN SÁNCHEZ HERNÁNDEZ

ASESORES DE TESIS
DR. SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ
DR. RUBÉN DÍAZ GODÍNEZ

Esta investigación se llevó a cabo como parte del programa de la Maestría en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, que está registrada en el Padrón Nacional de Posgrado (PNPc), con apoyo de la beca de posgrado número 554323, otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

El proyecto se efectuó en el laboratorio de Morfogénesis de hongos y Enzimología del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas (C.I.C.B.) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala en colaboración con el laboratorio de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Tlaxcala.



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta



COORDINACIÓN MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que Gabriela Córdoba Sosa realiza para la obtención del grado de Maestra en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es: **“Degradación de di(2-etilhexil) ftalato por hongos comestibles desarrollados en fermentación sumergida”**.

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., JULIO 16 DE 2015



DRA. MARÍA DEL CARMEN SÁNCHEZ HERNÁNDEZ



DR. RUBÉN DÍAZ GODÍNEZ



DR. SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ



DR. EDUARDO CASTAÑO TOSTADO



DR. DANIEL MÉNDEZ ITURBIDE



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado Bajo la Norma:
ISO 9001:2000-NMX-CC-9001-IMNC-2000



Km. 1.5 Carretera Tlaxcala-Puebla CP 90070 Tel/Fax: 01(246)462-15-57 e-mail: posgradoctbcuat@gmail.com
Tlaxcala, Tlax.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al posgrado “Maestría en Ciencias Biológicas” del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta (C.T.B.C.) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala por creer en mis capacidades y aceptarme como parte de su familia y brindarme todo el apoyo requerido en la realización de esta investigación, en especial a su planta docente y administrativa, ya que sin ellos no habría podido alcanzar esta meta.

Le agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo brindado a través de la beca 554323 durante el período de agosto 2013 a agosto 2015.

Le agradezco a los laboratorios de Morfogénesis de Hongos y Enzimología del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas (C.I.C.B.) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala y al laboratorio de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Tlaxcala por abrirme sus puertas y brindarme apoyo con el equipo e instalaciones necesarias para la realización de este proyecto, ya que sin el apoyo de dichas instituciones no habría podido llevarlo a cabo.

También agradezco de corazón a la directora de este proyecto, la Dra. Carmen Sánchez Hernández por haberme recibido en su grupo de investigación, por sus consejos, sabiduría y paciencia brindados a lo largo de esta investigación. A los doctores Sergio de Jesús Romero Gómez, Rubén Díaz Godínez, Eduardo Castaño Tostado y Daniel Méndez Iturbide por aceptar formar parte de mi Comité Tutoral, dedicando tiempo y esfuerzo para la realización de esta tesis y futura publicación de esta investigación. También quiero aprovechar para agradecerles por sus enseñanzas y consejos brindados en cada evaluación y duda presentada, ya que sin ustedes no habría logrado concluir exitosamente este proyecto.

Finalmente, agradezco a los doctores Saúl Tlecuil Beristain y Jorge García Dávila, de la Universidad Politécnica de Tlaxcala, por el apoyo brindado para el uso del GC/MS y por sus consejos y enseñanzas brindados al colaborar con este proyecto.

A todos ustedes mi mayor reconocimiento y gratitud.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Le agradezco a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de este proyecto, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad, por darme la sabiduría y paciencia necesarias para culminar con esta tesis, por darme la bendición de poner en mi camino a las personas correctas para alcanzar esta meta y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

Les doy las gracias a mis padres Jacobo A. Córdoba Ramos y Teodora Sosa Rodríguez por apoyarme en todo momento, por los valores que me han inculcado, los aprendizajes que me han brindado y por el inigualable ejemplo de ser humano que siempre me han dado y por la fortaleza que me dan para superarme día a día en lo académico y lo personal.

A mi hermana Fidelia Córdoba Sosa, que siempre ha confiado en mí dándome su amor y apoyo incondicional, quien con sus palabras de aliento y ánimos me motivó para no rendirme y alcanzar cada una de mis metas, por nunca dejar de recordarme que al caer recorriendo el camino debemos levantarnos y estar listos para continuar con menos tropiezos.

A Gilberto Pérez Olvera, por ser una parte muy importante de mi vida, por brindarme su sincero e incondicional apoyo en las buenas y malas, por sus palabras de aliento, ánimo y cariño que se convirtieron en uno de mis pilares más fuertes para seguir avanzando en este camino, pero sobre todo por su paciencia y amor incondicional. T. A. CIELO.

A Rosabel Juárez Barradas por brindarme su amistad y cariño incondicionales, por ser una hermana de corazón y tinta, por recorrer el mismo camino a mi lado, por sus singulares palabras de aliento, regaños y conversaciones concretas que más de una vez le dieron luz y guía a mi vida, pero sobre todo por nunca dejarme sola y mostrarme su apoyo en cada uno de mis pasos.

A José Luis Torres García (Wicho) por ser un amigo, maestro y hermano incondicional, por enseñarme a perseguir mis sueños pase lo que pase y nunca dejarme vencer aun cuando todo parezca ir mal, por las aventuras, viajes y vivencias regalados, por estar a mi lado desde hace

más de 5 años como un mentor y un gran ser humano. Pero sobre todo por su cariño y amistad incomparables.

A la Mtra. Miriam por enseñarme lo valioso e interesante que es el trabajo de la investigación, por motivarme para seguir creciendo en esta área y convertirme en una amante de la ciencia día a día.

A mis compañeros y amigos de maestría Pablo (triki), Maribel, Marlen y Kenia, que supieron apoyarme, tenerme paciencia y ayudarme a salir adelante en mis momentos de inquietud, desánimo y alegría.

A mis compañeros de laboratorio Angel, Vicky, Fer, Binicio y Roberto, por brindarme su apoyo en los experimentos realizados y hacer del ambiente de trabajo un segundo hogar, gracias por sus chistes, bromas y anécdotas que lograron poner una sonrisa inigualable en mi rostro y mis memorias.

ÍNDICE

| | Página |
|--|--------|
| RESUMEN..... | 1 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 1.1. Di(2-etilhexil) ftalato (DEHF)..... | 3 |
| 1.1.1. Características físico-químicas..... | 3 |
| 1.1.2. Usos | 5 |
| 1.1.3. Producción..... | 5 |
| 1.1.4. Daños a la salud..... | 6 |
| 1.2. Biodegradación de ftalatos | 8 |
| 1.3. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) | 12 |
| 1.4. Crecimiento microbiano | 15 |
| 1.5. Sistema de fermentación sumergida (FSm)..... | 18 |
| 1.6. Hongos basidiomicetos | 18 |
| 1.6.1. Fase vegetativa | 19 |
| 1.6.2. Fase reproductiva | 20 |
| 1.6.3. Ciclo de vida..... | 22 |
| 1.6.4. Fisiología y metabolismo | 23 |
| 1.6.5. Sistema enzimático..... | 25 |
| 1.6.6. <i>Lentinula edodes</i> | 36 |
| 1.6.7. <i>Pleurotus ostreatus</i> | 37 |
| 1.6.8. <i>Pleurotus pulmonarius</i> | 39 |
| 2. ANTECEDENTES..... | 40 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 45 |
| 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 46 |
| 4.1. Preguntas de investigación | 46 |
| 4.2. Hipótesis | 46 |
| 4.3. Objetivo general..... | 46 |
| 4.4. Objetivos específicos | 47 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS | 48 |
| 5.1. Microorganismos de estudio..... | 48 |

| | | |
|--------|--|----|
| 5.2. | Preparación de inoculo y condiciones de cultivo para la fermentación..... | 48 |
| 5.3. | Preparación de medios de cultivo para la fermentación | 48 |
| 5.4. | Obtención del sobrenadante extracelular | 49 |
| 5.5. | Determinación de los parámetros cinéticos de crecimiento biomasa máxima (X_{max}) y velocidad específica de crecimiento (μ) | 49 |
| 5.6. | Cuantificación de la degradación de DEHF | 50 |
| 5.7. | Determinación de los perfiles de pH | 50 |
| 5.8. | Determinación de la actividad enzimática extracelular | 50 |
| 5.8.1. | Lacasas | 50 |
| 5.8.2. | Esterasas | 51 |
| 5.9. | Determinación de los rendimientos enzimáticos E_{max} , $Y_{E/X}$, q_p y P | 51 |
| 5.10. | Cuantificación de glucosa | 51 |
| 5.11. | Análisis estadístico..... | 52 |
| 6. | RESULTADOS..... | 53 |
| 6.1. | Determinación de la biomasa máxima (X_{max}) | 53 |
| 6.1.1. | <i>Lentinula edodes</i> | 53 |
| 6.1.2. | <i>Pleurotus ostreatus</i> ATCC32783 | 54 |
| 6.1.3. | <i>Pleurotus pulmonarius</i> | 56 |
| 6.2. | Determinación de la velocidad específica de crecimiento (μ) en <i>Lentinula edodes</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> ATCC32783 y <i>Pleurotus pulmonarius</i> | 58 |
| 6.3. | Degradación de 2000 y 1500 mg de DEHF/L | 60 |
| 6.3.1. | <i>Lentinula edodes</i> | 60 |
| 6.3.2. | <i>Pleurotus ostreatus</i> ATCC32783 | 71 |
| 6.3.3. | <i>Pleurotus pulmonarius</i> | 81 |
| 6.4. | Perfil de pH..... | 89 |
| 6.4.1. | <i>Lentinula edodes</i> | 89 |
| 6.4.2. | <i>Pleurotus ostreatus</i> ATCC32783 | 90 |
| 6.4.3. | <i>Pleurotus pulmonarius</i> | 91 |
| 6.5. | Actividad enzimática extracelular de lacasas | 92 |
| 6.5.1. | <i>Lentinula edodes</i> | 92 |
| 6.5.2. | <i>Pleurotus ostreatus</i> ATCC32783 | 94 |
| 6.5.3. | <i>Pleurotus pulmonarius</i> | 96 |
| 6.5.4. | Determinación de los rendimientos enzimáticos de lacasas E_{max} , $Y_{E/X}$, q_p y P | 98 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 6.6. | Actividad enzimática extracelular de esterasas | 101 |
| 6.6.1. | <i>Lentinula edodes</i> | 101 |
| 6.6.2. | <i>Pleurotus ostreatus</i> ATCC32783 | 103 |
| 6.6.3. | <i>Pleurotus pulmonarius</i> | 105 |
| 6.6.4. | Determinación de los rendimientos enzimáticos de esterasas E_{max} , $Y_{E/X}$, q_p y P | 107 |
| 6.7. | Cuantificación de glucosa..... | 111 |
| 6.7.1. | <i>Lentinula edodes</i> | 111 |
| 6.7.2. | <i>Pleurotus ostreatus</i> ATCC32783 | 113 |
| 6.7.3. | <i>Pleurotus pulmonarius</i> | 115 |
| 7. | DISCUSIÓN | 118 |
| 8. | CONCLUSIONES | 135 |
| 9. | RECOMENDACIONES | 140 |
| 10. | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 141 |
| 11. | PUBLICACIONES | 159 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Página |
|---|--------|
| Figura 1. Estructura química general representando ésteres de ácido ftálico (Sailas <i>et al.</i> 2015)..... | 3 |
| Figura 2. Estructura química del DEHF (IHCP, 2008)..... | 4 |
| Figura 3. Representación esquemática del área que ocupa el DEHF en los espacios intersticiales del PVC (Benjamin <i>et al.</i> 2015)..... | 5 |
| Figura 4. Ruta general de degradación bacteriana de ftalatos, se muestra la ruta tanto aerobia como anaerobia, estructura química de los compuestos y enzimas involucradas (Benjamin <i>et al.</i> 2015)..... | 10 |
| Figura 5. Esquema del funcionamiento de la técnica de cromatografía de gases (Universidad de Maine, 2014)..... | 13 |
| Figura 6. Esquema del funcionamiento de la técnica de cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (GC/MS) (Universidad de Maine, 2014)..... | 14 |
| Figura 7. Vista esquemática de una curva sigmoide (logística) de crecimiento simétrico (Peleg 2006)..... | 16 |
| Figura 8. Esquema de un hongo comestible basidiomiceto (seta) y las estructuras principales que lo conforman (Kalač y Svoboda, 2000)..... | 19 |
| Figura 9. Imagen de microscopía electrónica de transmisión de hifas de <i>A. bisporus</i> , separadas por un septo doliporo en el centro, la línea punteada representa el plasmalema. <i>L</i> es una vacuola llena de grasa. La barra de escala es de 2µm (Halit 2000)..... | 19 |
| Figura 10. Proceso de fibulación. A) Etapas de la fibulación: formación de la fíbula, división mitótica de núcleos, separación de núcleos hijos, migración de núcleos hijos a la célula terminal, y formación de septo en la base de la fíbula. B) Microfotografía que muestra la formación de una fíbula (Bold <i>et al.</i> 1987; Flegler, 2011)..... | 21 |
| Figura 11. Ciclo de vida de los basidiomicetos (Modificado de Deacon, 2006)..... | 23 |
| Figura 12. Hifa fúngica como túnel de transporte. En el ápice los componentes de la pared son llevados a la pared apical flexible y se entrecruzan gradualmente (aumento en la intensidad del color amarillo) para conformar la pared madura y rígida. Las proteínas son llevadas en vesículas (rojo) que se acumulan en la pared apical y se transportan a través del flujo de componentes de la pared flexible (flechas azules). Pequeños metabolitos generados durante la degradación se absorben por la hifa en la membrana plasmática (flechas rojas) y se utilizan para generar energía y biomasa (Wessels, 2005)..... | 24 |

| | |
|---|----|
| Figura 13. Estructura tridimensional de una lacasa de <i>Trametes versicolor</i> , conformada por el clúster catalítico con cuatro átomos de cobre (en color naranja) y cuatro dominios: L1 (violeta), L3 (azul), M2 (verde) y M4 (amarillo) con estructuras β -plegadas (Sirim <i>et al.</i> 2011)..... | 27 |
| Figura 14. Clúster catalítico de lacasa de <i>Trametes versicolor</i> conformado por cuatro átomos de carbono. El centro de cobre tipo 1 (T1) confiere el típico color azul de la proteína y es el sitio donde tiene lugar la oxidación del sustrato. El centro de cobre tipo 2 (T2) y tipo 3 (T3) forman un clúster de cobre trinuclear donde se lleva a cabo la reducción de oxígeno molecular y la liberación de agua (Piontek <i>et al.</i> 2002)..... | 28 |
| Figura 15. Representación esquemática del plegamiento α/β hidrolasa. Las hebras β (1–8) se muestran como flechas azules y las hélices α (A–F) como cilindros rojos. Las posiciones relativas de los aminoácidos de la triada catalítica se indican con tres círculos anaranjados (Bornscheuer, 2002)..... | 31 |
| Figura 16. Diagrama representativo del mecanismo de acción de la catálisis de las esterasas. (Kulkarni <i>et al.</i> 2013)..... | 34 |
| Figura 17. A) Cuerpo fructífero y B) desarrollo micelial sobre agar dextrosa papa (PDA) de <i>Lentinula edodes</i> (Midori, 2005; Cudris, 2011). | 36 |
| Figura 18. Cuerpo fructífero de <i>Pleurotus ostreatus</i> (Cisterna 2003)..... | 37 |
| Figura 19. Micelio de <i>Pleurotus ostreatus</i> (Moreno y Ospina 2008)..... | 37 |
| Figura 20. Cuerpo fructífero de <i>Pleurotus pulmonarius</i> (Kuo, 2009). | 39 |
| Figura 21. Cepas de <i>Lentinula edodes</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> ATCC32783 y <i>Pleurotus pulmonarius</i> (de izquierda a derecha) crecidas en EMA..... | 48 |
| Figura 22. Biomasa de <i>Lentinula edodes</i> en medio SAF, 1500 y 200 mg de DEHF/L. a) Matraces (de izquierda a derecha) con medio testido, 1500 y 2000 mg de DEHF/L con pellets de biomasa después de 18 días de crecimiento. b) y c) matraces con biomasa al día 36 en 1500 y 2000 mg de DEHF/L respectivamente..... | 53 |
| Figura 23. Crecimiento de <i>Lentinula edodes</i> en medio SAF (\diamond), 1500 (\triangle) y 2000 (\circ) mg de DEHF/L en fermentación sumergida. Las figuras esquematizadas representan los valores reales obtenidos y las líneas continuas el ajuste obtenido mediante la aplicación del modelo logístico para cada tratamiento..... | 54 |
| Figura 24. Biomasa de <i>Pleurotus ostreatus</i> ATCC32783 en medio a) SAF, b) 1500 y c) 2000 mg de DEHF/L. al día 19 de crecimiento. Incremento en la producción de biomasa de este hongo en un medio con 1500 mg de DEHF/L durante los días 3, 13 y 23 (incisos d, e y f respectivamente) de fermentación..... | 55 |
| Figura 25. Crecimiento de <i>Pleurotus ostreatus</i> ATCC32783 en medio SAF (\diamond), 1500 (\triangle) y 2000 (\circ) mg de DEHF/ L en fermentación sumergida. Las figuras | |

| | |
|--|----|
| esquemáticas representan los valores reales obtenidos y las líneas continuas el ajuste obtenido mediante la aplicación del modelo logístico para cada tratamiento..... | 56 |
| Figura 26. Biomasa de <i>Pleurotus pulmonarius</i> en medio a) SAF, b) 1500 y c) 2000 mg de DEHF/L. al día 17 de crecimiento. Incremento en la producción de biomasa de este hongo durante los días 4 y 22 de fermentación en un medio con 2000 mg de DEHF/L (d, e) y SAF (f, g)..... | 57 |
| Figura 27. Crecimiento de <i>Pleurotus pulmonarius</i> en medio SAF (◇), 1500 (△) y 2000 (○) mg de DEHF/L en fermentación sumergida. Las figuras esquematizadas representan los valores reales obtenidos y las líneas continuas el ajuste obtenido mediante la aplicación del modelo logístico para cada tratamiento..... | 58 |
| Figura 28. A) Porcentaje de degradación de 1500 (△) y B) 2000 (○) mg de DEHF/L por <i>Lentinula edodes</i> en fermentación sumergida..... | 61 |
| Figura 29. Cromatograma de compuestos presentes en el medio con 2000 mg de DEHF/L al día 3 de crecimiento de <i>Lentinula edodes</i> . En el eje y se reporta la abundancia de los compuestos y el eje x corresponde al RT de cada compuesto..... | 64 |
| Figura 30. Cromatograma de compuestos presentes en el medio con 2000 mg de DEHF/L al día 14 de crecimiento de <i>Lentinula edodes</i> . En el eje y se reporta la abundancia de los compuestos y el eje x corresponde al RT de cada compuesto..... | 65 |
| Figura 31. Cromatograma de compuestos presentes en el medio con 2000 mg de DEHF/L al día 32 de crecimiento de <i>Lentinula edodes</i> . En el eje y se reporta la abundancia de los compuestos y el eje x corresponde al RT de cada compuesto..... | 66 |
| Figura 32. Propuesta de ruta de degradación de di(2-etilhexil ftalato (DEHF) por el hongo comestible <i>Lentinula edodes</i> , pasando por la formación de dodecil octil ftalato, diheptil ftalato, ditridecil ftalato, monobutil ftalato y mono(2-etilhexil) ftalato (MEHF) como último metabolito formado..... | 67 |
| Figura 33. Espectro de masas del DEHF y sus respectivos iones. La relación m/z se representa en el eje x y el porcentaje de la abundancia relativa en el eje y..... | 68 |
| Figura 34. Espectro de masas del dodeciloctil ftalato y sus respectivos iones. La relación m/z se representa en el eje x y el porcentaje de la abundancia relativa en el eje y..... | 68 |
| Figura 35. Espectro de masas del diheptil ftalato y sus respectivos iones. La relación m/z se representa en el eje x y el porcentaje de la abundancia relativa en el eje y..... | 69 |
| Figura 36. Espectro de masas del ditridecil ftalato y sus respectivos iones. La relación m/z se representa en el eje x y el porcentaje de la abundancia relativa en el eje y..... | 69 |
| Figura 37. Espectro de masas del MEHF y sus respectivos iones. La relación m/z se representa en el eje x y el porcentaje de la abundancia relativa en el eje y..... | 70 |

| | |
|--|----|
| Figura 38. Espectro de masas del monobutil ftalato y sus respectivos iones. La relación m/z se representa en el eje x y el porcentaje de la abundancia relativa en el eje y..... | 70 |
| Figura 39. A) Porcentaje de degradación de 1500 (Δ) y B) 2000 (\circ) mg de DEHF/L por <i>Pleurotus ostreatus</i> ATCC32783 en fermentación sumergida..... | 72 |
| Figura 40. Cromatograma de compuestos presentes en el medio con 1500 mg de DEHF/L al día 4 de crecimiento de <i>Pleurotus ostreatus</i> ATCC32783. En el eje y se reporta la abundancia de los compuestos y el eje x corresponde al RT de cada compuesto..... | 75 |
| Figura 41. Cromatograma de compuestos presentes en el medio con 2000 mg de DEHF/L al día 4 de crecimiento de <i>Pleurotus ostreatus</i> ATCC32783. En el eje y se reporta la abundancia de los compuestos y el eje x corresponde al RT de cada compuesto..... | 76 |
| Figura 42. Cromatograma de compuestos presentes en el medio con 1500 mg de DEHF/L al día 22 de crecimiento de <i>Pleurotus ostreatus</i> ATCC32783. En el eje y se reporta la abundancia de los compuestos y el eje x corresponde al RT de cada compuesto..... | 77 |
| Figura 43. Cromatograma de compuestos presentes en el medio con 2000 mg de DEHF/L al día 23 de crecimiento de <i>Pleurotus ostreatus</i> ATCC32783. En el eje y se reporta la abundancia de los compuestos y el eje x corresponde al RT de cada compuesto..... | 77 |
| Figura 44. Propuesta de ruta de degradación de di(2-etilhexil ftalato (DEHF) por el hongo comestible <i>Pleurotus ostreatus</i> ATCC32783, pasando por la formación de ciclohexil 2-pentil ftalato, diisooctil ftalato, di(2-metilbutil) ftalato y mono(2-etilhexil) ftalato (MEHF) como último metabolito formado..... | 78 |
| Figura 45. Espectro de masas del ciclohexil 2-pentil ftalato y sus respectivos iones. La relación m/z se representa en el eje x y el porcentaje de la abundancia relativa en el eje y..... | 79 |
| Figura 46. Espectro de masas del diisooctil ftalato y sus respectivos iones. La relación m/z se representa en el eje x y el porcentaje de la abundancia relativa en el eje y..... | 79 |
| Figura 47. Espectro de masas del d(2-metilbutil) ftalato y sus respectivos iones. La relación m/z se representa en el eje x y el porcentaje de la abundancia relativa en el eje y..... | 80 |
| Figura 48. A) Porcentaje de degradación de 1500 (Δ) y B) 2000 (\circ) mg de DEHF/L por <i>Lentinula edodes</i> en fermentación sumergida..... | 82 |
| Figura 49. Cromatograma de compuestos presentes en el medio con 1500 mg de DEHF/L al día 3 de crecimiento de <i>Pleurotus pumilmonarius</i> . En el eje y se reporta la abundancia de los compuestos y el eje x corresponde al RT de cada compuesto..... | 84 |

| | |
|--|-----|
| Figura 50. Cromatograma de compuestos presentes en el medio con 2000 mg de DEHF/L al día 3 de crecimiento de <i>Pleurotus pumlmmonarius</i> . En el eje y se reporta la abundancia de los compuestos y el eje x corresponde al RT de cada compuesto..... | 85 |
| Figura 51. Cromatograma de compuestos presentes en el medio con 1500 mg de DEHF/L al día 22 de crecimiento de <i>Pleurotus pumlmmonarius</i> . En el eje y se reporta la abundancia de los compuestos y el eje x corresponde al RT de cada compuesto..... | 85 |
| Figura 52. Cromatograma de compuestos presentes en el medio con 2000 mg de DEHF/L al día 22 de crecimiento de <i>Pleurotus pumlmmonarius</i> . En el eje y se reporta la abundancia de los compuestos y el eje x corresponde al RT de cada compuesto..... | 86 |
| Figura 53. Propuesta de ruta de degradación de di(2-etilhexil ftalato (DEHF) por el hongo comestible <i>Pleurotus pulmonarius</i> , pasando por la formación de 2-Etilhexil hexil ftalato, ciclohexil 2-pentil ftalato, di(2-metilbutil) ftalato y mono(2-etilhexil) ftalato (MEHF) como último metabolito formado..... | 87 |
| Figura 54. Espectro de masas del 2-etilhexil hexil ftalato y sus respectivos iones. La relación m/z se representa en el eje x y el porcentaje de la abundancia relativa en el eje y..... | 88 |
| Figura 55. Perfil de pH durante el crecimiento de <i>Lentinula edodes</i> en medio sin adición de ftalato (MSAF) (◇), 1500 (△) y 2000 (○) mg de DEHF/L en fermentación sumergida. | 89 |
| Figura 56. Perfil de pH durante el crecimiento de <i>Pleurotus ostreatus</i> ATCC32783 en medio sin adición de ftalato (MSAF) (◇), 1500 (△) y 2000 (○) mg de DEHF/L en fermentación sumergida..... | 91 |
| Figura 57. Perfil de pH durante el crecimiento de <i>Pleurotus pulmonarius</i> en medio sin adición de ftalato (MSAF) (◇), 1500 (△) y 2000 (○) mg de DEHF/L en fermentación sumergida..... | 92 |
| Figura 58. Actividad de lacasas de <i>Lentinula edodes</i> en medio SAF (◇), 1500 (△) y 2000 (○) mg de DEHF/L en fermentación sumergida..... | 94 |
| Figura 59. Actividad de lacasas de <i>Pleurotus ostreatus</i> ATCC32783 en medio SAF (◇), 1500 (△) y 2000 (○) mg de DEHF/L en fermentación sumergida..... | 96 |
| Figura 60. Actividad de lacasas de <i>Pleurotus pulmonarius</i> en medio SAF (◇), 1500 (△) y 2000 (○) mg de DEHF/L en fermentación sumergida..... | 98 |
| Figura 61. Actividad de esterasas de <i>Lentinula edodes</i> en medio SAF (◇), 1500 (△) y 2000 (○) mg de DEHF/L en fermentación sumergida..... | 103 |
| Figura 62. Actividad de esterasas de <i>Pleurotus ostreatus</i> ATCC32783 en medio SAF (◇), 1500 (△) y 2000 (○) mg de DEHF/L en fermentación sumergida..... | 105 |

| | |
|--|-----|
| Figura 63. Actividad de esterasas de <i>Pleurotus pulmonarius</i> en medio SAF (◇), 1500 (△) y 2000 (○) mg de DEHF/L en fermentación sumergida..... | 107 |
| Figura 64. Curva patrón de glucosa por el método de azúcares reductores con DNS..... | 111 |
| Figura 65. Perfil de concentración de glucosa de <i>Lentinula edodes</i> en medio SAF (◇), 1500 (△) y 2000 (○) mg de DEHF/L en fermentación sumergida..... | 113 |
| Figura 66. Perfil de concentración de glucosa de <i>Pleurotus ostreatus</i> ATCC32783 en medio SAF (◇), 1500 (△) y 2000 (○) mg de DEHF/L en fermentación sumergida..... | 115 |
| Figura 67. Perfil de concentración de glucosa de <i>Pleurotus pulmonarius</i> en medio SAF (◇), 1500 (△) y 2000 (○) mg de DEHF/L en fermentación sumergida..... | 117 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Página |
|--|--------|
| Tabla 1. Propiedades físico-químicas del DEHF (NTP 2006)..... | 4 |
| Tabla 2. Principales estudios que describen la degradación de ftalatos por diferentes grupos de hongos (Benjamin <i>et al.</i> 2015)..... | 8 |
| Tabla 3. Microorganismos específicos con sus respectivas enzimas que actúan sobre algunos ftalatos (Benjamin <i>et al.</i> 2015)..... | 11 |
| Tabla 4. Iones para la selección del monitoreo del ion del DEHF por GC/MS (Sopheak <i>et al.</i> 2015)..... | 14 |
| Tabla 5. Velocidad específica de crecimiento (μ) y biomasa máxima producida (X_{max}) por <i>Lentinula edodes</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> ATCC32783 y <i>Pleurotus pulmonarius</i> en medio SAF, 1500 y 2000 mg de DEHF/L después de 37, 23 y 24 días de incubación respectivamente en fermentación sumergida..... | 59 |
| Tabla 6. Rendimientos enzimáticos de lacasas de <i>Lentinula edodes</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> ATCC32783 y <i>Pleurotus pulmonarius</i> , crecidos en medio SAF y dos concentraciones diferentes de DEHF en fermentación sumergida | 101 |
| Tabla 7. Rendimientos enzimáticos de esterasas de <i>Lentinula edodes</i> , <i>Pleurotus. ostreatus</i> ATCC32783 y <i>Pleurotus pulmonarius</i> , crecidos en medio SAF y dos concentraciones diferentes de DEHF en fermentación sumergida..... | 110 |

ABREVIATURAS

| | |
|-----------|--|
| ABTS | 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) |
| AF | Ácido ftálico; ácido 1,2-bencendicarboxílico |
| BBF | Butil bencil ftalato |
| DAFs | Dialquil ftalatos |
| DBF | Dibutil ftalato |
| DDT | 1,1,1-tricloro-2,2-bis (4-clorofenil) etano |
| DEF | Dietil ftalato |
| DEHF | Di(2-etilhexil) ftalato |
| DIDF | Diisodecil ftalato |
| DINF | Diisononil ftalato |
| DMF | Dimetil ftalato |
| DMP | 2,6-dimetoxifenol |
| DMTF | Dimetil tereftalato |
| DNS | Ácido 3,5.dinitrosalicílico |
| DPF | Dipentil ftalato |
| EMA | Agar extracto de malta |
| E_{max} | Actividad máxima de una enzima |
| FSm | Fermentación sumergida |
| GC/MS | Cromatografía de gases/Espectrometría de masas |
| IBF | Isobenzofuranoide |
| Ig | Inmunoglobulina |
| kDa | Kilodaltones |
| kpb | Kilopares de bases |
| LnP | Ligninperoidasas |

| | |
|---------------|---|
| μ | Velocidad específica de crecimiento |
| MAF | Monoalquil ftalato |
| MBF | Monobutil ftalato |
| MEHF | Mono(2-etilhexil) ftalato |
| MMF | Monometil ftalato |
| MnP | Manganeso peroxidasas |
| ng | Nanogramos |
| <i>P</i> | Productividad |
| PDA | Agar papa dextrosa |
| pI | Punto isoeléctrico |
| <i>p</i> -NP | <i>para</i> -nitrofenil |
| <i>p</i> -NPB | <i>para</i> -nitrofenil butirato |
| <i>p</i> -NPP | <i>para</i> -nitrofenil palmitato |
| PPAR | Receptores activadores de proliferadores de peroxisomas |
| PVC | Cloruro de Polivinilo |
| q_p | Tasa específica de formación de la enzima |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| RT | Tiempo de retención |
| X_{max} | Biomasa máxima |
| $Y_{E/X}$ | Rendimiento de la enzima con respecto a la biomasa |
| YMG | Medio de extracto de malta con glucosa para levaduras (yeast and malt extract with glucose media) |

RESUMEN

Los ftalatos son ésteres derivados del ácido ftálico y se utilizan como plastificantes en la elaboración de plásticos. El di(2-etilhexil) ftalato (DEHF) es ampliamente utilizado a nivel mundial, sin embargo, dado que este compuesto no se une a la matriz polimérica del plástico, con el paso del tiempo migra al ambiente, provocando daños a la salud de diferentes organismos y generando problemas de bioacumulación (Wensing *et al.* 2005. Lowell Center for Sustainable Production, 2011). Se ha reportado que algunos hongos comestibles poseen la capacidad de degradar una amplia variedad de compuestos aromáticos, entre los cuales se encuentran los ftalatos (Sánchez, 2006; 2009), por tal motivo el objetivo de este trabajo fue evaluar en fermentación sumergida la degradación de diferentes concentraciones de DEHF por tres cepas de hongos comestibles (*Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus* ATCC32783 y *Pleurotus pulmonarius*) y el efecto de dicho proceso sobre la velocidad específica de crecimiento (μ), producción de biomasa máxima (X_{max}), cuantificación de glucosa presente en el medio, perfil de pH del medio, perfil enzimático de lacasas y esterasas y los rendimientos enzimáticos (E_{max} , $Y_{E/X}$, q_p y P) que conlleva su determinación.

Las cepas fúngicas se desarrollaron en agar extracto de malta (EMA), formando colonias en la periferia que se emplearon como inóculos. Éstas crecieron en matraces de 125 mL que contenían 55 mL de medio mineral suplementado con extracto de levadura y glucosa. A este medio se le adicionaron las concentraciones de 1500 y 2000 mg de DEHF/L. En los cultivos con DEHF se adicionó Tween80 al 0.04 %. En todos los casos, el medio de cultivo sin adición de ftalato (SAF) fue utilizado como testigo (modificado de Córdoba-Sosa *et al.* 2014). Las fermentaciones de *L. edodes* se incubaron a 25 °C por 37 días y las de *P. ostreatus* ATCC32783 y *P. pulmonarius* se incubaron a 28 °C por 24 y 23 días respectivamente. Ya inoculadas, las fermentaciones se mantuvieron en agitación a 120 rpm. Se hicieron tres réplicas de los matraces por día. Para *L. edodes* la toma de muestras se realizó cada 48 horas a partir del día de incubación y hasta el día 20, a partir de este día y hasta el día 37 los muestreos se hicieron cada 24 horas. En las especies del género *Pleurotus*, los hongos se desarrollaron durante las primeras 72 h de cultivo y posteriormente se tomó la primera muestra, los muestreos subsecuentes se realizaron cada 24 h. Se obtuvo el sobrenadante de cada matraz por filtrado y retención de la biomasa. Se guardaron las cantidades necesarias en tubos Eppendorf para posteriores análisis. La producción de biomasa se determinó a través del método de peso seco para obtener los valores de μ y X_{max} mediante el uso de la ecuación logística. Los cambios de pH en el medio se determinaron con un potenciómetro. La

cuantificación de la glucosa en el medio se obtuvo por el método de DNS. Para la actividad de lacasas y esterases se usó 2,6-dimetoxifenol y *p*-nitrofenil butirato como sustratos respectivamente. Los rendimientos enzimáticos Y_{EX} , q_p y P se determinaron mediante la actividad máxima (E_{max}) de la enzima.

Los resultados mostraron que *L. edodes* es el hongo con menor μ (0.0074 h^{-1} en 0 y 1500 mg de DEHF/L y 0.0070 h^{-1} en 2000 mg de DEHF/L), en cada uno de los tratamientos en comparación con las otras dos cepas, tardando así, más tiempo en alcanzar su fase estacionaria (33-34 d). *P. ostreatus* ATCC32783 presentó la mayor X_{max} (7.1054 g/L en medio SAF, 8.3781 g/L en 1500 mg de DEHF/L y 9.2901 g/L en 2000 mg de DEHF/L) en los tres medios. En las tres cepas los valores más altos de X_{max} se presentaron en el tratamiento con mayor concentración de DEHF.

En *L. edodes* el DEHF se degradó hasta mono(2-etilhexil) ftalatoMEHF pasando por la formación de dodecil octil ftalato, diheptil ftalato, ditridecil ftalato y monobutil ftalato (MBF). En *P. ostreatus* ATCC32783 el DEHF se degradó en ciclohexil 2-pentil ftalato, diisooctil ftalato, di(2-metilbutil) ftalato y MEHF. En *P. pulmonarius* el DEHF se degradó hasta MEHF a través de la formación de 2-etilhexil hexil ftalato, 2-pentil ftalato, di(2-metilbutil) ftalato y MEHF.

Las tres cepas fueron capaces de hidrolizar selectivamente un enlace del DEHF para formar MEHF y de convertir las largas cadenas de DEHF en cadenas más cortas o eliminar su ramificación quitando grupos etilo. Durante el proceso de degradación se formaron metabolitos (alcoholes, ácidos orgánicos y compuestos aminados) que afectaron los niveles de pH en cada una de las cepas.

Se concluyó que las cepas de hongos comestibles *L. edodes*, *P. ostreatus* ATCC32783 y *P. pulmonarius* son capaces de utilizar parcialmente el DEHF como fuente de carbono y energía a través de algunos metabolitos formados durante este proceso, provocando un incremento significativo en la producción de biomasa. Sin embargo, ninguna de las tres cepas pudo degradar este compuesto hasta AF. Este es el primer reporte en el que se utiliza *L. edodes* y *P. pulmonarius* para crecer en presencia de DEHF y degradarlo. No hay represión catabólica en ninguna cepa, que ya las tres utilizan la glucosa como principal fuente de carbono y energía en los tres tratamientos. En las tres cepas, se observa que las lacasas y esterases extracelulares con actividad catalítica observada en los tres medios son constitutivas e inducibles.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Di(2-etilhexil) ftalato (DEHF)

Los ftalatos son ésteres de ácido ftálico (AF) o ácido 1,2-bencendicarboxílico (Figura 1) obtenidos sintéticamente por esterificación del anhídrido ftálico con diferentes alcoholes. Dependiendo de los alcoholes empleados se obtienen moléculas con diferentes propiedades físico-químicas. Su estructura varía dependiendo del número de cadenas laterales y grupos arilo, alquilo o dialquilo unidos a la base fenilo. Existen tres formas isoméricas (*orto*, *para* y *meta*) del ácido ftálico, que constituyen a los ésteres de la categoría más grande de plastificantes. El isómero *orto* y sus ésteres representan la división más grande de todos los ftalatos a nivel mundial, especialmente los utilizados como plastificantes para la fabricación de plásticos a partir de cloruro de polivinilo (PVC) (Benjamin *et al.* 2015).

En particular, los ftalatos se pueden clasificar en dos grupos:

- Ftalatos de elevado peso molecular: diisonoil ftalato (DINF) y diisodecil ftalato (DIDF) que conforman el 80 % de los ftalatos usados en Europa y están incluidos en el REACH (Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de Sustancias Químicas por sus siglas en inglés).
- Ftalatos de bajo peso molecular: Incluyen al dibutil ftalato (DBF), butil bencil ftalato (BBF) y di(2-etilhexil) ftalato (DEHF), los cuales son clasificados como muy dañinos en el REACH (ATSDR, 2002)

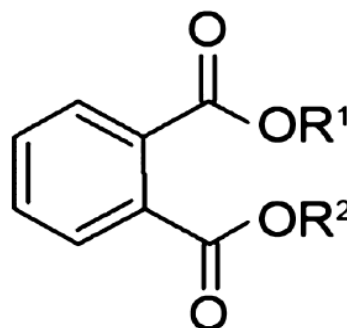


Figura 1. Estructura química general representando ésteres de ácido ftálico (Benjamin *et al.* 2015).

Los ftalatos son ampliamente usados como agentes formadores de película, solventes y desnaturizantes, pero especialmente como plastificantes para hacer más flexible y maleable al plástico. En particular, el DEHF es el plastificante más producido y utilizado en el mundo para la laminación de PVC, teniendo aplicaciones que van desde la industria automotriz y productos médicos hasta artículos para el cuidado de niños y fabricación de juguetes.

1.1.1. Características físico-químicas

El DEHF es un ftalato cuya estructura química está conformada por un anillo bencénico por grupos funcionales éster a dos cadenas alquílicas de ocho carbonos cada una. Su fórmula y peso

molecular son $C_{24}H_{38}O_4$ y 390.57 g/mol, respectivamente (Figura 2). Este compuesto tiene varios sinónimos, entre los que destacan: ácido 1,2-Bencendicarboxílico, di(2-etilhexil) éster; ácido 1,2-Bencendicarboxílico, 1,2-di(2-etilhexil) éster; di(2-etilhexil) bencen-1,2-dicarboxilato; di(2-etilhexil) 1,2-bencendicarboxilato; di(2-etilhexil) *o*-ftalato; di-sec-octil ftalato; etilhexil ftalato; 2-etilhexil ftalato; entre otros.

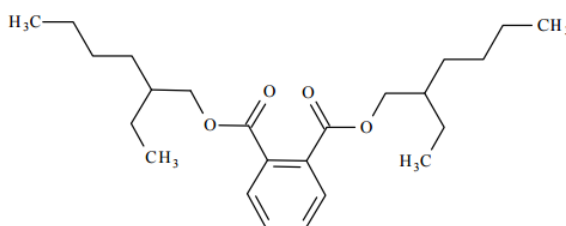


Figura 2. Estructura química del DEHF (IHCP, 2008).

El DEHF presenta un aspecto líquido, viscoso, incoloro y ligero aroma a temperatura ambiente. Es un material complejo insoluble en agua, aunque en la literatura se reportan valores que van desde 0.003 mg/L hasta 1.3 mg/L a temperaturas de 20–25 °C. Dicha propiedad está relacionada con el tipo, estructura y peso molecular de sus cadenas laterales. Su naturaleza altamente lipofílica facilita su migración de los productos plásticos y continua liberación en el ambiente circundante. Factores tales como la temperatura, presión, pH, presencia de solventes, compuestos orgánicos y radiaciones pueden acelerar la tasa de migración (Sarath Josh *et al.* 2012). Otras de sus características físico-químicas se mencionan en la tabla 1.

Tabla 1. Propiedades físico-químicas del DEHF (NTP, 2006).

| Propiedades | Valor |
|------------------------------|-----------------------|
| CAS N° | 117-81-7 |
| Peso molecular (g/mol) | 390.6 |
| Átomos de carbono por cadena | 8 |
| Densidad (g/mL) | 0.985 |
| Punto de ebullición | 386 |
| Presión de vapor (Pa) | 2.49×10^{-3} |

1.1.2. Usos

El DEHF es el principal plastificante usado a nivel mundial en productos de PVC (Sampson y de Korte, 2011). Las cadenas poliméricas de PVC se unen de tal manera que conforman una estructura entrecruzada rígida. Las moléculas de DEHF facilitan el deslizamiento entre estas cadenas poliméricas, obteniendo así, la fabricación de diferentes productos con propiedades mecánicas mejoradas. Este plastificante se encarga de llenar los espacios intersticiales en la malla de PVC para impartir flexibilidad a los productos finales (Figura 3). La mayoría de los productos derivados del PVC incluyen: materiales de envasado de alimentos, juguetes y material para el cuidado de niños, tubos y dispositivos médicos tales, como bolsas de sangre y plasma, jeringas, materiales de diálisis, etc.

La dureza del PVC disminuye al aumentar la proporción de DEHF mezclado. Un aumento en la cantidad de este plastificante en los plásticos disminuye su resistencia a la tracción, y por lo tanto, aumenta la plasticidad del producto final. Estos plásticos pueden contener de 1 a 40% de DEHF en peso. Y debido a que no hay ningún enlace químico entre la malla del polímero y el plastificante, es que resulta la migración gradual del DEHF de los productos de plástico al ambiente circundante (Hauser y Calafat, 2005; Heudorf *et al.* 2007).

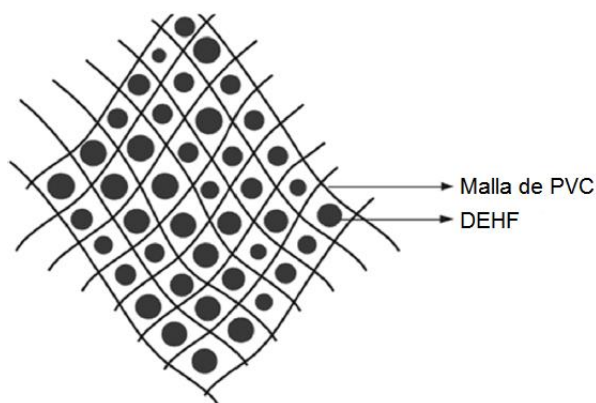


Figura 3. Representación esquemática del área que ocupa el DEHF en los espacios intersticiales del PVC (Benjamin *et al.* 2015).

El consumo mundial de DEHF (en toneladas) por región geográfica hasta 1990 fue en Europa Occidental de 465, América del Norte de 155, Asia del Este de 490, Japón de 245 y otros de 765 (Lorz *et al.* 2002).

1.1.3. Producción

El DEHF es producido comercialmente por una reacción química de esterificación entre el anhídrido ftálico y el 2-etil hexanol (Sampson y de Korte, 2011). Esta reacción se lleva a cabo en

dos etapas sucesivas, la primera es muy rápida y da como resultado la formación de un mono-éster por alcoholisis del anhídrido ftálico. La segunda etapa consiste en la conversión del mono-éster en un di-éster, ésta es una reacción reversible y procede más lentamente que la primera. Para cambiar el equilibrio hacia la formación del di-éster, el agua de la reacción se elimina por destilación. Las elevadas temperaturas y un catalizador aceleran la velocidad de reacción, dependiendo del catalizador utilizado, la temperatura en el segundo paso varía de 140 a 165 °C con catalizadores ácidos (ácido sulfúrico o ácido *p*-toluenosulfónico) y de 200 a 250 °C con catalizadores anfóteros (IHCP, 2008).

Información disponible en 2010 reportó que el DEHF fue producido por 23 compañías en Estados Unidos, 19 en México, 9 en China, 4 en Reino Unido, 3 en Alemania, 2 en China (Región Administrativa Especial de Hong Kong), India y Japón respectivamente y 1 en Bélgica, Bulgaria, Canadá, República Checa, Francia, la Antigua Unión Estatal de Serbia y Montenegro, Sudáfrica y Suiza (Chemical Sources International, 2010).

1.1.4. Daños a la salud

Los ftalatos son considerados compuestos tóxicos con efectos nocivos a la salud de varios sistemas biológicos (Benjamin *et al.* 2015). En algunos mamíferos, los *orto*-dialquil ftalatos (*o*-DAFs) se absorben rápidamente y se eliminan después de la exposición oral. El di-éster se convierte rápidamente en mono-éster en el tracto digestivo (Albro *et al.* 1973). Los mono-ésteres son considerados generalmente como los responsables de los efectos tóxicos. Los *o*-DAFs con largas cadenas laterales (C₄ o más) son sometidos al metabolismo oxidativo y varios metabolitos pueden ser excretados ya sea de manera libre o conjugados con ácido glucurónico. El DEHF es excretado a través de la orina y las heces (Babich y Osterhout 2010) ya que es hidrolizado por esterases presentes en los intestinos, hígado, pulmones y otros tejidos a MEHF y posteriormente a AF (Wittassek y Angerer 2008).

Estudios han demostrado que los efectos del DEHF en ratones dependen de la dosis y el tiempo de exposición a ésta. La exposición a este plastificante en los días 7 y 8 de gestación lleva a una alta incidencia de muerte y malformaciones, pero la misma exposición en otros días tuvo efectos menores (Tomita *et al.* 1986).

Con base en estudios de fertilidad en ratones, se demostró que el DEHF es el tóxico más potente de los ftalatos a nivel reproductivo. (Heindel *et al.* 1989). En roedores machos provoca atrofia de los túbulos seminíferos, disminución en el peso testicular, disminución en la producción de esperma y bajos niveles testiculares de zinc. Estos efectos a nivel testicular pueden llevar a la infertilidad (Foster *et al.* 1980; Li *et al.* 2013).

A nivel gonadal, la exposición a DEHF produce anormalidades en procesos dependientes de andrógenos (Akingbemi y Hardy, 2001) y afecta las funciones reproductivas y del comportamiento sexual en la progenie de ratas macho (Dalsenter *et al.* 2006). A nivel hipotalámico-pituitario, la exposición prenatal a DEHF (dosis de 30 mg/kg/día) modifica el contenido de neurotransmisores de aminoácidos en el hipotálamo y secreción de FSH (hormona folículo estimulante) en ratas macho de 30 días de edad (Carbone *et al.* 2010; 2012).

Hay pocos reportes acerca de los efectos de la exposición a DEHF en ratas hembra, aunque se asocian con un incremento en el número de folículos terciarios atrésicos en la progenie de ratas hembra adultas (Grande *et al.* 2007). La exposición de ratas adultas a DEHF resulta en ciclos anovulatorios hipoestrogénicos y ovarios policíclicos (Lovekamp-Swan y Davis, 2003). El MEHF (metabolito activo del DEHF) reduce la producción de estradiol por disminución de aromatasas, enzima que limita la velocidad para convertir testosterona en estradiol, en cultivos de células de la granulosa de ratas inmaduras (Lovekamp y Davis 2001).

En otros estudios realizados en modelos celulares se ha reportado que el MEHF actúa induciendo adipogénesis y estos efectos son mediados por la actividad de γ receptores activadores de proliferadores de peroxisomas (PPAR γ), sugiriendo que el DEHF podría promover obesidad *in vivo* (Feige *et al.* 2007).

Se ha reportado que la administración oral de DEHF es causa de adenoma hepatocelular y/o carcinoma en ratas y ratones de ambos sexos. Varios estudios en ratas sugirieron que la exposición a DEHF en la dieta originaba tumores hígado (Ito *et al.* 2007) y páncreas (Selenskas *et al.* 1995).

Un estudio epidemiológico reciente en México reportó una relación positiva entre las concentración de DEHF en orina y el riesgo de desarrollar cáncer de seno (López-Carrillo *et al.* 2010).

En modelos murinos se ha demostrado que la inhalación de DEHF es capaz de incrementar la respuesta inmune característica de asma y alergias, mostrando aumentos en el nivel sérico de IgG1

y los niveles de células inflamatorias, incluyendo eosinófilos, linfocitos y neutrófilos en pulmón y fluido bronco-alveolar, sin embargo, los efectos observados únicamente se han presentado en concentraciones muy altas de DEHF (Kimber y Dearman, 2010). Al inhalar el DEHF, éste penetra dentro de la región pulmonar, afectando la inducción de prostaglandinas y tromboxanos en los pulmones, por lo que incrementa el riesgo de inflamación de las vías aéreas superiores como sucede con el asma (Oie *et al.* 1997).

1.2. Biodegradación de ftalatos

El aumento en la producción mundial de ftalatos ha resultado en una enorme cantidad de residuos plásticos que se descargan en el ambiente. Las propiedades físicas de éstos compuestos los asocian severamente con partículas en aire, agua, suelo y sedimentos (Stales *et al.* 1997; Cai, *et al.* 2007). Generalmente la difusión de los ftalatos de la matriz de los materiales plásticos se produce a un ritmo lento por causas naturales, mientras que a nivel superficial se da rápidamente por la colonización de microorganismos a partir de una degradación metabólica. También se ha reportado su volatilización o lixiviación por agua de lluvia. Dado que estos compuestos y sus metabolitos se encuentran presentes en todos los entornos, ha sido inevitable su paso a través de las redes tróficas acuáticas y terrestres, llegando a generar problemas de bioacumulación.

Los ftalatos pueden ser degradados por sistemas tanto abióticos como bióticos, con predominio de este último. La degradación es el mecanismo clave a través del cual el ftalato presente en el medio sufre transformaciones que afectan su composición química o física original y repercuten en sus propiedades iniciales. En la biodegradación, dicho mecanismo es llevado a cabo por diferentes grupos de microorganismos. Muchas cepas bacterianas, algunos hongos, levaduras y algas han sido reportados para degradar ftalatos en condiciones aerobias y anaerobias. La degradación anaerobia es bastante lenta, en comparación con el proceso de degradación aeróbica (Benjamin *et al.* 2015). En sistemas bióticos aerobios el proceso de degradación se da por hidrólisis, durante el cual los ftalatos se hidrolizan en dos pasos. En la primera etapa hidrolítica, se forman un monoéster y un resto alcohol (R_1OH), seguida de una segunda etapa hidrolítica para liberar el AF a partir del último resto alcohol (R_2OH) unido al anillo de fenilo. Estas dos reacciones se llevan a cabo lentamente, por lo general mediadas por compuestos ácidos, básicos, iones de metales, aniones o materiales orgánicos, preferiblemente a un rango de pH que va de neutro a condiciones ácidas (Stales *et al.* 1997).

Tabla 2. Principales estudios que describen la degradación de ftalatos por diferentes grupos de hongos (Benjamin *et al.* 2015).

| Organismo | Tipo de ftalato | Referencia |
|--|------------------------|----------------------------------|
| <i>Aspergillus niger</i> (AG-1) | DMTF | Ganji <i>et al.</i> 1995. |
| <i>Aspergillus niger</i> | DMF | Pradeepkumar y Karegoudar, 2000. |
| <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Aspergillus sydowii</i> , <i>Culvularialunata</i> , <i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium morniforme</i> , <i>Fusarium sporotrichioides</i> , <i>Penicillium citrinum</i> . | DEHF | Chai <i>et al.</i> 2008. |
| <i>Penicillium expansum</i> , <i>Penicillium frequentans</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> , <i>Trichoderma viride</i> , | DBF | Lee <i>et al.</i> 2004. |
| <i>Daldinia concentrica</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Trametes versicolor</i> , <i>Formitella fraxinea</i> , <i>Irpex lacteus</i> , <i>Merullius tremellosus</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Polyporus brumallis</i> , | DMF, DEF, BBF | Hwang <i>et al.</i> 2008. |
| <i>Schizophyllum commune</i> , <i>Trametes versicolor</i> , | BBF | Kim <i>et al.</i> 2002. |
| <i>Fusarium oxysporum</i> . | DEHF | Kim <i>et al.</i> 2003. |
| | DBF DPF | Kim y Lee, 2005. |
| | DPF | Kim <i>et al.</i> 2005. |
| | DPF | Ahn <i>et al.</i> 2006. |
| <i>Fusarium sp.</i> | DMF | Luo <i>et al.</i> 2009. |
| <i>Polyporus brumalis</i> | DBF | Lee <i>et al.</i> 2007. |
| <i>Sclerotium rolfsii</i> | DMTF | Sivamurthy <i>et al.</i> 1991. |

Dada la enorme cantidad de residuos plásticos presentes en los vertederos, sedimentos, cuerpos de agua, etc., en el ambiente a través del tiempo, muchos nuevos microorganismos han evolucionado para prosperar en este nuevo nicho ecológico, llegando a metabolizar los ftalatos de los ambientes contaminados. Muchos investigadores han identificado y aislado nuevos microorganismos capaces de utilizar diferentes ftalatos como única fuente de carbono y energía en un breve período de tiempo, bajo condiciones ambientales controladas. Estos organismos pueden conducirse ya sea individualmente o como consorcio para degradar completa o parcialmente los ftalatos. Dichas cepas provienen de ambientes aerobios y anaerobios, principalmente de suelo, agua y lodos.

Los microorganismos, por ser los principales representantes en el proceso de biodegradación en diversas condiciones ambientales, también ha sido de suma importancia conocer las rutas metabólicas que emplean (Figura 4). Muchas cepas bacterianas y algunos grupos de hongos (Tabla 2) y algas han sido reportados para degradar ftalatos (Pradeep y Benjamin, 2012).

El principal obstáculo para que los microorganismos degraden los ftalatos es la especificidad del compuesto para ser digerido mediante la producción de enzimas específicas (Tabla 3), en especial enzimas que diferencian entre el DAF y su respectivo mono-éster (Akita *et al.* 2001).

En el primer paso del proceso de degradación, las esterasas actúan específicamente sobre los enlaces éster (-O-) del ftalato, formándose así el respectivo mono-éster y el alcohol.

Tabla 3. Microorganismos específicos con sus respectivas enzimas que actúan sobre algunos ftalatos (Benjamin *et al.* 2015).

| Organismo | Enzima | Ftalato | Referencia |
|--|---|----------------------|---|
| <i>Aspergillus niger</i> (AG-1) | DMTF sterasa | DMTF | Ganji <i>et al.</i> 1995. |
| <i>Bacillus</i> sp. | Esterasa | DMF | Niazi <i>et al.</i> 2001. |
| <i>Candida cylindracea</i> | Esterasa de levadura | DEHF | Kim y Lee, 2005. |
| <i>Delfia</i> sp. TBKNP 05 | DBF esterasa MBF esterasa Ftalato dioxigenasa Protocatecuato 4,5-dioxigenasa | DBF | Patil <i>et al.</i> 2006. |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | Cutinasa | DBF | Kim <i>et al.</i> 2003. |
| <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>pst</i> | Cutinasa fúngica | DEHF | Kim <i>et al.</i> 2002. |
| <i>Fusarium</i> sp. DMT-5-3 | Esterasa | DMTF | Luo <i>et al.</i> 2012. |
| <i>Gordonia</i> sp. cepa P8219 | Hidrolasa | DEHF | Nishioka <i>et al.</i> 2006. |
| <i>Microbacterium</i> sp. cepa CQ01107 | Catecol 1,2-dioxigenasa Catecol, 2,3-dioxigenasa | DEHF | Chen <i>et al.</i> 2007. |
| <i>Micrococcus</i> sp. YGJ1 | Esterasa | DAFs MAF | Akita <i>et al.</i> 2001. Maruyama <i>et al.</i> 2005. |
| <i>Ochrobacterium acthoropt</i> 6-2b | Esterasa | DETF | Xu <i>et al.</i> 2006 |
| <i>Pseudomonas</i> sp. 054 | Esterasa, protocatecuato 4,5-dioxigenasa | DMTF | Tserovska <i>et al.</i> 2006. |
| <i>Rhodococcus erythropolis</i> | Esterasa | DAFs | Kurane, 1997 |
| <i>Rhodococcus</i> sp. cepa DK17 | Protocatecuato 3,4 dioxigenasa | Ftalato, tereftalato | Choi <i>et al.</i> 2005. |
| <i>Sclerottum rolfsii</i> | Ftalato esterasa | DMF | Sivamurthy <i>et al.</i> 1991. |
| <i>Sphingomonas yanoikuyae</i> DOS01 | Esterasa | DMF | Gu <i>et al.</i> 2009 |

Muchos genes presentes en plásmidos codifican enzimas que degradan ftalatos, los cuales se han caracterizado a partir de muchos microbios. En *Bacillus* sp (Niazi *et al.* 2001) se ha reportado un mega plásmido de 60 kb asociado con la degradación inicial de DMF. En *Pseudomonas putida* NMH102-2 (Nomura *et al.*1992) se reportó un plásmido una conjugativo de 200 kpb que alberga un clúster de genes asociados con la degradación de ftalatos transcritos en la dirección *pht12345* (permeasa, reductasa, oxigenasa, deshidrogenasa y descarboxilasa). Se han descrito tres unidades de transcripción con una organización separa entre sus genes en: *ophA1* para ftalato oxigenasa reductasa, *ophDC* para un transportador y 4,5-dihidroxitfalato descarboxilasa, y *ophA2B* para

ftalato oxigenasa y *cis*-ftalato dihidrodiol deshidrogenasa (Chang y Zylastra 1998). En *Moraxella* sp. se ha estudiado la degradación de ácido *o*-ftálico por diferentes grupos de investigación, quienes reportan un plásmido de 60 kpb (Rani *et al.* 1996), mientras que el plásmido *pOPHI* de 270 kb de *P. putida* se reportó como responsable de la degradación de ftalatos (Nomura *et al.* 1990). El plásmido de 140 kpb de *P. fluorescens* SKP3 se ha reportado encargado de la degradación de los ácidos *o*- y *p* ftálico (Karpagam y Lalithakumari, 1999). Esto ha demostrado que la degradación de ésteres de ácido ftálico es codificada cromosómicamente (Dutton *et al.* 1995).

1.3. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS)

La cromatografía agrupa un conjunto importante y diverso de métodos que facilitan la separación, identificación y determinación de componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas; muchas de estas separaciones son imposibles por otros medios.

La identificación y cuantificación de los DAFs y sus mono-alquil ésteres en matrices ambientales demandan el uso de diferentes técnicas de separación y detección para su análisis. Los DAFs se pueden cuantificar usando técnicas cromatográficas tales como la cromatografía líquida (liquid chromatography-LC por sus siglas en inglés) o la cromatografía de gases (gas chromatography-GC). Esta última, equipada con espectrometría de masas (mass spectrometry-MS) es la técnica más utilizada. Un espectrómetro de masas es la herramienta analítica más comúnmente usada y eficaz para la identificación y cuantificación simultánea de cada éster de ftalato con un bajo límite de detección (ng/L o <ng/g). Para alcanzar la cuantificación exacta, las muestras deben tratarse buscando eliminar la mayor cantidad de ruido posible (Sopheak *et al.* 2015).

En todas las separaciones cromatográficas la muestra se disuelve con una fase móvil, que puede ser un gas inerte (generalmente helio), un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase se hace pasar a través de una fase estacionaria inmisible fija en una columna o en una superficie sólida. Ambas fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra se distribuyen en grados distintos entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven muy lentamente con el fluido de la fase móvil. En cambio, los componentes unidos débilmente a la fase estacionaria se mueven con rapidez. Como consecuencia de las distintas velocidades de migración se obtiene tanto un tiempo de retención (RT) específico para cada compuesto en la columna, como bandas o zonas diferentes en las que la muestra se

separa. Dichas bandas se pueden analizar en forma cualitativa y cuantitativa a través de los cromatogramas obtenidos.

En los cromatogramas se determina la pureza de los compuestos orgánicos, la aparición de picos adicionales revela la presencia de contaminantes y las áreas bajo estos picos proporcionan un cálculo aproximado del grado de contaminación. Dichas áreas son sólo cálculos aproximados, ya que componentes diferentes podrían tener factores de respuesta del detector.

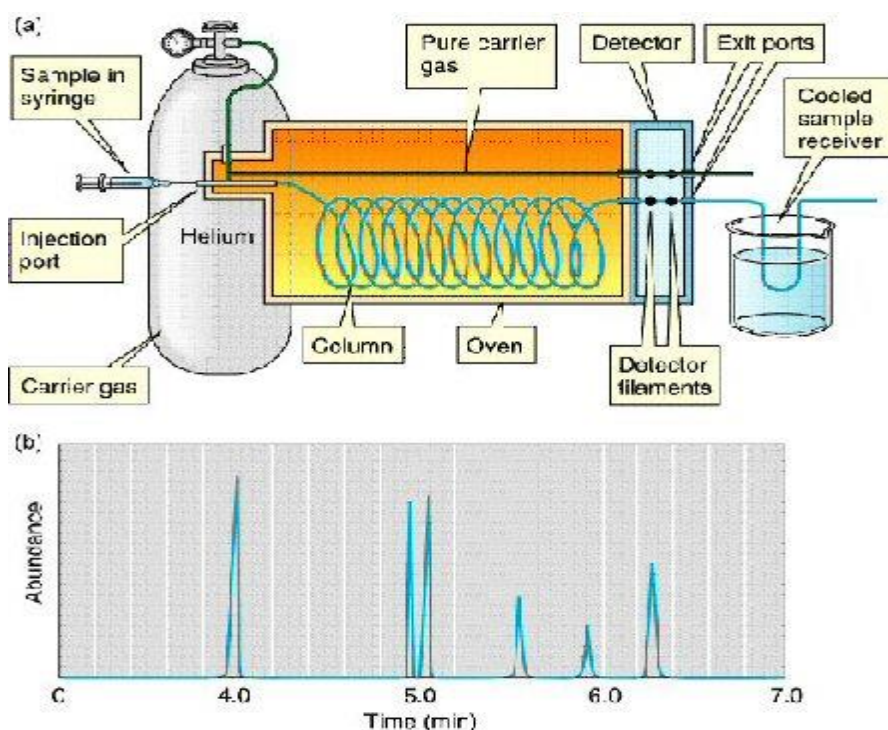


Figura 5. Esquema del funcionamiento de la técnica de cromatografía de gases (Universidad de Maine, 2014).

Un espectrómetro de masas es un instrumento que produce iones y los separa de acuerdo con sus relaciones masa/carga (m/z). El Objetivo del sistema de entrada es introducir una cantidad muy pequeña de muestra en la fuente de iones, donde los componentes de la muestra se transforman en iones gaseosos gracias al bombardeo de electrones, fotones, iones o moléculas. La salida de la fuente de iones es un flujo de iones positivos que son acelerados en el analizador de masas, aquí su dispersión depende de la relación m/z de los iones del analito y no de la longitud de onda de los fotones.

El espectrómetro de masas tiene un transductor que convierte el haz de iones en una señal eléctrica que pueda ser procesada, almacenada en la memoria de una computadora y mostrada en una

pantalla o almacenada en otros medios. La detección consecutiva de los iones formados a partir de las moléculas de la muestra (suponiendo que se trate de una sustancia pura) produce el espectro de masas de la sustancia, que es diferente para cada compuesto químico y que constituye una identificación prácticamente inequívoca del compuesto analizado (Gutiérrez y Droguet 2002).

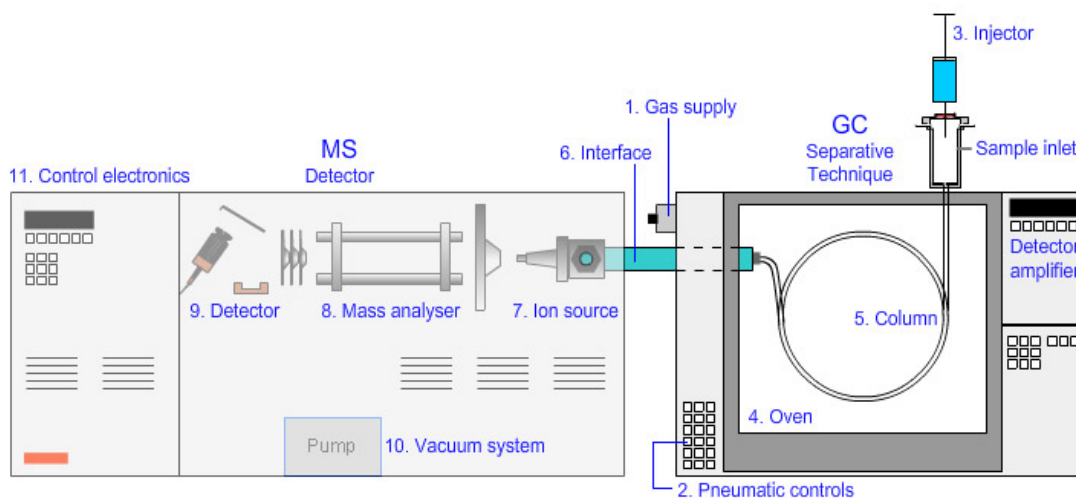


Figura 6. Esquema del funcionamiento de la técnica de cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (GC/MS) (Universidad de Maine, 2014).

La etapa de separación de la mayoría de los DAFs se realiza con frecuencia con una columna capilar no polar de 30 m de largo \times 0.25 mm de diámetro, con películas de 0.25 micras de 5% fenil-95% metil polisiloxano tal como la DB-5MS y HP-5MS. Esta columna ofrece una buena resolución, mayor temperatura máxima de operación en comparación con columnas recubiertas con fases estacionarias polares como polietilenglicoles (columnas de cera) o cianopropilos. Otras columnas tales como DB-XLB, Rxi-5MS, SLB-5MS, Phenomenex XLB, Ultra-2 y DB-35 también pueden usarse con buena eficiencia (Sopheak *et al.* 2015).

Tabla 4. Iones para la selección del monitoreo del ion del DEHF por GC/MS (Sopheak *et al.* 2015)

| Analito | Ion cuantificado (abundancia) | Iones cuantificados (abundancia) | Referencias |
|---------|-------------------------------|--|--|
| DEHF | 167 (36) | 179 (9.8), 149 (100) | Alvarez, 2010. |
| | 149 (100) | 279, 167, 113 | Alvarez <i>et al.</i> 2014 |
| | | 279 (8.8), 167 (34) | Alzaga <i>et al.</i> 2013; |
| | | 279 | Alvarez <i>et al.</i> 2008; Brossa <i>et al.</i> 2003; |
| | | 167, 57 | Caroli <i>et al.</i> 2001; Chang <i>et al.</i> 2011. |
| | 167 | Cai <i>et al.</i> 2003; Cincinelli <i>et al.</i> 2001. | |
| | 129 | 112 | Bergh <i>et al.</i> 2011; Castillo y Barcelo 2001; Bergé 2012. |
| | | | Hubert <i>et al.</i> 2001. |

Para la identificación y cuantificación de los DAFs, la MS parece ser el método más selectivo. Se han utilizado todo tipo de analizadores, incluyendo cuadrupolo, cuadrupolo triple, trampa de iones y sector magnético. Los sistemas de cuadrupolo son generalmente preferidos debido a su robustez, estabilidad, rango dinámico lineal y bajo costo. Detectores de trampa de iones tienen una sensibilidad similar, pero más bajo rango dinámico (Blair *et al.* 2009; Net *et al.* 2014). Con detector de MS, cada DAF puede ser ionizado por impacto electrónico, o más raramente por ionización química (Berset y Etter-Holzer, 2001). Se han cuantificado los iones clasificatorios para DEHF utilizando una columna capilar Rxi®-5 ms, encontrando que los más representativos son de 167 y 149 con abundancias de 36 y 100 respectivamente (Tabla .4).

1.4. Crecimiento microbiano

En algunos sistemas biológicos, el crecimiento microbiano es el incremento ordenado de todos los constituyentes celulares que conduce a un aumento en su masa y finalmente a un aumento su número de células. Para seguir el curso del crecimiento celular de los microorganismos, es necesario hacer mediciones cuantitativas y representaciones gráficas. El crecimiento puede ser medido en términos de dos diferentes parámetros, la masa celular y el número de células, ambos tipos son expresados sobre un volumen fijo relativo de medio de cultivo (Fazenda, 2008).

La mayoría de los modelos de crecimiento microbiano que se han desarrollado han sido para monocultivos en un hábitat cerrado, es decir, para un solo microorganismo (cepa o especie) en un entorno aislado. Un hábitat cerrado significa que los recursos para mantener la vida, tales como los nutrientes, son finitos y no hay material o energía que se intercambie con el exterior.

Muchas curvas de crecimiento de un organismo introducido en un hábitat cerrado estéril presentan una curva sigmoide típica de la especie (figura 7). Tradicionalmente, esta curva ha sido representada por tres regímenes de crecimiento, inicialmente se presenta la fase lag en la que el microorganismo es introducido al medio de cultivo y el tamaño de su población permanece prácticamente sin cambios ya que comienza a adaptarse a este nuevo ambiente, por ende, su velocidad de crecimiento es casi nula. Después de la fase lag tiene lugar una etapa de crecimiento exponencial con un crecimiento y división celular extensivos. Cuando los recursos son finitos (sistema cerrado), el crecimiento exponencial no puede mantenerse indefinidamente, por lo que la tasa de crecimiento después de cierto punto comienza a declinar, Se aproximará a 0 asintóticamente y el tamaño de la población se mantendrá sin cambios nuevamente, esta fase es conocida como estacionaria. Un hábitat empobrecido de sus recursos para mantener la vida es

poco probable que pueda mantener por mucho tiempo una gran población microbiana. Por lo que finalmente continúa la mortalidad celular, en donde el tamaño absoluto de la población disminuye. Al observar esto, la curva de crecimiento se describe en varias publicaciones con cuatro regiones: lag, de crecimiento exponencial, estacionaria, y la muerte o la mortalidad (Taub *et al.* 2003; McKellar y Lu, 2004) (Peleg, 2006).

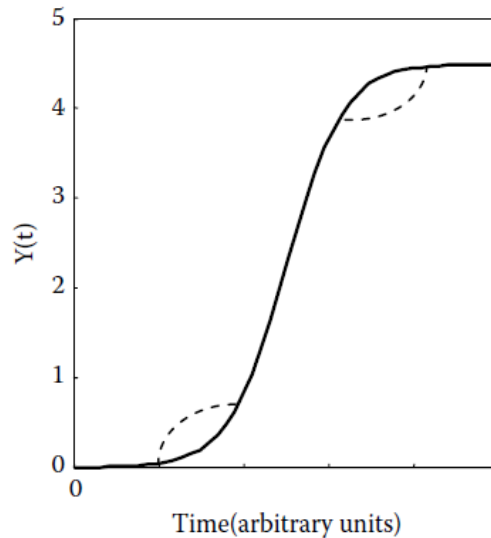


Figura 7. Vista esquemática de una curva sigmoide (logística) de crecimiento simétrico (Peleg, 2006).

Sin embargo, el inicio de la muerte incluso puede preceder a la fase estacionaria (Peleg, 2004), en cuyo caso se observa un verdadero pico de crecimiento, lo que es resultado de la contaminación en el medio, competencia por espacio con otro microorganismos, agotamiento de nutrientes esenciales, etc.

Ninguna relación matemática universal puede unir la fase lag, la fase de crecimiento exponencial y los niveles máximos de crecimiento poblacional, sin embargo, ciertos patrones ubicuos de crecimiento emergen y estos pueden ser descritos por modelos cinéticos que comparten características matemáticas comunes. Durante la fase exponencial, la velocidad de crecimiento es constante, obteniéndose razonablemente un estado estable, de hecho es la única fase del crecimiento donde las propiedades de las células pueden considerarse constantes y la velocidad de crecimiento exponencial.

Cuando la tasa de crecimiento isotérmica momentánea de una población aislada es únicamente proporcional a su tamaño momentáneo y a la porción de los recursos aún sin explotar en el hábitat, el resultado es un patrón de **crecimiento logístico continuo**, el cual puede ser descrito por la ecuación logística clásica, también conocida como modelo de Verhulst:

$$dN(t) / dt = rN(t) [1 - (N(t) / N_{\text{asíntota}})]$$

Donde:

$N(t)$ es el número momentáneo de células.

r es la tasa constante de crecimiento que representa la tendencia de los organismos a crecer rápida o lentamente en el medio en particular a una cierta temperatura.

$N_{\text{asíntota}}$ es la capacidad de carga del medio, expresado como el número de células que agotarán todos los recursos disponibles.

De acuerdo con este modelo, la porción de recursos que aún no se utiliza está representada por el término $1 - N(t) / N_{\text{asíntota}}$. Éste es unidad cuando $N(t) = 0$ y se aproxima a cero $N(t) \rightarrow N_{\text{asíntota}}$.

Un modelo de crecimiento más familiar es el de la **función logística**, que puede describir la curva de crecimiento, la relación entre el número real de células (biomasa) y el tiempo. Una versión de este modelo es:

$$N(t) = N_0 + (N_{\text{asíntota}} - N_0) / 1 + \exp [k(t_c - t)]$$

Donde:

N_0 es el tamaño inicial del inóculo.

k es la tasa de crecimiento (exponencial) al punto de la inflexión, también representada como μ .

De acuerdo con este modelo, t_c es el tiempo que marca el punto de inflexión de la curva de crecimiento. Este tiempo también corresponde con el tiempo para alcanzar la mitad del crecimiento neto en el número de células que se pueden alcanzar teóricamente, esto es $N(t_c) = N_0 + (N_{\text{asíntota}} - N_0) / 2$. De acuerdo con este modelo, cuando k es grande y $t \ll t_c$, $N(t) \sim N_0$. Por lo tanto, un modelo de este tipo es particularmente conveniente en la descripción de las curvas sigmoideas de crecimiento sigmoide con una larga fase lag. En este modelo es más conveniente su expresión en términos de una *relación de crecimiento neto* normalizado o una *relación logarítmica de crecimiento* en lugar de términos del número absoluto de las células individuales:

El modelo de la ecuación logística o modelos similares no deben ser utilizados para determinar el nivel de crecimiento asintótico de una población a partir de datos en los que la población microbiana monitoreada aún no haya mostrado señales de estabilización (normalización) (Peleg, 2006).

Cabe resaltar que la velocidad específica de crecimiento (μ) es característica para cada tipo de microorganismo y medio de cultivo, depende de factores internos como la capacidad de crecimiento del microorganismo y de factores externos como el ambiente en que se encuentre el microorganismo (Herbert *et al.* 1956).

1.5. Sistema de fermentación sumergida (FSm)

La Fermentación sumergida (FSm) es un proceso en el que los microorganismos son inoculados en una suspensión acuosa de nutrientes (líquidos, solubles en agua o presentes en suspensión) produciendo biomasa y metabolitos a partir de la utilización de sustancias orgánicas en ausencia o presencia de oxígeno (Fazenda *et al.* 2008).

Este es el sistema más utilizado en la industria para la obtención y fácil purificación de sustancias bioactivas como son las enzimas (Subramaniyam y Vimala, 2012) debido a que es sencillo, pueden controlarse más variables, hay una mayor homogeneidad de cultivo, se pueden recuperar fácilmente los productos finales y se ha utilizado ampliamente en procesos de biorremediación (Akar y Divriklioglu, 2010; Ertugay y Bayhan, 2010).

En este sistema los microorganismos se desarrollan flotando en el volumen del medio de cultivo; en el caso de los hongos, éstos pueden formar pequeñas esferas de micelio (pellets) cuando hay agitación (Crueger y Crueger, 1993), tal es el caso de algunos hongos de pudrición blanca que al crecer en FSm exhiben diferente morfología en su crecimiento, desde agregados de micelio flotantes hasta densos pellets sedimentados (Grimm *et al.* 2005).

A medida que los microorganismos descomponen los nutrientes liberan determinadas enzimas al medio acuoso.

1.6. Hongos basidiomicetos

Los basidiomicetos o basidiomycetes forman un grupo muy grande y diverso de hongos que se caracteriza por producir esporas sexuales (basidiosporas) en cuerpos fructíferos (Figura 8) llamados basidiocarpos (del griego *basidion* que significa base pequeña y *karpos* que significa fruto); este grupo de hongos está conformado por unas 20,000 especies, entre las cuales se encuentran los hongos comestibles conocidos como setas (Menéndez y Oliveros, 2004).

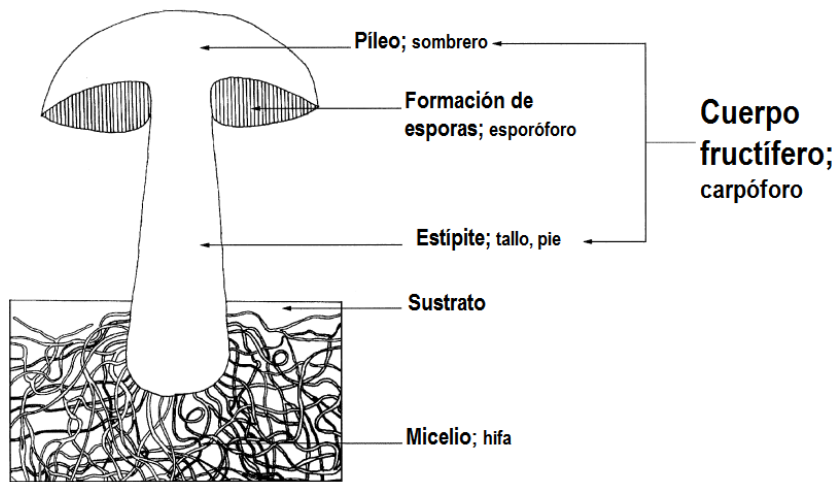


Figura 8. Esquema de un hongo comestible basidiomiceto (seta) y las estructuras principales que lo conforman (Kalač y Svoboda, 2000).

1.6.1. Fase vegetativa

Estos hongos están conformados estructuralmente por una fase vegetativa y una reproductiva. La primera antecede a la reproductiva y se caracteriza por la formación de micelio al crecer directamente sobre un sustrato. El micelio de estos hongos está formado por hifas bien desarrolladas de color blanco brillante, con septos simples con doliporo (Figura 9). Éste es una dilatación en forma de barril situada en el centro de la pared del septo, cubierto por una prolongación de la membrana celular (plasmalema) que rodea el centro del septo; esta estructura permite el paso de sustancias de un septo a otro de la hifa.

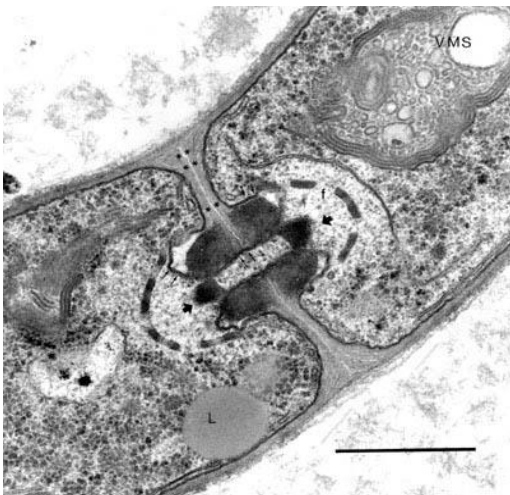


Figura 9. Imagen de microscopía electrónica de transmisión de hifas de *A. bisporus*, separadas por un septo doliporo en el centro, la línea punteada representa el plasmalema. *L* es una vacuola llena de grasa. La barra de escala es de 2µm (Halit 2000).

En basidiomicetos saprófitos el micelio se puede observar penetrando el sustrato del cual se alimenta el hongo o sobre éste, ya sea en troncos en descomposición u hojas muertas húmedas. En algunas especies las hifas se disponen de forma paralela originando cordones miceliarios, que al estar envueltas por una vaina o corteza se denominan rizomorfos (Deacon, 2006).

El micelio de un basidiomiceto tiene tres fases distintas durante el ciclo de vida del hongo:

- Micelio primario, también llamado homocariótico (*homo*-igual, *carion*-núcleo; con núcleos iguales), que se origina al germinar la basidiospora; al

principio puede ser plurinucleado, pero posteriormente se desarrollan los septos, cada uno de los cuales aloja un único núcleo.

- Micelio secundario, también conocido como dicariótico (*di*-dos *carion*-núcleo, de dos núcleos), surge a partir de la interacción de dos micelios homocarióticos. En éste se fusionan dos células uninucleadas de cada micelio en un proceso conocido como plasmogamia, dado que cada célula contiene dos núcleos diferentes sin fusionarse, lo único que se fusiona es el citoplasma de las células.

- Micelio terciario, representado por los tejidos organizados y más especializados que se originan cuando el micelio secundario forma tejidos complejos, éstos forman los cuerpos fructíferos, basidiomas o basidiocarpos (Menéndez y Oliveros, 2004).

1.6.2. Fase reproductiva

La morfología del cuerpo fructífero (carpóforo) de los basidiomicetos es muy variada, de manera general está conformado por un píleo y un estípite y es lo que la mayoría de las personas asocia con la palabra hongo. Y si bien muchas especies son comestibles y benéficas para la humanidad (como las setas), hay algunas extremadamente dañinas.

Dentro de los basidiomicetos, el grupo de los agaricales (del cual forman parte las setas) se caracteriza por presentar un himenio en forma de laminillas, es en esta estructura en donde se forma el basidio y estructuras estériles tales como cistidios o basidiolos (Menéndez y Oliveros, 2004).

1.6.2.1. Basidio y basidiospora

El basidio es una estructura que porta en su superficie las basidiosporas que se forman a consecuencia de los procesos de cariogamia y meiosis. Éste es una célula terminal de una hifa binucleada inicialmente pequeña y estrecha, pero que posteriormente comienza a crecer y ensancharse.

La mayoría producen cuatro basidiosporas, pero también hay aquellos que producen dos o más de cuatro, también no todos poseen la forma típica claviforme, pues existe una gran variedad de formas, además se diferencian en fragmobasidios aquellos que están divididos en cuatro septos, y holobasidios aquellos que son unicelulares (Deacon, 2006).

La basidiospora es una estructura uninuclear haploide ($n+n$) que en raras ocasiones llega a ser binucleada, su forma y ornamentación son un importante carácter taxonómico al momento de diferenciar especies de basidiomicetos, esto debido a su gran diversidad.

La basidiospora está unida al basidio por el esterigma de forma oblicua (Figura 14) y de manera cercana a éste se presenta un pequeño abultamiento conocido como apéndice hilar, el cual es una pequeña gota o burbuja de líquido que se forma en esta zona al madurar la espore, así cuando ésta explota, la espore se libera del basidio al ambiente (Menéndez y Oliveros, 2004).

1.6.2.2. Fibulación

Existe un mecanismo para que el micelio dicariótico al desarrollarse se divida conjuntamente y se formen dos células hijas con el mismo material genético de ambos núcleos, dicho mecanismo se conoce como fibulación (Figura 10). En este proceso, cuando la célula binucleada está a punto de dividirse, aparece una prolongación corta (denominada fíbula) entre los núcleos, que adquiere aspecto de gancho oblicuo; un núcleo hijo se forma dentro de la fíbula por mitosis, mientras que la otra división se lleva a cabo a lo largo de la célula en división; en este punto la fíbula se ha curvado tanto que su extremo libre toca la célula, formando un puente a través del cual el núcleo que tenía, pasa al otro extremo de la célula; se forma entonces un septo que cierra la fíbula en su punto de origen y otro septo que divide la célula progenitora en dos hijas, cada una con dos núcleos (Bold *et al.* 1987; Menéndez y Oliveros, 2004).

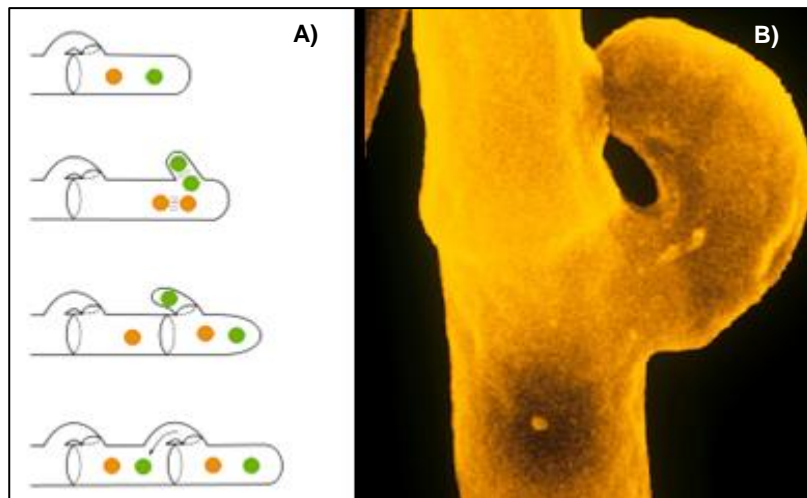


Figura 10. Proceso de fibulación. A) Etapas de la fibulación: formación de la fíbula, división mitótica de núcleos, separación de núcleos hijos, migración de núcleos hijos a la célula terminal, y formación de septo en la base de la fíbula. B) Microfotografía que muestra la formación de una fíbula (Bold *et al.* 1987; Flegler, 2011).

1.6.3. Ciclo de vida

Durante la reproducción sexual, el ciclo de vida de un basidiomiceto (Figura 11) comienza con la germinación de una basidiospora y la consecutiva formación del micelio monocariótico, esta fase del ciclo es de corta duración, pues estos micelios se buscan entre sí y fusionan su citoplasma (plasmogamia), dando lugar al micelio secundario, el cual crece y se multiplica a través de la fibulación por el proceso de mitosis.

Cuando las condiciones ambientales son apropiadas, este micelio experimenta cambios morfogenéticos que inician la formación del basidioma. Éste posee células estériles y fértiles, en éstas últimas llamadas basidios, los dos núcleos haploides experimentan cariogamia ($2n$) y se forma un nuevo núcleo diploide, en estos momentos el basidio es conocido como probasidio; al entrar el núcleo en meiosis y originar cuatro núcleos hijos haploides se conoce como metabasidio. En la superficie del metabasidio se desarrollan cuatro prolongaciones citoplasmáticas externas denominadas esterigmas, en cuyos respectivos ápices se formarán las basidiosporas.

El ápice de los esterigmas es de pared delgada y se dilata formando una estructura globosa en la que sucede la deposición continua de capas en su pared, la cual se va engrosando paulatinamente. Estas estructuras globosas son células iniciales de las basidiosporas y están llenas de vesículas al principio, pero luego forman mitocondrias y otros organelos. Entonces sucede la migración de los núcleos haploides a cada uno de los esterigmas. Al final, el citoplasma del esterigma y el de la basidiospora se separan mediante la formación de un tapón en su punto de unión, lugar donde se desarrolla el apéndice hilar.

La reproducción sexual finaliza con la producción y liberación de las basidiosporas (Alexopoulos *et al.* 1996; Deacon, 2006).

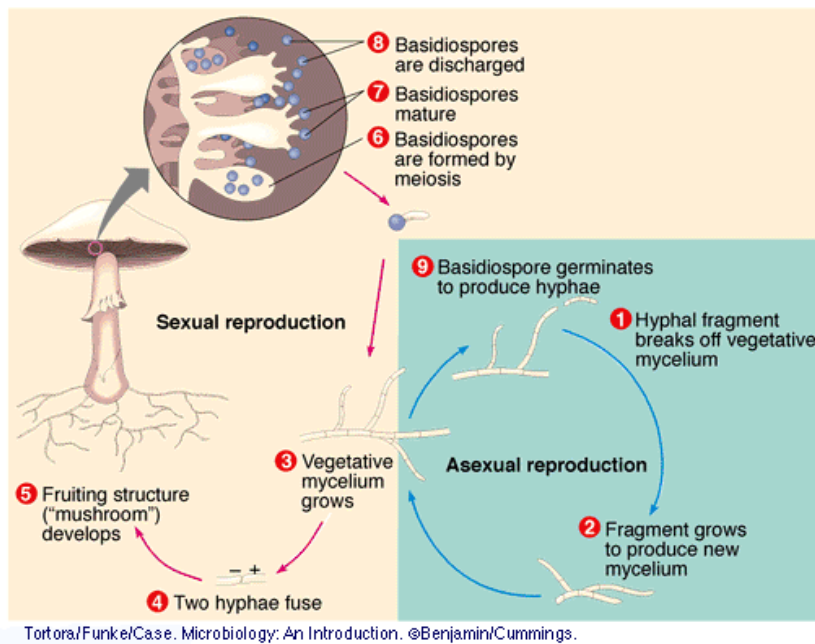


Figura 11. Ciclo de vida de los basidiomicetos (Modificado de Deacon, 2006).

1.6.4. Fisiología y metabolismo

Los basidiomicetos son hongos heterotróficos, es decir, que no pueden fabricar su propio alimento y dependen de la materia orgánica de otro organismo para su supervivencia. Son saprófitos dado que tienen la capacidad de convertir la materia orgánica de organismos muertos en los nutrientes esenciales necesarios para su crecimiento y los adquieren por mecanismos de absorción.

La pared hifal es una estructura rígida compuesta esencialmente por quitina y glucanos con uniones β -1,3 y β -1,6. Las cadenas de quitina están unidas por puentes de hidrógeno en microfibrillas microcristalinas. Los enlaces por puente de hidrógeno también están presentes entre las uniones β -1,3 de las cadenas de glucanos. Asimismo, existen enlaces covalentes entre las cadenas de quitina y de β -glucano, resultando una fuerte matriz de β -glucanos compuesta por microfibrillas de quitina entrelazadas. También hay polisacáridos y proteínas presentes, pero se cree que el complejo quitina- β -glucano es responsable de la resistencia mecánica de la pared celular.

La pared celular rígida mantiene la forma tubular de la hifa, mientras que la absorción osmótica del agua genera una presión hidrostática (turgencia). Esto proporciona la fuerza mecánica para que la hifa penetre en materiales (semi-) sólidos. Al mismo tiempo, para que la hifa crezca, la pared de la zona apical debe ser menos rígida y flexible, ya que es aquí en donde la mayoría de los polímeros de la pared se sintetizan (quitina y β -glucano a partir de enzimas en la membrana

plasmática) y posteriormente son depositados longitudinalmente en el resto de la pared hifal (Farkaš, 1990; Bohn y BeMiller, 1995).

Debido a la presencia de esta pared, para que los hongos asimilen moléculas poliméricas para su nutrición primero deben degradarlas externamente en pequeñas moléculas, las cuales pueden pasar a través la pared y ser transportadas por la membrana plasmática. Para ello, las hifas segregan grandes cantidades de enzimas extracelulares en su entorno. La mayoría son sintetizadas por los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso llegando a las vesículas que convergen en el citoplasma apical donde se fusionan con la membrana plasmática y son liberadas en la pared que se está formando (Figura 12). En consecuencia, los hongos filamentosos tienen una enorme capacidad para secretar proteínas y, por lo tanto, se utiliza a menudo para la producción industrial de enzimas (Schüren, 2002).

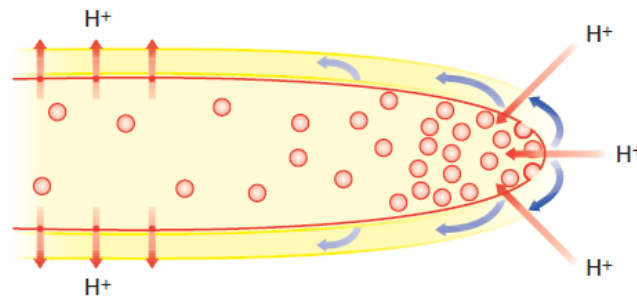


Figura 12. Hifa fúngica como túnel de transporte. En el ápice los componentes de la pared son llevados a la pared apical flexible y se entrecruzan gradualmente (aumento en la intensidad del color amarillo) para conformar la pared madura y rígida. Las proteínas son llevadas en vesículas (rojo) que se acumulan en la pared apical y se transportan a través del flujo de componentes de la pared flexible (flechas azules). Pequeños metabolitos generados durante la degradación se absorben por la hifa en la membrana plasmática (flechas rojas) y se utilizan para generar energía y biomasa (Wessels 2005).

La absorción de monómeros (liberados a partir de polímeros) presentes en el medio extracelular está mediada por proteínas transportadoras específicas (permeasas o transportadores) en la membrana plasmática. Por ejemplo, los polisacáridos (convertidos en glucosa) absorbidos se introducen en la vía de Embden Meyerhof y en el ciclo de las pentosas fosfato para generar NADH y ATP. En los hongos aerobios, el piruvato se oxida en las mitocondrias a CO₂ y agua a través del ciclo del ácido tricarbóxico (CAT) y la cadena respiratoria transportadora de electrones (donde se forma la mayor parte de ATP) (Boisnard *et al.* 2004).

Mientras todos los nutrientes están presentes en el medio en cantidades adecuadas y sean asimilados convenientemente, la biomasa fúngica aumenta, lo que se conoce como metabolismo primario o trofofase. Durante esta fase se sintetizan en abundancia metabolitos (primarios) esenciales para el crecimiento, que incluyen proteínas (además de enzimas y hormonas), aminoácidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, lípidos, alcohol y ácidos orgánicos. Estos metabolitos primarios son asociados con el inicio de la fase de rápido crecimiento (fase de crecimiento exponencial) y su máxima producción se observa cerca del final de esta fase. Sin embargo, una vez que el hongo ha entrado a la siguiente fase de crecimiento (fase estacionaria), estos metabolitos pueden ser metabolizados adicionalmente. Económicamente hablando, los metabolitos primarios son fácilmente explotados, así como las rutas bioquímicas involucradas en su producción (Wessels, 2005).

Cuando alguno de los nutrientes escasea, los carbohidratos pueden ser transformados en sustancias de reserva, como glucógeno y lípidos, lo que se conoce como período de metabolismo secundario o idiofase. En estas condiciones, una especie o cepa fúngica dada sintetiza metabolitos secundarios específicos, los cuales no son esenciales para el crecimiento vegetativo, de hecho, puede tener poca o ninguna función principal dentro el organismo. Los metabolitos secundarios son producidos cuando el organismo entra a la fase estacionaria y/o para su supervivencia en ambientes estresantes, como antibióticos o micotoxinas (Turner y Aldridge, 1983) entre otros. Estos metabolitos a menudo son asociados con la diferenciación y la esporulación y pueden tener una profunda actividad biológica, la cual en algunos casos ha sido explotada económicamente. Su presencia tiende a estar restringida a un pequeño número de organismos y puede variar entre cepas de la misma especie.

1.6.5. Sistema enzimático

Los basidiomicetos poseen dos tipos de sistema enzimático: el sistema hidrolítico que produce hidrolasas, tales como las pectinasas (Xavier-Santos *et al.* 2004), proteasas (Fermor y Wood, 1981), xilanasas (Blanchette *et al.* 1989) esterases y celulasas (Hwang *et al.* 2008; Goyal y Soni, 2011; Hwang *et al.* 2012), las cuales son responsables de la degradación de los polisacáridos. Además de un sistema ligninolítico exclusivamente oxidativo, constituido principalmente por lignin peroxidasas (LiP) (EC 1.11.1.14), manganeso peroxidasas (MnP) (EC 1.11.1.13), lacasas (EC 1.10.3.2) y oxidasas formadoras de peróxido de hidrógeno. Este sistema degrada la lignina y abre sus anillos fenólicos (Sánchez, 2009). Estas enzimas ligninolíticas son producidas por estos

hongos durante el metabolismo secundario, ya que la oxidación de la lignina no proporciona ningún tipo de energía neta para el hongo. La síntesis y secreción de estas enzimas son a menudo inducidas por niveles limitados de nutrientes (en su mayoría C y N).

Algunos hongos comestibles producen varias enzimas implicadas en la degradación, incluyendo enzimas ligninolíticas, esta producción varía de acuerdo con la cepa fúngica, las condiciones de cultivo y otros factores (Tari *et al.* 2007).

1.6.5.1. Lacasas

Las lacasas (bencenodiol: oxígeno oxidoreductasa o *p*-difenoil: dioxígeno oxidoreductasa EC 1.10.3.2) son glicoproteínas que representan una familia de polifenol oxidasas que contienen cobre, usualmente son llamadas oxidasas multicobre (Figura 13) con la capacidad redox de iones de cobre para catalizar la oxidación de un amplio rango de sustratos aromáticos y al mismo tiempo la reducción del oxígeno molecular en agua (Giardina *et al.* 2010). Generalmente presentan un peso molecular de entre 60 y 390 kDa (Wesenberg *et al.* 2003) y contienen cuatro átomos de cobre, sin embargo, también son conocidas enzimas con uno, dos y tres átomos de cobre (Thurston, 1994; Palmieri, *et al.* 1997).

Del grupo de los basidiomicetos se ha reportado que hongos comestibles tales como *Lentinula edodes* (Kofujita *et al.* 1991; Nagai *et al.* 2003), *Pleurotus ostreatus* (Palmieri *et al.* 1993; 1997; Giardina *et al.* 1999; Hublik y Schiner 2000; Palmieri *et al.* 2003;) y *P. pulmonarius* (De Souza y Peralta, 2003) son buenos productores de lacasas (Baldrian, 2004). La mayoría de lacasas fúngicas son proteínas globulares monoméricas extracelulares de aproximadamente 60–70 kDa, aunque algunas de ellas presentes en basidiomicetos son producidas tanto extra como intracelularmente (Arora y Sharma, 2010). Tienen un punto isoeléctrico (*pI*) de pH alrededor de 4.0 y un rango de glicosilación entre 10 y 25 %. Varias exhiben una estructura homodimérica, en donde la enzima está compuesta por dos subunidades idénticas con un peso molecular típico de las lacasas monoméricas (De Souza y Peralta, 2003; Shleev *et al.* 2004). En hongos, llevan a cabo una gran variedad de funciones fisiológicas, incluyendo morfogénesis interacción hospedero (planta)/patógeno (hongo), defensa del estrés y degradación de lignina (Gianfreda *et al.* 1999).

Presentan actividad sobre una amplia gama de sustratos que varían dependiendo de una u otra. A pesar de saber que son difenol oxidasas, los monofenoles como el 2,6-dimetoxifenol (DMP) o el guayacol son mejores sustratos que los fenoles (tales como el catecol o hidroquinonas) (Baldrian, 2004). Así, las lacasas que se encuentran dentro de la categoría de oxidasas pueden oxidar *o*- o *p*-

difenoles, aminofenoles, polifenoles, poliaminas, aril diaminas, diaminas aromáticas, iones inorgánicos y un amplio rango de otros compuestos (Giardina *et al*, 2010). Sin embargo, no todos sus sustratos pueden ser oxidados directamente por estas enzimas, ya sea por su gran tamaño y estructura que restringen su penetración en el sitio activo de la enzima, o debido a su elevado potencial redox (Riva, 2006).

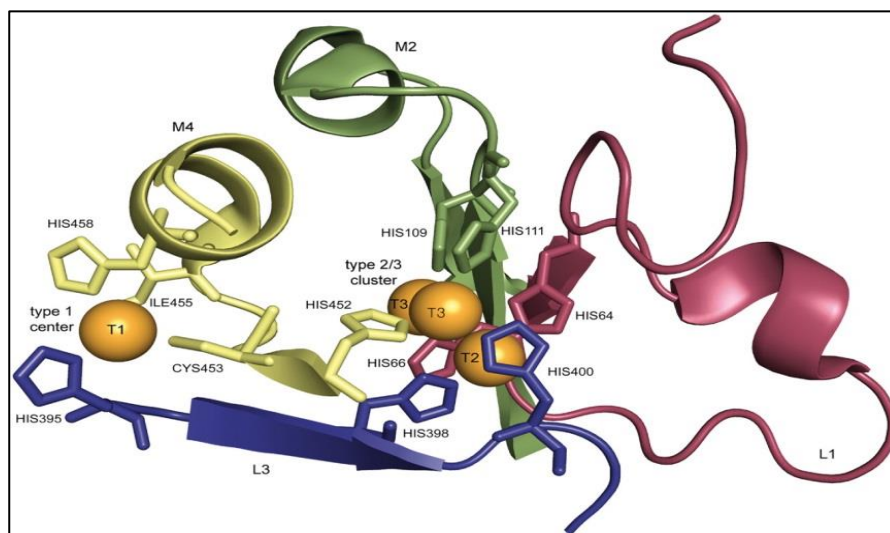


Figura 13. Estructura tridimensional de una lacasa de *Trametes versicolor*, conformada por el clúster catalítico con cuatro átomos de cobre (en color naranja) y cuatro dominios: L1 (violeta), L3 (azul), M2 (verde) y M4 (amarillo) con estructuras β -plegadas (Sirim *et al*. 2011).

Las lacasas catalizan la oxidación monolectrónica de las moléculas sustrato a sus respectivos radicales reactivos con la ayuda de cuatro átomos de cobre que forman el núcleo catalítico de la enzima (Figura 14). El paso inicial en el mecanismo catalítico oxidativo de la lacasa implica una donación de electrones a un sitio específico de Cu^{2+} con la formación de productos de radicales libres de sustancias orgánicas, posteriormente el estado cuproso se oxida pasando al estado cúprico por el oxígeno molecular (Bourbonnais y Paice, 1990; Shleev *et al*. 2004). Sin embargo, las lacasas no oxidan únicamente ácidos fenólicos y metoxifenólicos, también los descarboxilan y atacan sus grupos metoxi (desmetilación) (Yaropolov *et al*. 1994; Gianfreda *et al*. 1999).

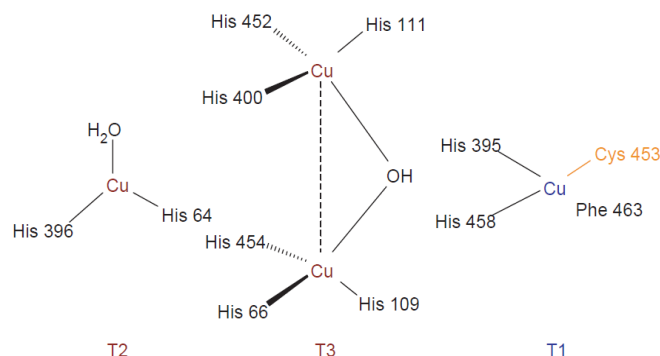


Figura 14. Clúster catalítico de lacasa de *Trametes versicolor* conformado por cuatro átomos de carbono. El centro de cobre tipo 1 (T1) confiere el típico color azul de la proteína y es el sitio donde tiene lugar la oxidación del sustrato. El centro de cobre tipo 2 (T2) y tipo 3 (T3) forman un clúster de cobre trinuclear donde se lleva a cabo la reducción de oxígeno molecular y la liberación de agua (Piontek *et al.* 2002).

La expresión de lacasas se ha encontrado asociada con la represión catabólica. Elevados niveles de glucosa y sucrosa reducen su producción obstruyendo la iniciación (Lee *et al.* 2004) e inhibiendo la transcripción (Mansur *et al.* 1997).

La temperatura óptima de lacasas difiere ampliamente de una cepa a otra. Se ha reportado que 25 °C es la temperatura óptima en presencia de luz, pero de 30 °C en oscuridad (Thurston, 1994). Su rango óptimo oscila entre 25 y 30 °C (Pointing *et al.* 2000). Lacasas de *P. ostreatus* son casi completamente activas en un rango de temperatura de 40 a 60 °C, presentando su mayor actividad a 50 °C (Palmieri *et al.* 1993).

El pH óptimo varía de acuerdo con el sustrato, ya que sustratos disímiles reaccionan de manera diferente con las lacasas. Cuando el hongo crece en medios con pH de 5.0, las lacasas son producidas en exceso, pero muchos estudios muestran que un pH entre 4.5 y 6.0 es adecuado para su producción (Thurston, 1994; Murugesan *et al.* 2006).

La agitación es otro factor que afecta la producción de estas enzimas. Estudios han encontrado que el micelio de *Trametes multicolour* es dañado cuando el hongo es crecido en un reactor de tanque agitado y la producción de lacasas es disminuida considerablemente (Mohorčič *et al.* 2004)

Hasta el momento, cientos de lacasas han sido purificadas a partir de hongos pero muy pocas han sido caracterizadas. Las lacasas purificadas exhiben una apariencia azul característica debido a la intensa absorción electrónica de los enlaces Cu-Cu del núcleo catalítico alrededor de los 600 nm (debido al cobre tipo 1) y 320 nm (debido al cobre tipo 3) y catalizan oxidaciones electrónicas de varios compuestos fenólicos, tales como el catecol, la hidroquinona, el DMP y la siringaldacina

con un potencial redox por encima de 0.8 V; también son capaces de catalizar una amplia variedad de reacciones, tales como la demetoxilación, demetilación, polimerización, despolimerización, ruptura de alquilo-fenilos y rompimiento de enlaces C α -C β y dímeros fenólicos de lignina (Kirk *et al.* 1978; Higuchi, 1990; Kersten *et al.* 1990; Milstein *et al.* 1994).

La actividad de lacasas puede ser cuantificada por diferentes métodos, tales como el método de Guayacol (*o*-metoxi fenol), el método ABTS, el método de la siringaldacina y el método por DMP, el cual fue usado por primera vez por Paszcynski *et al.* (1985); en este método 1mL de mezcla de reacción contenía DMP 2mM en buffer de tartrato de sodio (200 mM, pH 5.0) y 0.25mL de extracto de cultivo y la absorbancia fue leída a 468 nm (Saparrat *et al.* 2002).

La producción de estas enzimas puede verse inhibida por pequeños aniones tales como los haluros (excepto el yoduro), la azida de cianuro y el hidróxido que al unirse al cobre tipo 2 y 3 (Figura 8) resulta en una interrupción de transferencia interna e inhibición de la actividad. Otros inhibidores incluyen iones metálicos (como el Mg²⁺, Ca²⁺, Sn²⁺, Ba²⁺, Co²⁺, Cd²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺), ácidos grasos, grupos sulfhidrilo, hidroxiglicina, ácido kojico, ácido etilenodiaminotetraacético, L-cisteína, glutatión y detergentes de amonio cuaternarios entre otros (Baldrian, 2004; Morozova *et al.* 2007). Estas enzimas fúngicas desempeñan variadas funciones en la naturaleza, pues tienen un papel importante en la morfogénesis del hongo que las produce, son responsables de la detoxificación de algunos compuestos en determinadas especies arbóreas y participan activamente en la degradación de la lignina (Arora y Sharma, 2010). Además, pueden oxidar, polimerizar y romper una gran variedad de compuestos tanto fenólicos como no fenólicos, sintéticos y biológicos; dichas características las convierten en valiosas herramientas en el área de la biotecnología, en biorremediación de efluentes residuales, tintes industriales, pesticidas y otros polímeros; la deslignificación de compuestos lignocelulósicos, en la industria del papel en los procedimientos de biopulpeo y bioblanqueo, remoción de fenoles en mosto y vino, desulfuración de combustibles fósiles, biosolubilización del carbón, degradación de herbicidas, tratamiento de alimentos, aplicaciones médicas y aplicaciones inmunoquímicas y biosensores (Arora y Sharma, 2010).

1.6.5.2. Esterasas

Las esterazas son enzimas que pertenecen a la clase de las hidrolasas, catalizando la ruptura y formación de enlaces éster. Pueden catalizar tres tipos de reacción: esterificación, interesterificación y transesterificación (Bhardwaj *et al.* 2012).

Estas enzimas están ampliamente distribuidas en plantas, animales y microorganismos, muchos de los cuales muestran una amplia tolerancia de sustrato, que ha conducido a la hipótesis de que los organismos que las producen han evolucionado para permitirse tener acceso a más fuentes de carbono o participar en otras rutas catabólicas. También muestran regiones de alta estereoespecificidad, lo que las hace atractivos biocatalizadores para la producción de compuestos ópticamente. El interés en estas enzimas también reside en el hecho de que no requieren cofactores, son generalmente bastante estables y son aún activo en disolventes orgánicos (Bornscheuer y Kazlauskas, 1999; Patel, 2000; Bornscheuer, 2002; Godinho *et al* 2011).

De acuerdo con el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, las esterasas reciben el número de clasificación E.C 3.1.1.x, donde x depende del sustrato. Este número las identifica como hidrolasas que actúan sobre enlaces éster que se subdividen en distintos grupos. Entre ellos se encuentran: a) las carboxilesterasas o “verdaderas” esterasas (EC 3.1.1.1), las cuales actúan sobre ésteres carboxílicos de cadenas acilo cortas (menor a 10 carbonos) liberando los ácidos correspondientes, b) las lipasas (EC 3.1.1.3), que catalizan la hidrólisis de ésteres de glicerol con una cadena acilo igual o superior a 10 átomos de carbono (insolubles en agua) a ácidos grasos, diglicéridos, monoglicéridos y glicerol y c) las esteroles esterasas (EC 3.1.1.13), que hidrolizan ésteres de esteroides liberando esteroides y ácidos grasos (NC-IUBMB, 1992; Jaeger *et al.* 1999).

Las dos clases principales son las lipasas y las carboxil esterasas. La estructura tridimensional de ambas enzimas muestran la conformación característica con el plegamiento α/β hidrolasa (Figura 15), que consiste, generalmente, en una lámina β constituida por 8 hebras, siete son paralelas y sólo la segunda es antiparalela, dicha lámina se encuentra rodeada a ambos lados por hélices α . La estructura secundaria se une entre sí a través de loops (Ollis *et al.* 1992; Schrag y Cygler, 1997; Nardini y Dijkstra, 1999).

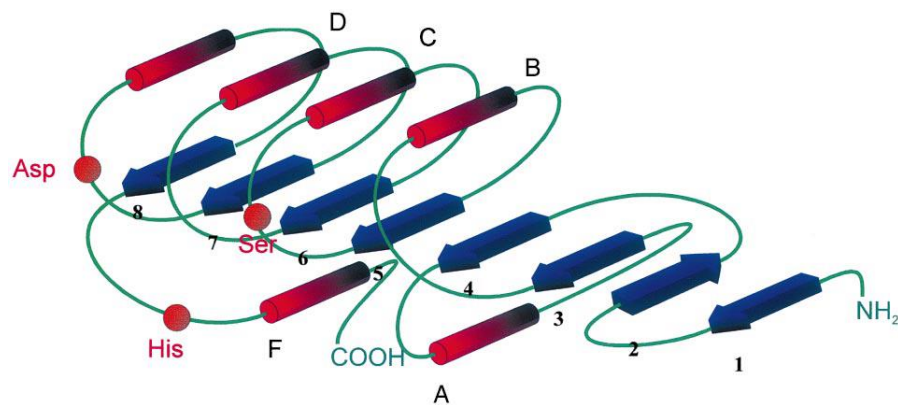


Figura 15. Representación esquemática del plegamiento α/β hidrolasa. Las hebras β (1–8) se muestran como flechas azules y las hélices α (A–F) como cilindros rojos. Las posiciones relativas de los aminoácidos de la triada catalítica se indican con tres círculos anaranjados (Bornscheuer, 2002).

Generalmente, la lámina β presenta un giro helicoidal levógiro, provocando que la primera y última hebra se crucen de manera casi perpendicular. En algunos casos, una o más de estas hebras pueden estar ausentes; solamente la hélice αC parece estar conservada, pues ocupa una posición estratégica en el centro de la lámina β , jugando un papel importante en el correcto posicionamiento del residuo nucleofílico del centro activo (Schrag y Cygler, 1997; Nardini y Dijkstra, 1999). Normalmente la primera y última hélice se empaquetan a un lado de la lámina central, mientras que el resto lo hacen al lado opuesto (Holmquist, 2000). El grado de curvatura de la lámina central está determinado por el ángulo establecido entre las hebras $\beta 5$ y $\beta 6$ (Ollis *et al.* 1992), lo que ocasiona que en la lámina central se distinga un lado cóncavo y otro convexo. Aunque ambos poseen un fuerte carácter hidrofóbico y están protegidos del solvente por la presencia de las hélices α , los residuos alifáticos y aromáticos muestran preferencias en sus localizaciones en la lámina central. En la cara convexa predominan agrupaciones de aminoácidos alifáticos, mientras que en la cara cóncava abundan residuos aromáticos (Cygler *et al.* 1993).

La triada catalítica de estas enzimas está conformada por los aminoácidos serina (Ser), histidina (His) y ácido aspártico (Asp) (Wei *et al.* 1995; Pleiss *et al.* 2000). En general, la triada catalítica contiene al Asp como residuo activo, sin embargo, en algunas lipasas, éste se encuentra reemplazado por ácido glutámico (Glu) (Schrag *et al.* 1991; Bourne *et al.* 2004). La estabilización del estado de transición tetraédrico generado en el transcurso de la reacción es llevado a cabo por un “agujero oxaniónico” (Kraut, 1977). En éste se establecen puentes de hidrógeno entre el átomo cargado negativamente del sustrato y determinados grupos NH de residuos proteicos (Cygler y Schrag, 1997).

El codo nucleófilo consiste en una estructura secundaria en la que se localiza la Ser catalítica. Este elemento, localizado entre la hebra $\beta 5$ y hélice αC (Matthews, 1972), se identifica por la secuencia consenso Gly-X-Ser-X-Gly (Brenner, 1988). Además, su geometría contribuye a la formación del agujero oxaniónico, por lo que podría tener un papel en la estabilización del intermediario tetraédrico durante la reacción (Hol *et al.* 1978).

La estructura tridimensional α/β hidrolasa está muy bien conservada y confiere un ambiente estable para la triada catalítica, residiendo la especificidad de sustrato en los loops próximos al centro activo (Cygler *et al.* 1993). La estructura es mantenida gracias a la existencia de puentes salinos y disulfuro. Los primeros juegan un papel importante en el plegamiento de la esterasa, manteniendo juntos los loops próximos al centro activo. Los puentes disulfuro en la región N-terminal son importantes en el mantenimiento de la conformación de dos loops, estando uno de ellos claramente implicado en la unión al sustrato (Harel *et al.* 1993).

Debido al incremento en el número de miembros tan diversos de la familia α/β hidrolasa, no es posible determinar una estructura común para todos. Sin embargo, se establecen cuatro características esenciales para pertenecer a esta familia: a) el orden de la triada catalítica debe ser nucleófilo-ácido-His, con el nucleófilo ubicado detrás de la hebra $\beta 5$, b) la presencia del codo nucleófilo ($\beta 5$), c) la estructura debe comenzar en la lámina $\beta 3$ y poseer al menos 5 hebras β paralelas y d) la existencia de un largo loop al final de la hebra $\beta 7$ que permita que las cadenas laterales de los residuos catalíticos establezcan puentes de hidrógeno (Heikinheimo *et al.* 1999).

La diferenciación entre los tres grupos de enzimas ya mencionados que integran parte de las esterases es complicada, pues los datos publicados sobre su especificidad de sustrato han sido contradictorios. Por ejemplo, tenemos la lipasa producida por *F. oxysporum* que puede hidrolizar oleato de colesterilo, sustrato de esteroles esterases, pero no es capaz de hidrolizar palmitato de *p*-nitrofenilo (*p*NPP), sustrato típico de lipasas (Madhosingh y Orr, 1981).

Estas enzimas muestran bajas velocidades de catálisis frente a sustratos solubles, pero su actividad hidrolítica sufre un brusco incremento cuando la concentración de sustrato excede su concentración micelar crítica (Chahinian *et al.* 2002). Uno de los factores que acelera esta activación es el desplazamiento de un elemento helicoidal denominado “tapadera” (lid o flap). La tapadera consiste en un bucle peptídico anfófilo que bloquea el sitio catalítico de la enzima en su estado inactivado (conformación cerrada) y es desplazado, en diferente extensión, durante el proceso de activación interfacial, permitiendo así la entrada del sustrato lipídico al centro activo

(conformación abierta). La apertura de la tapadera consiste en la rotación del loop alrededor de sus regiones bisagra (Pernas *et al.* 2001) y es estabilizada mediante puentes de hidrógeno y contactos polares establecidos con el esqueleto de la proteína (Holmquist, 2000). En solución, sólo una pequeña parte de las moléculas de enzima se encuentran en la forma abierta en ausencia de la interfase lipídica. Esto es debido al ambiente desfavorable que representa un medio acuoso para la exposición de un centro activo hidrofóbico. Esta pequeña fracción explicaría la actividad de las enzimas sobre sustratos solubles en agua. En presencia de la fase lipídica, las moléculas de la enzima pasan de la conformación cerrada a la abierta para comenzar el proceso hidrolítico (Holmquist, 2000). Sin embargo, factores como la presencia de co-solventes, modificaciones del pH del medio y/o variaciones en la constante dieléctrica del centro activo, podrían jugar un papel importante en la apertura de la tapadera y en consecuencia, en la actividad enzimática (Domínguez de María *et al.* 2006).

El mecanismo catalítico descrito para las esterasas se muestra en la figura 16. En un principio el sustrato se une a la superficie de la enzima, esta unión es muy específica, pues éste debe acoplarse perfectamente al sitio de unión, en cuya entrada se localiza la triada catalítica. Este sitio de unión define la posición del corte y la estereoespecificidad de las esterasas. De esta manera, la Ser activa (primer residuo de la triada catalítica) se sitúa próxima al grupo carbonilo del enlace a romper. Los residuos de Ser no suelen ser reactivos, pero éste se encuentra en un entorno poco habitual, ya que está muy próximo a una His (segundo residuo de la triada catalítica). El protón de la Ser se transfiere al anillo de la His, dejando en la Ser una carga negativa. Esta transferencia sería imposible debido a los pKa elevados de los grupos alcohol (-OH), pero parece facilitarse por un residuo ácido (tercer residuo de la triada catalítica) que, por su carga negativa estabiliza la protonación del anillo de His adyacente. La Ser activada es un fuerte nucleófilo y puede atacar al carbonilo del sustrato. La ruptura del enlace éster se produce en este estado activado, dando un intermediario acilo-enzima. El grupo -OH liberado extrae el protón de la His (que originalmente era el protón de la Ser). El intermediario acilo-enzima es hidrolizado por una molécula de agua, ésta se coloca entre el grupo acilo y la His y le transfiere un protón. El grupo -OH restante se une al intermediario acilo para formar un nuevo estado de transición. Por último, el protón se transfiere nuevamente de la His a la Ser y se rompe el intermediario acilo-enzima, liberando así el componente acilo. La enzima vuelve a su estado original y está preparada para catalizar la hidrólisis de otra molécula de sustrato (Bornscheuer y Kazlauskas, 1999; Jaeger *et al.* 1999).

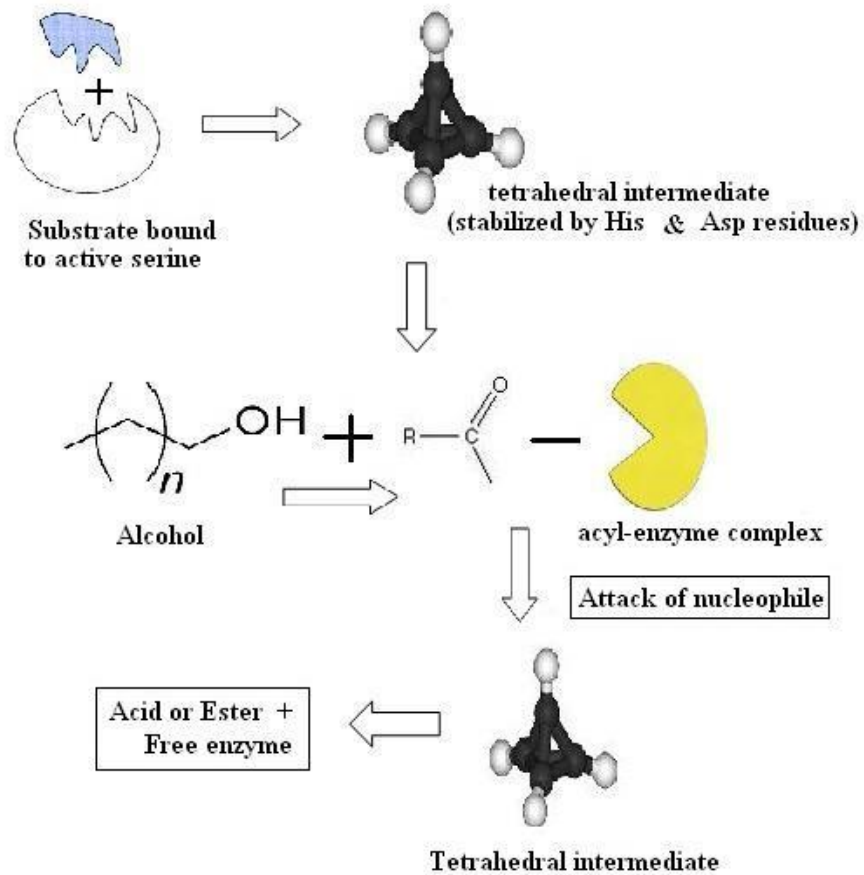


Figura 16. Diagrama representativo del mecanismo de acción de la catálisis de las esterasas (Kulkarni *et al.* 2013).

Para determinar la ubicación de la enzima microbiana (extracelular, intracelular o unida a la membrana) se pueden preparar tres fracciones celulares. La fracción extracelular se obtiene a partir de la centrifugación del sobrenadante del medio de cultivo. La fracción intracelular se consigue a partir de la centrifugación de la biomasa en forma de pellets, los cuales se resuspenden en el medio de cultivo y se lisan utilizando medios mecánicos o químicos. Al resuspender aún más los pellets en el medio de cultivo se determina la fracción unida a la membrana. Posteriormente, la actividad enzimática de cada fracción es estimada. La mayor actividad indica la localización de la enzima (Kulkarni *et al.* 2013).

La actividad enzimática de las esterasas se puede ver afectada por cambios en el pH. Se ha reportado un intervalo de pH óptimo 6.0 a 8.0 en esterasas microbianas, siendo el pH de 8.0 en donde se ha presentado la actividad máxima de estas enzimas (Fojan *et al.* 2000). Del mismo

modo, la temperatura afecta los niveles de actividad de esta enzima, para la cual se ha determinado un rango óptimo de actividad que va desde la temperatura ambiente hasta 40 °C y su almacenamiento se tiene que dar por debajo de 4 °C.

El método más comúnmente utilizado para el análisis de esterasas es el uso de ésteres de *p*-nitrofenol (acetato de *p*-nitrofenilo o butirato de *p*-nitrofenilo). La mezcla de reacción debe contener buffer de fosfato de sodio, éster de *p*-NP, agua destilada y la enzima. Se incuba durante 30 minutos a 30 °C para posteriormente leer la absorbancia a 400 nm. Una unidad de actividad esterasa se define como la cantidad de enzima que produce 1 μmol de *p*-nitrofenol por minuto a 30 °C (Faiz et al., 2007; Higerd, 1977; Meghji et al., 1990). Los diversos inhibidores de la actividad de esterasas incluyen diisopropil-fosfofluorido, fluoruro de fenilmetilsulfonilo, iones divalentes como el Fe³⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, Co²⁺, Ca²⁺ y Ag²⁺ (Bannerman *et al.* 1976;. Degrassi *et al.* 1998). Los iones metálicos contribuyen al mantenimiento de la estabilidad y estructura activa de la enzima mediante la unión a los residuos de aminoácidos con carga negativa en sitios específicos (Faiz *et al.* 2007).

Dentro del grupo de las esterasas, las que poseen mayor aplicación industrial son las lipasas. Estas enzimas se consideran los biocatalizadores más versátiles que existen. Pueden llevar a cabo un amplio espectro de reacciones de bioconversión tales como hidrólisis, interesterificación, esterificación, alcoholólisis, acidólisis y aminólisis (Pandey *et al.* 1999). De ahí, el incremento exponencial de sus aplicaciones en biotecnología en comparación con otras enzimas hidrolíticas. El gran potencial biológico de algunas esterasas es explicado por los siguientes hechos: a) por lo general son bastante estables y se mantienen activas aún en solventes orgánicos, b) no requieren cofactores, c) presentan amplia especificidad de sustrato y d) en algunos casos, elevada enantioselectividad (Jaeger y Reetz, 1998)

El estudio de las enzimas hidrolíticas que evolucionaron para degradar polímeros de naturaleza altamente estable (como la celulosa, quitina y cutina) puede contribuir al conocimiento acerca de la degradación de los polímeros naturales y sintéticos (Pio y Macedo, 2009) dado que algunos de los usos potenciales de estas enzimas como las esterasas incluyen aplicaciones en la degradación de algunos plastificantes (Niazi *et al.* 2001; Hwang *et al.* 2012).

1.6.6. *Lentinula edodes*

Comúnmente conocido como Shiitake, *Lentinula edodes* es un basidiomiceto originario de China, Japón y Corea (Andrade, 2002), pertenece a la clase Agaromycetes, al orden de los Agaricales y a la familia Marasmiaceae (Pegler, 1976). Es el tercer hongo más cultivado a nivel mundial para consumo ya que constituye un alimento tradicional, exquisito, nutritivo, con un aroma seductor y compuestos que favorecen la mejora del sistema inmunitario (Aminuddin *et al.* 2007).

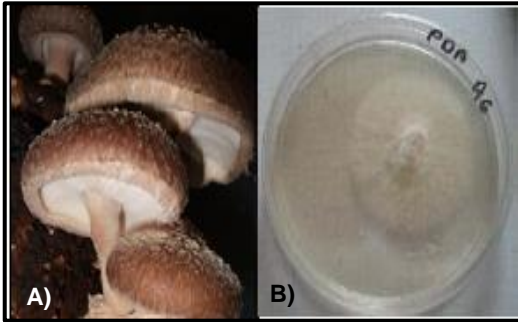


Figura 17. A) Cuerpo fructífero y B) desarrollo micelial sobre agar dextrosa papa (PDA) de *Lentinula edodes* (Midori, 2005; Cudris, 2011).

En 1878 el botánico inglés Miles Joseph Berkeley propuso el nombre *Agaricus edodes* para su clasificación, de ahí en adelante la especie fue asignada a diversos géneros entre ellos *Collybia*, *Armillaria*, *Lepiota*, *Pleurotus* y *Lentinus* (esta última dada por Singer). En 1978 Pegler lo denominó como *Lentinula edodes* por las diferencias microscópicas que existían con respecto a *Lentinus* (Solomon, 2005).

El nombre común de este hongo deriva del japonés “Shii” del árbol *Castanopsis cuspidata* que provee los troncos muertos en donde se cultiva, y “take” que significa hongo; algunos de sus sinónimos son: hongo negro chino, hongo negro del bosque, hongo negro, seta de roble oro o seta de madera de roble (Stamets, 2000). Presenta una fase vegetativa y una reproductiva. Su micelio presenta un crecimiento lento sobre el sustrato del que se alimenta y forma colonias de color blanco con una textura algodonosa (figura. 17B). Sin embargo, con el tiempo secreta sustancias protectoras de color marrón. Su cuerpo fructífero se caracteriza por presentar un píleo hemisférico que se va aplanando al madurar, cuyo diámetro es de 5 a 25 cm y se va tornando color café a medida que se desarrolla, para finalmente estar sostenido por un tallo fibroso (figura. 17A).

Sus esporas son blancas de forma ovoide (Cudris, 2011). Crece sobre árboles muertos de hoja ancha, principalmente el roble, sin embargo, existe una gran variedad de materiales que pueden ser utilizados en su cultivo, entre ellos están el aserrín de eucalipto y el aserrín amarillo (Pukahuta *et al.*, 2000).

Este hongo es un organismo aerobio estricto, con una alta susceptibilidad al CO₂ (Stamets, 2000) que crece a una temperatura óptima de 25°C (con un rango de 22 a 26 °C). Se ha reportado un pH óptimo de crecimiento que oscila entre 3.0 y 4.5, obteniendo mayor producción de biomasa a 3.0-3.5 y a 4.5 se favorece la producción de metabolitos antibacterianos (Hasegawa *et al.* 2005). Su

porcentaje de humedad varía entre 50 y 60% (Pukahuta *et al.*, 2000). Se ha reportado la actividad de lacasas extra e intracelulares por este hongo para degradar diferentes biocompuestos (Nagai *et al.* 2003).

Aparte de emplearse comúnmente como alimento, *L. edodes* se ha descrito como un hongo promisorio en la industria de la biorremediación de efluentes industriales con colorantes (Nora, 2001) y en el campo de la medicina, esto debido a que presenta propiedades anticancerígenas, antioxidantes, antibacterianas, inmunomoduladoras y antivirales entre otras (Yeung y Gubui, 2008).

1.6.7. *Pleurotus ostreatus*

El género *Pleurotus* comprende un grupo de hongos comestibles ligninolíticos con propiedades medicinales e importantes aplicaciones ambientales y biotecnológicas. El cultivo de *Pleurotus* spp. es una industria alimenticia económicamente importante a nivel mundial, inició en el siglo XIX sobre troncos de árboles (Figura 18). Esta industria se ha expandido en los últimos años, llegando a ser actualmente el segundo hongo comestible más cultivado a nivel mundial (Cohen *et al.* 2002; Zanon *et al.* 2005; Sánchez, 2010).



Figura 18. Cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus* (Cisterna 2003).

Pleurotus ostreatus es un hongo que pertenece al phyla Basidiomycota, clase Agaromicetes, orden Agaricales y familia Pleurotaceae (Cohen *et al.* 2002). Este hongo fue descrito científicamente por primera vez en 1775 por el naturalista holandés Nikolaus Joseph Freiherr von Jacquin y lo nombró *Agaricus ostreatus*. Para 1871 el micólogo alemán Paul Kummer lo transfirió dentro del género *Pleurotus* (género que el mismo Kummer definió), dejándolo así con el nombre científico



Figura 19. Micelio de *Pleurotus ostreatus* (Moreno y Ospina 2008).

actualmente aceptado (Kirk *et al.* 2008). Su nombre deriva del latín *Pleurotus* que significa “al lado de la oreja” y *ostreatus* que significa “en forma de ostra”, por lo que también ha sido llamado seta ostra, orellana, hiratake, seta de chopo o pleuroto ostreado. Este hongo se encuentra distribuido a lo largo de los bosques templados y tropicales del mundo, comúnmente en zonas templadas. Se ha reportado su crecimiento sobre árboles de los géneros *Aesculus*, *Betula*, *Fagus*, *Juglans*, *Populus*, *Salix*, entre otros. (Hilber, 1997).

Pleurotus spp. es un hongo saprofito que se cultiva sobre sustratos que contienen lignina y celulosa, en la naturaleza crece sobre la madera, usualmente en troncos de árboles muertos o caídos con bajos niveles de minerales y vitaminas. (Cohen *et al.* 2002).

El micelio de este hongo tiene una apariencia de masa algodonosa aérea, generalmente blanca, el cual crece sobre el sustrato elegido para el desarrollo del hongo. Este micelio es el que se cultiva en el laboratorio sobre medios sintéticos en cajas Petri para obtener una cepa, presentando un crecimiento en forma de anillos desde el centro de la caja hacia su periferia (Figura 19) (Guzmán *et al.* 1993; Fernández y Henao 2007). El rango de temperatura óptima para su crecimiento miceliar oscila entre 21 y 26 ° C (Block *et al.* 1959; Kashangura *et al.* 2006.)

Su cuerpo fructífero (figura 15) presenta colores blancos, amarillentos, rosados y a veces grisáceos u oscuros; puede carecer o no de estípites, siendo éste corto, lateral, aterciopelado, de color blanco, con laminillas longitudinalmente decadentes sobre la base, de color blanco o marfil. Presenta un píleo carnoso, grande (8-15 cm), convexo al principio; sus esporas son de color blanco, crema o lila pálido, lisas y de forma cilíndrica (Sánchez, 1998; Milla, 2007).

Presenta dos fases de crecimiento, una vegetativa conformada por el micelio, y otra reproductiva conformada por el cuerpo fructífero, el cuál fructifica durante el otoño e invierno a temperaturas de 15 a 25°C (Sánchez, 1998; Cisterna, 2003).

Pleurotus spp. puede ser cultivado en cultivos líquidos sumergidos para la producción de proteína fúngica o como una fuente de agentes de regeneración o aromatizantes (Hadar y Cohen-Arazi, 1986).

Algunas especies del género *Pleurotus* se producen como alimento humano, representando una fuente valiosa de proteína en las comunidades rurales. Tienen gran importancia económica porque su cultivo no es complicado y es una práctica común alrededor del mundo (Chang, 1999), otras son consideradas como hongos de pudrición blanca por su capacidad para degradar sustratos con lignina, como madera, paja de arroz, paja de trigo, avena, salvado, cebada; pulpas de manzana, pera y remolacha; virutas, aserrines, papeles y cartones (Cohen *et al.* 2002; Cisterna, 2003). Además de que se ha reconocido la reciente capacidad de las enzimas que poseen algunas especies para biodegradar o crecer en presencia de contaminantes como los ftalatos, lo que ha generado considerable interés para su investigación en el área de microbiología ambiental y biorremediación (Pointing, 2001; Kim, y Song, 2004; Chai *et al.* 2008; Hwang *et al.* 2008; 2012; Córdoba-Sosa *et al.* 2014).

1.6.8. *Pleurotus pulmonarius*

Pleurotus Pulmonarius, también conocido como hongo “ostra-pulmón” es un hongo muy similar a *Pleurotus ostreatus*, con una clasificación taxonómica igual a excepción de la especie. Ambos hongos, a pesar de presentar varias similitudes también exhiben notables diferencias.



Figura 20. Cuerpo fructífero de *Pleurotus pulmonarius* (Kuo, 2009).

El píleo de *P. pulmonarius* (Figura 20) es mucho más pálido y más pequeño y desarrolla más de un estípite, este hongo prefiere el clima cálido y crece en temporadas más tardías (en verano y otoño). Por otra parte, el sabor y el cultivo de ambas especies se describen generalmente como iguales. El píleo del basidiocarpo llega a medir hasta 12.2 cm, tiene forma convexa, convirtiéndose plana o ligeramente hundida, tomando una forma pulmonar (de ahí su nombre en latín) o casi circular. Crece en las copas de los troncos con una apariencia suave, blanquecino a beige o marrón pálido, los márgenes del píleo tiende a enrollarse ligeramente cuando son jóvenes, más tarde toman una apariencia redondeada. Sus esporas presentan una coloración blanca, amarillenta y hasta lavanda-gris. Su micelio es de color blanco, inicialmente algodonoso. Sus requerimientos para desarrollarse en laboratorio incluyen temperaturas que oscilan entre 20 y 22 °C y un pH de 6.5 a 7.5. Transcurridas aproximadamente dos semanas (llena caja Petri) a partir de su inoculación en agar el micelio se vuelve demasiado denso.

El crecimiento de esta especie se adapta fácilmente a una gran variedad restos orgánicos. Los materiales de sustrato probados para dar lugar a los mayores rendimientos son los cereales (trigo, arroz) pajas, viruta de madera, tallos de maíz, bagazo de caña de azúcar, desechos de café, desechos de algodón, y numerosos subproductos obtenidos de residuos agrícolas y forestales. Este hongo se encuentra distribuido ampliamente en los bosques templados y subtropicales de todo el mundo. Es una especie maderera de la descomposición primaria en bosques caducifolios.

Al igual que otros hongos de este género, *P. pulmonarius* es muy sensible a los niveles de CO₂ en el aire, con niveles superiores a 1000 ppm (0,01%) se presentan malformaciones notables de los cuerpos fructíferos, como tallos más largos y un píleo de menor tamaño.

2. ANTECEDENTES

En 2001 Niazi *et al.*, reportaron que una especie bacteriana perteneciente al género *Bacillus* presentaba la capacidad de utilizar DMF como única fuente de carbono empleando esterases presentes en el extracto libre de células para la deesterificación del DMF. Mediante electroforesis nativa en gel de poliacrilamida mostraron la presencia de cuatro isoesterases designadas como Et-1, Et-2, Et-3 y Et-4. Las isoesterases Et-4 y Et-1 mostraron mayor preferencia hacia la hidrólisis de DMF en comparación con Et-2 y Et-3. Concluyeron que la deesterificación es el paso inicial en la degradación de ftalatos como el DMF y los genes para las esterases asociadas con este proceso parecen estar presentes en el plásmido de esta bacteria.

Kim *et al.* (2003) evaluaron la degradación de 500 mg de DEHF/L en fermentación líquida empleando dos enzimas: una cutinasa fúngica pura obtenida del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* y una esterasa de *Candida cylindracea*. Obteniendo niveles superiores de actividad hidrolítica con la cutinasa fúngica y una tasa de descomposición del 90% del DEHF en las primeras 12 h de fermentación. En comparación con la esterasa, cuya tasa de descomposición fue de más del 85% después de 3 días de incubación También se encontró que durante la degradación. La mayoría del DEHF fue convertido al metabolito 1,3 -isobenzofuranoide (IBF) por la hidrólisis del diéster. Este metabolito no resultó tóxico para el organismo utilizado en el bioensayo (bacteria bioluminiscente recombinante *Escherichia coli*), en comparación con la esterasa de *C. cylindracea* cuyos productos de degradación resultantes fueron el IBF y un compuesto desconocido (compuesto X), ambos tóxicos para *E. coli*, provocando estrés oxidativo y daño en la síntesis de proteínas.

Lee *et al.* (2004) evaluaron la biodegradación de 28 mg de DBF/L en medio (YMPG) líquido por los hongos de pudrición blanca *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* y *Daldinia concéntrica*. Encontrando que las proporciones de degradación por *D. concentrica* y *T. versicolor* fueron de 94 y 83% respectivamente después del primer día de incubación. Después de seis días de incubación, ambos hongos degradaron completamente el DBF. Sin embargo, *P. chrysosporium* degradó sólo el 49% del DBF, incluso después de 20 días de incubación sólo alcanzó a degradar un 91%. Algunos de los metabolitos obtenidos durante el proceso de degradación por *D. concéntrica* fueron: ácido *o*-fenil acético, isobenzofuranona, ácido *o*-anísico, alcohol feniletílico, y di-butil-4-mehtoxy fenol. Sin embargo, los productos frecuentemente reportados como el monobutil ftalato, el ácido ftálico y el ácido protocatecuico no se encontraron. Además, de una

sorprendente diversidad de ácidos grasos tales como tetradecanoico, hexadecanoico, y ácido octadecano-1-enoico. Las especies de ácidos grasos variaron de C₈ a C₁₈. Y sugirieron que durante la biodegradación de DBF por hongos de pudrición blanca puede estar participando un sistema enzimático diferente al ligninolítico.

En 2007 Lee *et al*, estudiaron la resistencia a 69.585 (250µM), 208.75 (750 µM) y 347.925 (1250 µM) mg de DBF/L en medio sólido del basidiomiceto *Polyporus brumalis*. Encontrando que conforme se incrementaba la concentración de DBF el crecimiento miceliar se fue inhibiendo. También evaluaron la biodegradación de DBF 100 µM en matraces con 200 mL de medio líquido basal, observando que después de 12 días de cultivo el DBF fue casi eliminado del medio. El 50 % del DBF fue adsorbido por el micelio. Los productos intermediarios detectados durante el proceso de degradación fueron el dietil ftalato (DEF) y el MBF. Después de 12–15 días de cultivo, la concentración de estos metabolitos en el medio de cultivo disminuyó rápidamente. El último producto de degradación detectado en el medio de cultivo fue el anhídrido ftálico, así como cantidades traza de compuestos aromáticos, tales como ácido α-hidroxifenilacético, alcohol bencílico, y ácido o-hidroxifenilacético. En esta investigación sugieren que la degradación de DBP en medio líquido por *P. brumalis*, puede ser completada través de las vías de transesterificación y de-esterificación, las cuales se combinan sucesivamente en una vía de degradación intracelular.

Yeo *et al.* (2007) investigaron la degradación de BBF y DEF (100µM) en condiciones de cultivo líquido por el basidiomiceto *Phlebia tremellosa*, alcanzando una tasa de degradación del 30 % y 80 %, respectivamente. También reportan 1832 nucleótidos que codifican para lacasas y que la actividad de esta enzima y sus transcritos se ven incrementados considerablemente en presencia de los ésteres de ftalato empleados.

En el estudio de Hwang *et al.* (2008), diez cepas de hongos de pudrición blanca (*Irpex lacteus*, *Merullius tremellosus*, *Polyporus brumalis*, *Trametes Versicolor*, *Schizophyllum commune*, *Formitella fraxinea*, *P. ostreatus* y tres transformantes de *T. versicolor*) se emplearon en la degradación de 100 mg/L de DMF, DEF y BBF en medio líquido YMG. Encontrando que *P. ostreatus* fue la cepa más eficiente para degradar los tres ftalatos en cultivos con 5 días de preincubación y en uno que no se había preincubado. En el tratamiento con BBF *P. ostreatus* obtuvo la mayor tasa de degradación. El sobrenadante del cultivo en YMG de *P. ostreatus* únicamente degradó el 14.9% de los 100 mg/L de BBF en 4 días de incubación, pero el micelio

homogenizado logró remover el 100 % del BBF en 2 días, incluso en agua destilada, indicando que la biodegradación inicial del BBF puede ser atribuida a enzimas asociadas al micelio en lugar de enzimas extracelulares. Con estos resultados concluyeron que de manera contraria a lo que generalmente se había registrado, sí se puede obtener una mayor tasa de degradación en ftalatos con cadenas alquílicas más largas, es este caso *P. ostreatus* presentó potencial para aplicaciones en el tratamiento de desechos que contienen ftalatos y para la biorremediación de sitios contaminados con éstos sin importar la longitud de las cadenas alquílicas del ftalato.

Kim y Song (2009) observaron que en fermentación líquida, la morfología adquirida (pellets esféricos) por el basidiomiceto *P. ostreatus* puede afectar la actividad enzimática y la tasa de degradación de compuestos diana específicos, tales como el DMF y el BBF. También encontraron que la velocidad de agitación afecta la morfología de los pellets, pues a 150 rpm se formaron pellets más pequeños que a 100 rpm debido a la mayor fuerza de rompimiento. De las enzimas ligninolíticas que se examinaron, las lacasas fueron las de mayor presencia, la actividad enzimática para LnP fue negativa y las MnP no pudieron ser detectadas. Sugirieron que la optimización en la morfología del pellet y su subsecuente secreción de enzimas degradativas es necesaria para una eficiente remoción de xenobióticos tales como los ftalatos por basidiomicetos de pudrición blanca.

Para 2012 Hwang *et al.*, evaluaron la degradación de 100 mg de BBF/L en fermentación líquida empleando el hongo *P. ostreatus*. En este estudio encontraron que la degradación completa del BBF se lleva a cabo a las 24 h de la incubación en un medio con una fuente de C y N extra y con un período de pre-incubación previo a la adición de ftalato, en comparación con un medio mineral, en el que únicamente el 35% de BBF fue degradado después de 5 días de incubación, lo que estuvo relacionado directamente con el incremento (probablemente debido a la formación de ácido ftálico como principal metabolito) o disminución (debida a la formación de algunos ácidos orgánicos) del pH y la producción de biomasa; además de que en el medio con una fuente adicional de C y N los niveles de actividad enzimática de esterases y peroxidasas incrementaron rápidamente ante la adición del ftalato, efecto contrario al de las lacasas, cuyos niveles de actividad no fueron significativos.

En el estudio realizado por Zhu-Hua *et al.* (2012) se reportó que a pesar de que el hongo *Fusarium* sp. DMT-5-3 no era capaz de mineralizar completamente DMT, sí lo podría transformar en su respectivo monoéster o ácido ftálico por la hidrólisis gradual de sus enlaces éster. Estos resultados

sugirieron que las esterasas fúngicas son enzimas clave implicadas en la degradación microbiana de ésteres de ftalato. La esterasa purificada es una proteína polimérica que consiste en dos subunidades idénticas, con una masa molecular de aproximadamente 84 kDa. Esta esterasa mostró una actividad máxima a 50 °C y se mantuvo estable por debajo de 30 °C. Su pH óptimo fue de 8.0, pero se mantuvo estable en valores de 6.0–10.0. Su actividad se vio inhibida por Cr^{3+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} y Cd^{2+} . Análisis de especificidad mostraron que la enzima era específica para la hidrólisis de DMT, pero no tuvo ningún efecto sobre isómeros como el DMF o su monoéster el monometil ftalato (MMF).

Ahuactzin-Pérez *et al.* (2014) estudiaron la biodegradación de 500 y 1000 mg de DBF/L los hongos *Neurospora sitophyla*, *Trichoderma harzianum* y *Aspergillus niger* en fermentación líquida y a partir de los sobrenadantes obtenidos de las fermentaciones evaluaron la toxicidad de los metabolitos obtenidos del proceso degradativo mediante el monitoreo del crecimiento de la bacteria *E. coli*. Encontrando que los productos de degradación con *N. sitophyla* inhibieron el crecimiento de *E. coli* a mayor concentración de DBF, en contraste con *T. harzianum* y *A. niger*, cuyos productos de degradación decrecieron más el crecimiento de *E. coli* en la menor concentración de DBF.

Córdoba-Sosa *et al.* (2014) evaluaron el crecimiento de *P. ostreatus* ATCC3526 en tres diferentes concentraciones (750, 1200 y 1500 mg/L) de DHEF en FSm, encontrando que esta cepa es capaz de crecer en concentraciones de hasta 1500 mg de DEHF/L (concentración más alta reportada en estudios de biodegradación de DEHF). Reportan que las diferentes concentraciones del DEHF tienen efecto tanto sobre la μ como en la biomasa máxima (X_{max}), ya que a mayor concentración de DEHF se incrementó la producción de biomasa. La mayor actividad enzimática la presentaron las enzimas esterasas en comparación con las lacasas, además los rendimientos enzimáticos evaluados para ambas enzimas presentó una correlación positiva con la actividad máxima obtenida. Dado que la actividad de esterasas fue mucho mayor que la actividad de las lacasas al comienzo de la fase estacionaria en el medio que contenía 1500 mg de DEHF/L sugieren que en este basidiomiceto, este grupo de enzimas podría ser el responsable de degradación inicial de DEHF, que no hay represión catabólica (efecto glucosa), por lo que al usar tanto el DEHF como la glucosa como fuente de carbono probablemente se estaría presentando un crecimiento diauxico, con lo que se tendría que replantear el modelo de crecimiento microbiano usado. Y que esta cepa utiliza DEHF como fuente de carbono y energía.

Recientemente, Whangsuk *et al* (2015) reportaron dos genes clonados de esterasa, *estB* y *estG*, en *Sphingobium* sp. SM42, que podría participar durante el metabolismo de DBF como única fuente de carbono. A pesar de que la esterasa EstG comparte una identidad de secuencia con muy pocas proteínas, mostró una mayor capacidad de ruptura para DBF, tanto *in vitro* como *in vivo*, en comparación con EstB. Las mutantes de inactivación de inserción *estG* y *estB* no pudieron degradar DBF debido principalmente a la ausencia de la eficiente enzima degradadora de DBF, EstG. Curiosamente, la mutante *estB* degradó DBF mejor que la cepa nativa. Estos resultados confirmaron que la mutante *estB* compensa la pérdida de EstB con un aumento en la expresión de *estG* y este proceso permite a *Sphingobium* degradar más DBF. Un gen designado *estR*, que codifica una proteína de la familia MarR, fue encontrado cerca de *estB*. Reportando que la proteína EstR actúa como regulador transcripcional positivo que media la inducción de la expresión del gen de esterasas *estB*, pero no está implicado en el aumento compensatorio observado en la expresión de *estG* en la mutante *estB*.

3. JUSTIFICACIÓN

Los polímeros utilizados hoy en día liberan sustancias al ambiente que se ha demostrado, resultan dañinas a la salud de diferentes organismos, ante esta situación es importante el desarrollo de nuevas tecnologías que contribuyan con la eliminación de dichos compuestos. La capacidad de adaptación de los microorganismos a los diversos ambientes estresantes es una bendición para la humanidad, por lo que los temas globales sobre los ftalatos y sus metabolitos implicados en la contaminación refieren gran importancia. Es por esto que el uso de microorganismos potenciales para crecer utilizando como fuente de carbono y energía compuestos como los ftalatos se ha convertido en una herramienta viable que se está abriendo camino en el campo de la biotecnología moderna.

De los microorganismos que más impacto han tenido en el área de la biotecnología destacan los hongos, dada su versatilidad metabólica para emplear como sustratos una amplia gama de compuestos. De este grupo, los hongos comestibles tienen un enorme potencial para aplicaciones industriales, especialmente en la biodegradación de contaminantes recalcitrantes, entre los que se encuentran los ftalatos. Sin embargo, el escaso y nulo conocimiento que se tiene acerca del desarrollo de estos hongos sobre este tipo de compuestos con respecto a sus parámetros cinéticos de crecimiento y a los procesos y rutas metabólicas implicados en su degradación, hacen necesario el desarrollo de investigaciones enfocadas en el estudio de este tipo de parámetros.

Es por esto que este trabajo pretende aportar conocimiento acerca del crecimiento, metabolismo, y proceso degradativo que llevan a cabo tres cepas de hongos comestibles al desarrollarse en presencia de diferentes concentraciones DEHF.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

4.1.Preguntas de investigación

¿Las cepas de hongos *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus* ATCC32783 y *Pleurotus pulmonarius* podrán degradar concentraciones de 1500 y 2000 mg de DEHF/L hasta ácido ftálico en fermentación sumergida?

¿Cómo afectará el proceso de degradación de DEHF variables tanto de crecimiento como metabólicas de las tres cepas fúngicas?

4.2.Hipótesis

Las cepas de hongos comestibles *L. edodes*, *P. ostreatus* ATCC32783 y *P. pulmonarius* degradarán 1500 y 2000 mg de DEHF/L hasta ácido ftálico pasando por la formación de su monoéster (MEHF), presentando un aumento en los valores de sus parámetros cinéticos de crecimiento conforme incrementa la concentración de DEHF. Además de que el perfil de pH presentará cambios drásticos correspondientes con la formación de metabolitos obtenidos de la degradación de DEHF. La glucosa se comenzará a consumir al final de la fase de crecimiento exponencial, ya que se espera que al inicio, lo que consuman los hongos como fuente de carbono y energía sea el DEHF.

La actividad enzimática extracelular de lacasas será menor en las tres cepas en comparación con la de las esterasas, la cual se espera que sea la que presente los mayores niveles de actividad. Además, los niveles más altos de actividad de esterasas se presentarían durante las fases de crecimiento de adaptación y exponencial, fases en la que se espera se esté llevando a cabo la descomposición de DEHF en sus respectivos metabolitos. Y dado que los rendimientos enzimáticos evaluados se relacionan directamente con los mayores niveles de actividad enzimática, se espera que haya un efecto significativo de cada tratamiento sobre cada uno de estos rendimientos.

4.3.Objetivo general

Evaluar la degradación de DEHF por tres cepas de hongos comestibles (*P. ostreatus* ATCC32783, *P. pulmonarius* y *L. edodes*), a través del efecto de tres concentraciones (0, 1500 y 2000 mg/L) de este compuesto sobre el crecimiento y metabolismo de las cepas desarrolladas en fermentación sumergida.

4.4. Objetivos específicos

- Determinar la velocidad específica de crecimiento (μ) y biomasa máxima (X_{max}) de las tres cepas de hongos comestibles crecidas en tres concentraciones de DEHF (0, 1500 y 2000 mg/L) en fermentación sumergida.
- Valorar los perfiles de pH de las tres cepas de hongos comestibles crecidas en tres concentraciones de DEHF (0, 1500 y 2000 mg/L) en fermentación sumergida durante sus respectivos tiempos de incubación.
- Evaluar la degradación de dos concentraciones de DEHF (1500 y 2000 mg/L) por las cepas de hongos comestibles, usando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS).
- Valorar los perfiles de actividad enzimática extracelular de lacasas y esterases de las tres cepas de hongos comestibles crecidas en 0, 1500 y 2000 mg de DEHF/L en fermentación sumergida a lo largo de sus respectivos tiempos de incubación.
- Determinar tanto para lacasas como esterases cuatro rendimientos enzimáticos: actividad máxima de la enzima (E_{max}), rendimiento de producción de la enzima con respecto a la biomasa (Y_{EX}), tasa específica de formación de la enzima (q_p) y productividad de la enzima (P).
- Evaluar la cantidad de glucosa presente cada tratamiento (0, 1500 y 2000 mg de DEHF/L) con las tres cepas de hongos comestibles crecidas en fermentación sumergida durante sus respectivos tiempos de incubación.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Microorganismos de estudio

Se utilizaron las cepas fúngicas *Lentinula edodes* (donada por el Dr. Martínez Carrera del COLPOS-Puebla), *Pleurotus ostreatus* ATCC32783 (American Type Culture Collection, Manassas, U.S.A.) y *Pleurotus pulmonarius* (de la colección de cultivos de la Universidad China de Hong Kong) (Figura 21).

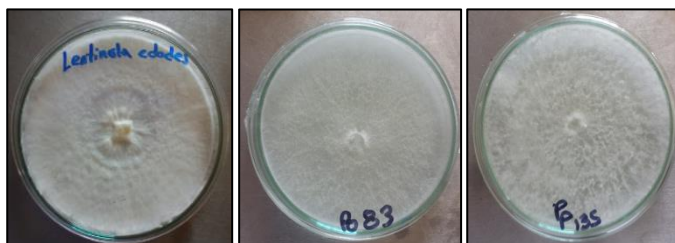


Figura21: Cepas de *L. edodes*, *P. ostreatus* ATCC32783 y *P. pulmonarius* (de izquierda a derecha) crecidas en EMA.

5.2. Preparación de inóculo y condiciones de cultivo para la fermentación

Las cepas fúngicas utilizadas en este estudio se crecieron para su propagación en agar extracto de malta (EMA). Los tiempos de desarrollo de las cepas fueron según su velocidad de crecimiento (Sánchez, 1998). Los estudios de fermentación se realizaron empleando inóculos (3 fragmentos de 10 mm de diámetro) de la periferia de colonias desarrolladas en EMA. Para *L. edodes* dichos cultivos se incubaron a 25 °C por 37 días a 120 rpm y para las cepas de *P. ostreatus* ATCC32783 y *P. pulmonarius* los cultivos se incubaron a 28 °C por 24 y 23 días respectivamente. Se hicieron tres réplicas de los matraces por día.

5.3. Preparación de medios de cultivo para la fermentación

Se preparó un medio de cultivo empleando en g/L: KH_2PO_4 0.6, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001, K_2HPO_4 0.4, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.05, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, CuSO_4 0.25, extracto de levadura 5, glucosa 10 y Tween 80 0.04 %. El pH se ajustó a 6.5 usando NaOH 0.1, 1 y 3 M. A este medio se le denominó medio testigo o medio SAF (sin adición de ftalato) Se utilizaron matraces de 125 mL conteniendo cada uno 55 mL de medio de cultivo. Una vez contenido el medio, para los tratamientos con DEHF, se adicionó a cada matraz la concentración correspondiente de DEHF (1500 y 2000 mg/L). Posteriormente se esterilizaron en autoclave por 15 min a 121 °C y 103 kPa. Se dejaron enfriar dentro de la autoclave durante 5 horas para su posterior inoculación. En todos

los casos, el medio de cultivo SAF fue utilizado como testigo (modificado de Córdoba-Sosa *et al.* 2014).

5.4. Obtención del sobrenadante extracelular

Para la cepa *L. edodes* la toma de muestras se realizó cada 48 horas a partir del día de incubación y hasta el día 20, a partir de este día y hasta el día 37 los muestreos se hicieron cada 24 horas. En las especies del género *Pleurotus*, los hongos se desarrollaron durante las primeras 72 h de cultivo y posteriormente se tomó la primera muestra, sin embargo, los muestreos subsecuentes se realizaron cada 24 h. Se obtuvo el sobrenadante de cada matraz en las fermentaciones por filtrado y retención de la biomasa a través de papel de filtro Whatman No. 4. A partir de este sobrenadante se guardaron las cantidades necesarias en tubos Eppendorf de 1 mL para posteriores análisis. La biomasa retenida sobre el papel Whatman se secó hasta peso constante para su cuantificación por diferencia de peso seco (AOAC 1990).

5.5. Determinación de los parámetros cinéticos de crecimiento biomasa máxima (X_{max}) y velocidad específica de crecimiento (μ)

Para la determinación de los parámetros X_{max} y μ se obtuvo el progreso de la biomasa en función del tiempo $X = X(t)$, que posteriormente se ajustó mediante la ecuación logística de Velhurst-Pearl (Ec. 1):

$$dX / dt = \mu (1 - X / X_{max}) X \quad (\text{Ec. 1})$$

La solución a la ecuación fue la siguiente (Ec. 2):

$$X = X_{max} / (1 + C e^{-\mu t}) \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde

μ = Máxima velocidad específica de crecimiento (h^{-1})

X_{max} = Valor de la biomasa máxima o de equilibrio (g/L) cuando $dX / dt = 0$ para $X > 0$.

t = Tiempo transcurrido en la fermentación (h)

X_0 = Valor de la biomasa inicial (g/L)

C = Valor que representa la relación entre la diferencia de X_{max} y X_0 (g/L):

$$C = (X_{max} - X_0) / X_0$$

La estimación de los parámetros cinéticos en las ecuaciones mencionadas se llevó a cabo usando el programa Solver de Microsoft Excel (Viniegra-González *et al.* 2003).

5.6. Cuantificación de la degradación de DEHF

Para el análisis de degradación se tuvieron las tres réplicas de 1mL del sobrenadante por día, las cuales se mezclaron y a partir de esta mezcla se obtuvo un total de 1 mL, el cual se depositó en el vial correspondiente para el análisis a través del cromatógrafo de gases. Todos los componentes químicos fueron analizados utilizando cromatografía de gases/espectrofotometría de masas (GC/MS). No se asignó ningún método de preparación a la muestra para el análisis. Se utilizó helio como gas acarreador en 1 mL/min. La temperatura en el puerto de inyección fue de 290 °C. La programación del horno fue de 90 °C por 5 min, después de 20°C/min hasta 290°C por 30 min. El tiempo de corrida por muestra fue de 45 min. El inyector presentó una jeringa con capacidad de 10 µL, con la que se inyectó un volumen de 2 µL a partir de cada vial. Se empleó una columna Agilent 19091s-413HP-5MS con fenil metil silox al 5% (30m x 320 µm x 0.25 µm), su temperatura se programó inicialmente a 90°C hasta 365°C. Los datos fueron procesados con un software MSD chemstation. El área del pico fue integrada y usada como señal analítica para la cuantificación de la concentración de DEHF degradada.

5.7. Determinación de los perfiles de pH

Para la cepa *L. edodes* la determinación de los perfiles de pH en cada tratamiento se llevó a cabo cada 48 horas a partir del día de incubación y hasta el día 20, a partir de este día y hasta el día 37 las determinaciones se hicieron cada 24 horas. En las especies del género *Pleurotus* esta variable se midió cada 24 h después de las primeras 72 h de cultivo. En todas las fermentaciones la evaluación de esta variable se llevó a cabo utilizando un potenciómetro Conductronic Pc45.

5.8. Determinación de la actividad enzimática extracelular

5.8.1. Lacasas

La actividad de lacasas extracelular se determinó en el sobrenadante, utilizando como sustrato 2,6-dimetoxifenol (DMP) SIGMA. La mezcla de reacción contenía 900 µL de DMP 2 mM en buffer de acetatos 0.1 M y pH de 4.5 mezclado con 100µL de sobrenadante. Esta mezcla se incubó a 40°C por 1 min y se leyó la absorbancia a 468 nm con un espectrofotómetro Jemway. Una unidad

de actividad de lacasas (U) se definió como la cantidad de enzima que provoca incrementos de una unidad en la absorbancia por minuto de incubación (modificado de Díaz-Godínez *et al.* 2001).

5.8.2. Esterasas

La actividad de esterasas se determinó midiendo la concentración de *p*-nitrofenol producido por la hidrólisis de *p*-nitrofenilbutirato (*p*NPB). La mezcla de reacción contenía 100 μ L de ECE y 900 μ L de una solución preparada con 10 μ L de *p*NPB [1.76 % (v/v) de *p*NPB en acetonitrilo], 790 μ L de buffer de fosfatos 50 mM pH 7.0, y 100 μ L de Tritón X-100 0.04%. La mezcla de reacción se incubó durante cinco minutos a 37 °C y la absorbancia se leyó a 405 nm. Una unidad de actividad de esterasas (U) es la cantidad de enzima que convierte un micromol de *p*NPB en un micromol de *p*-nitrofenol por minuto (Davies *et al.* 2000).

5.9. Determinación de los rendimientos enzimáticos E_{max} , $Y_{E/X}$, q_p y P

Los rendimientos enzimáticos determinados fueron: actividad máxima de la enzima (E_{max}) en cada tratamiento, la cual se representó por el punto de mayor actividad obtenido en los perfiles de actividad enzimática; rendimiento de la enzima con respecto a la biomasa ($Y_{E/X}$); tasa específica de formación de la enzima (q_p) y productividad de la enzima (P).

Para la determinación del $Y_{E/X}$, q_p y P se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$Y_{E/X} = E_{max} / X_{max}$$

$$q_p = \mu * Y_{E/X}$$

$$P = E_{max} / \text{tiempo en h de la } E_{max}$$

5.10. Cuantificación de glucosa

Los azúcares reductores son aquellos azúcares que poseen su grupo carbonilo intacto y que a través del mismo pueden reaccionar como reductores con otras moléculas. Todos los monosacáridos son azúcares reductores, ya que tienen al menos un –OH hemicetaldehído libre. Para este estudio se utilizó el método de DNS para la cuantificación de la glucosa como único azúcar reductor, el cual se basa en la reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico por la glucosa y/o

fructosa al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico. La concentración de azúcar en la muestra se valoró empleando una curva patrón de glucosa con concentraciones conocidas.

La mezcla de reacción se preparó en tubos de vidrio de 5 mL, conteniendo 900 µL de agua destilada, 100 µL de sobrenadante y 2 mL de reactivo DNS (NaOH 1%, Na₂SO₃ 0.05%, fenol 0.2% y DNS 1%). Posteriormente los tubos se colocaron en baño María a punto de ebullición para su incubación durante 5 minutos. Después se pasaron a un baño de hielo para detener la reacción y se agitaron con ayuda de un vórtex. Finalmente se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro Jemway a 540 nm.

La cantidad de glucosa reducida se calculó empleando la curva patrón, por medio de la siguiente ecuación:

$$x = (y - b) / m$$

Donde:

y = Absorbancia.

b = Ordenada al origen.

m = Pendiente de la recta.

5.11. Análisis estadístico

Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y una prueba de intervalos múltiples (post-hoc) de Tukey con un alfa de 0.05 a las variables: velocidad específica de crecimiento (μ), biomasa máxima (X_{max}) y los rendimientos enzimáticos E_{max} , $Y_{E/X}$, q_p y P . Para correr el análisis se utilizó el programa Graphpad Prism® version 6.0.

6. RESULTADOS

6.1. Determinación de la biomasa máxima (X_{max})

6.1.1. *Lentinula edodes*

En la figura 23 se muestra el crecimiento de la cepa *L. edodes* hasta su fase estacionaria en medios con diferentes concentraciones de DEHF y el medio SAF. Esta cepa presentó el mayor tiempo de incubación para alcanzar las cuatro fases de crecimiento de un microorganismo, siendo éste de 37 días. En los medios con DEHF el organismo inició la fase de crecimiento exponencial al día 14 de incubación y al día 20 en el medio SAF.

Como se puede observar en la figura 22, el hongo produjo mayor cantidad de biomasa en presencia de DEHF en comparación con el medio testigo, alcanzando una X_{max} de hasta 6.88 y 7.90 g/L en los medios con 1500 y 2000 mg de DEHF/L respectivamente. Esto fue significativamente diferente de la X_{max} alcanzada en el medio testigo, que fue de 4.0 g/L (Tabla 5). Cabe resaltar que conforme se incrementó la concentración de DEHF también se incrementó la producción de biomasa.

Esta cepa entró a la fase estacionaria de crecimiento al día 32 en los medios con DEHF y al día 35 en el medio testigo. En los medios con DEHF el hongo empezó a ingresar a la fase de muerte al día 37, en comparación con el tratamiento testigo, en el que a este día se encontraba aún en la fase estacionaria.

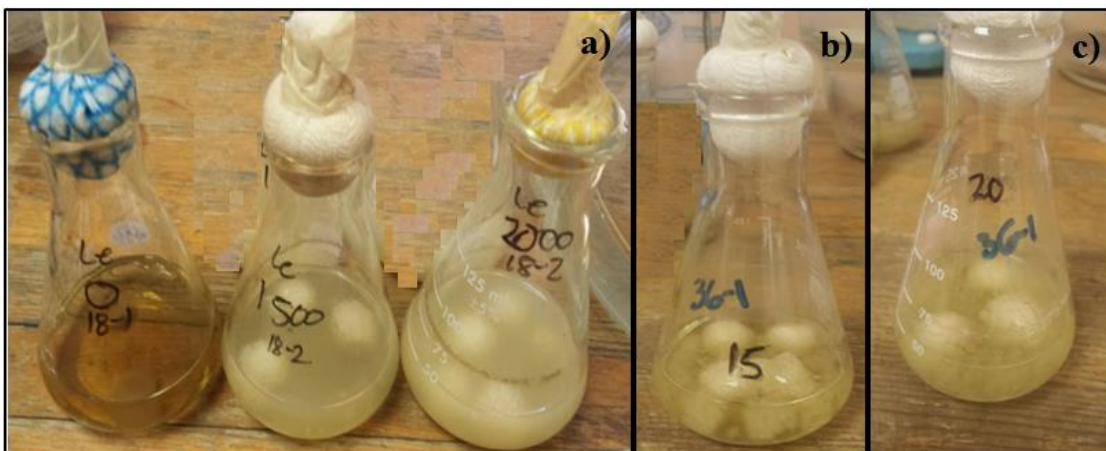


Figura 22. Biomasa de *Lentinula edodes* en medio SAF, 1500 y 200 mg de DEHF/L. a) Matracos (de izquierda a derecha) con medio testigo, 1500 y 2000 mg de DEHF/L con pellets de biomasa después de 18 días de crecimiento. b) y c) matracos con biomasa al día 36 en 1500 y 2000 mg de DEHF/L respectivamente.

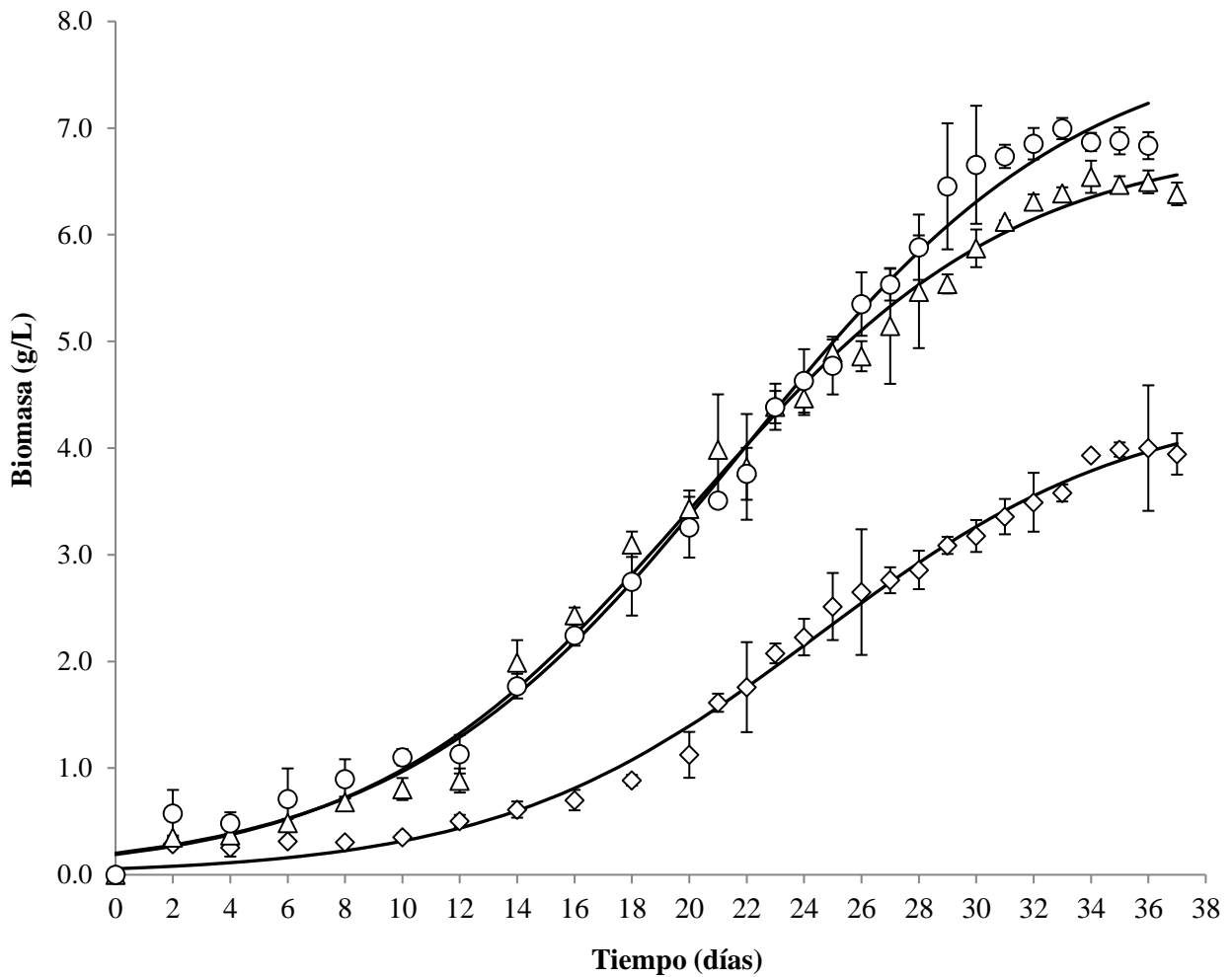


Figura 23. Crecimiento de *Lentinula edodes* en medio SAF (◇), 1500 (△) y 2000 (○) mg de DEHF/L en fermentación sumergida. Las figuras esquematizadas representan los valores reales obtenidos y las líneas continuas el ajuste obtenido mediante la aplicación del modelo logístico para cada tratamiento.

6.1.2. *Pleurotus ostreatus* ATCC32783

La cepa *P. ostreatus* ATCC32783 alcanzó tres fases ideales de crecimiento (Figura 25) en 22 días de incubación, tiempo mucho más corto en comparación con *L. edodes*.

P. ostreatus ATCC32783 produjo mayor cantidad de biomasa en el medio con la mayor concentración de DEHF (figura 24), siendo ésta de 9.29 g/L (más de un gramo de diferencia con *L. edodes*), seguida de la producida en el medio con 1500 mg de DEHF/L, la cual fue de 8.37 g/L. En el medio testigo se presentó la menor producción de biomasa, alcanzando 7.10 g/L como mayor X_{max} producida. Las tres biomazas máximas producidas fueron diferentes entre sí significativamente de acuerdo con el ANOVA realizado ($P < 0.05$)

En el medio SAF este hongo inició la fase de crecimiento exponencial al día 7 de fermentación y alcanzó la fase estacionaria el día 19, manteniéndose hasta el día 23 en dicha fase. En el tratamiento con 1500 mg de DEHF/L el hongo entró a la fase de crecimiento exponencial el día 6, alcanzando el inicio de la fase estacionaria el día 16. En el cultivo con 2000 mg de DEHF/L *P. ostreatus* alcanzó tanto la fase exponencial como la estacionaria en los mismos días que en el medio con 1500 mg de DEHF/L, sin embargo la diferencia se presentó las biomasa producida al alcanzar la fase exponencial, siendo esta diferencia de casi 1 g/L.

Esta cepa presentó el mismo patrón de crecimiento en los tratamientos que *L. edodes*, observando que conforme se incrementó la concentración de DEHF en el medio, el hongo produjo mayor cantidad de biomasa.

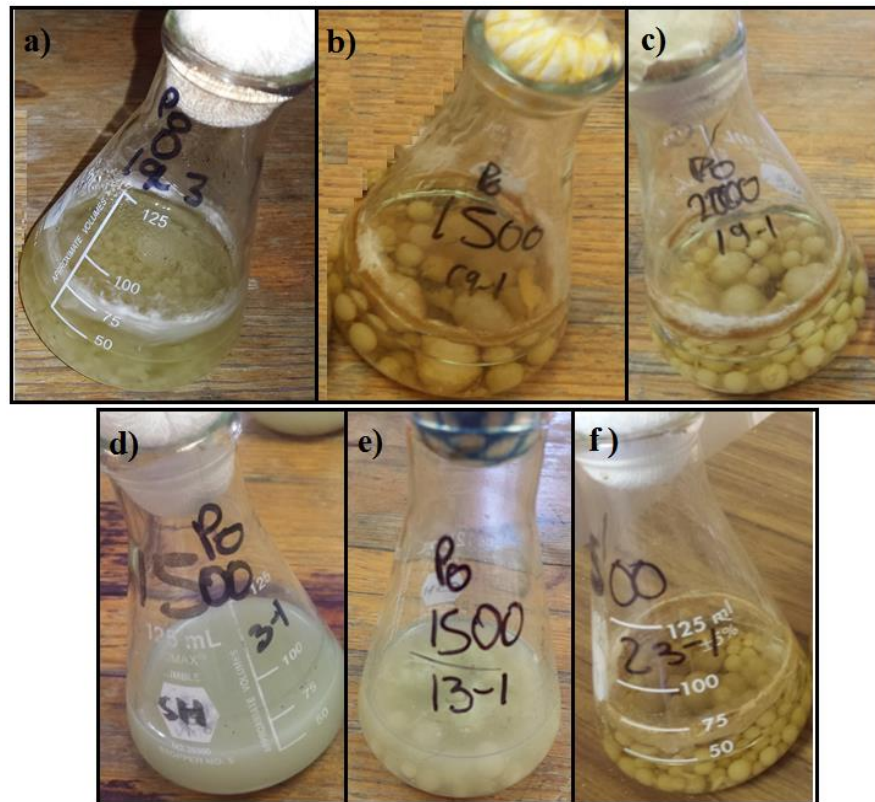


Figura 24. Biomasa de *Pleurotus ostreatus* ATCC32783 en medio a) SAF, b) 1500 y c) 2000 mg de DEHF/L. al día 19 de crecimiento. Incremento en la producción de biomasa de este hongo en un medio con 1500 mg de DEHF/L durante los días 3, 13 y 23 (incisos d, e y f respectivamente) de fermentación.

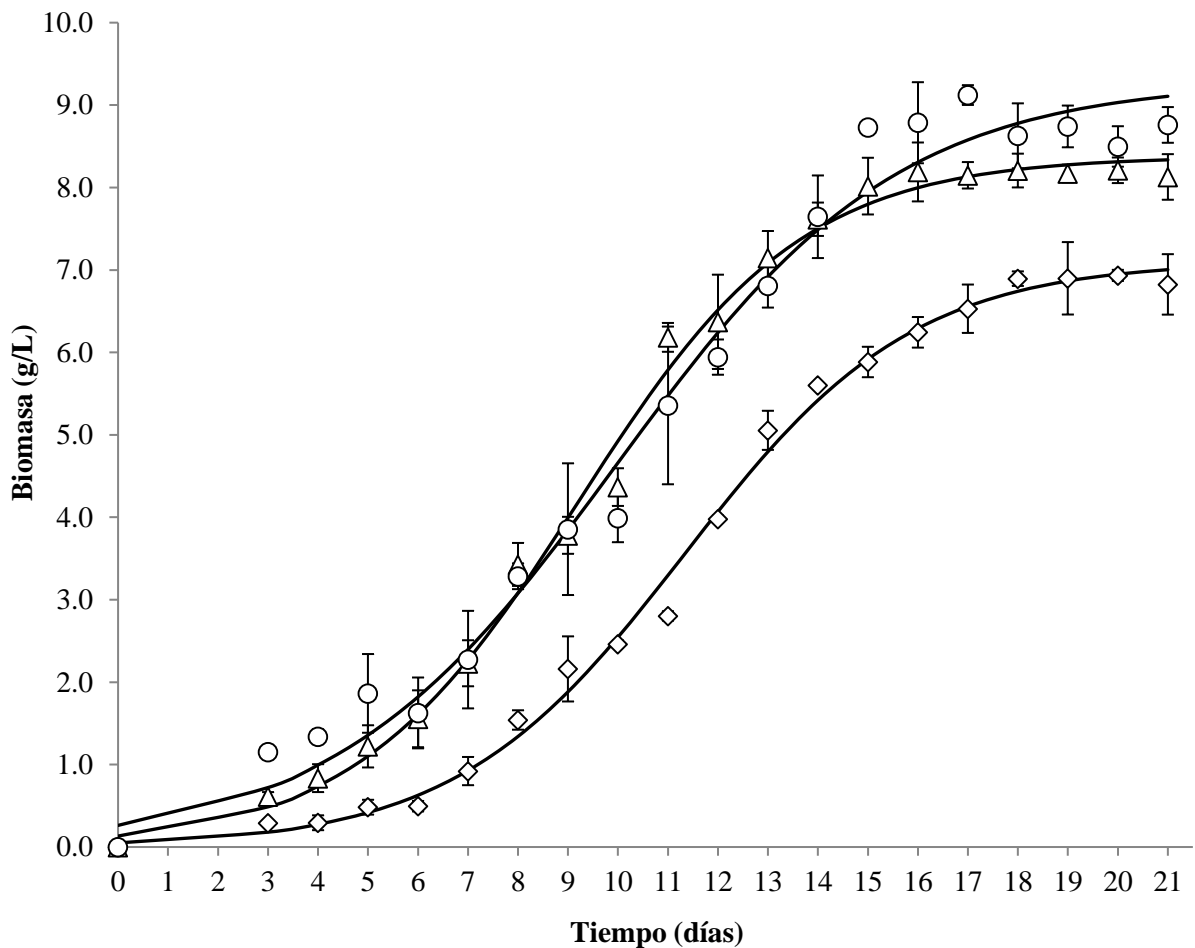


Figura 25. Crecimiento *Pleurotus ostreatus* ATCC32783 en medio SAF (◇), 1500 (△) y 2000 (○) mg de DEHF/L en fermentación sumergida. Las figuras esquematizadas representan los valores reales obtenidos y las líneas continuas el ajuste obtenido mediante la aplicación del modelo logístico para cada tratamiento.

6.1.3. *Pleurotus pulmonarius*

La cepa *P. pulmonarius* alcanzó sus cuatro fases ideales de crecimiento en 24 días de incubación, sin embargo en la figura 27 se puede observar su modelo de crecimiento hasta la fase estacionaria (23 d). Este tiempo fue mucho más corto en comparación con *L. edodes* pero con un día más de crecimiento en comparación con la cepa de *P. ostreatus*.

Al igual que *L. edodes* y *P. ostreatus* ATCC32783, *P. pulmonarius* produjo mayor cantidad de biomasa (Figura 26) en el medio con la mayor concentración de DEHF, siendo ésta de 8.92 g/L. Sin embargo, fue ligeramente menor que la alcanzada por *P. ostreatus* ATCC32783 pero mayor que la producida por *L. edodes*. En el medio con 1500 mg de DEHF/L, la mayor biomasa producida alcanzó niveles de 7.77 g/L, siendo esta cantidad ligeramente menor que la producida

por la especie *P. ostreatus* en el mismo tratamiento. Sin embargo, en el medio SAF, en el que se presentó la menor producción de X_{max} , ésta alcanzó una producción de 7.20 g/L, lo que es 0.1 g/L mayor que la producida por *P. ostreatus*, lo que nos dice que el DEHF si tiene efectos ligeramente significativos dependiendo de la especie que crezca en presencia de éste aun perteneciendo éstas al mismo género fúngico. Las tres biomazas máximas producidas fueron diferentes entre sí significativamente de acuerdo con el ANOVA realizado ($P < 0.05$)

En el medio SAF este hongo inició la fase de crecimiento exponencial al día 14 de fermentación y alcanzó la fase estacionaria el día 21, manteniéndose hasta el día 23 al inicio de dicha fase. En el tratamiento con 1500 mg de DEHF/L el hongo entró a la fase de crecimiento exponencial el día 7, alcanzando el inicio de la fase estacionaria el día 15. En el cultivo con 2000 mg de DEHF/L *P. pulmonarius* inició la fase exponencial el día 8 y alcanzó la fase estacionaria el día 17.

Esta cepa presentó el mismo patrón de crecimiento que *L. edodes* y *P. ostreatus* ATCC32783 en los 3 tratamientos, observando que conforme se incrementa la concentración de DEHF en el medio el hongo produce mayor cantidad de biomasa.

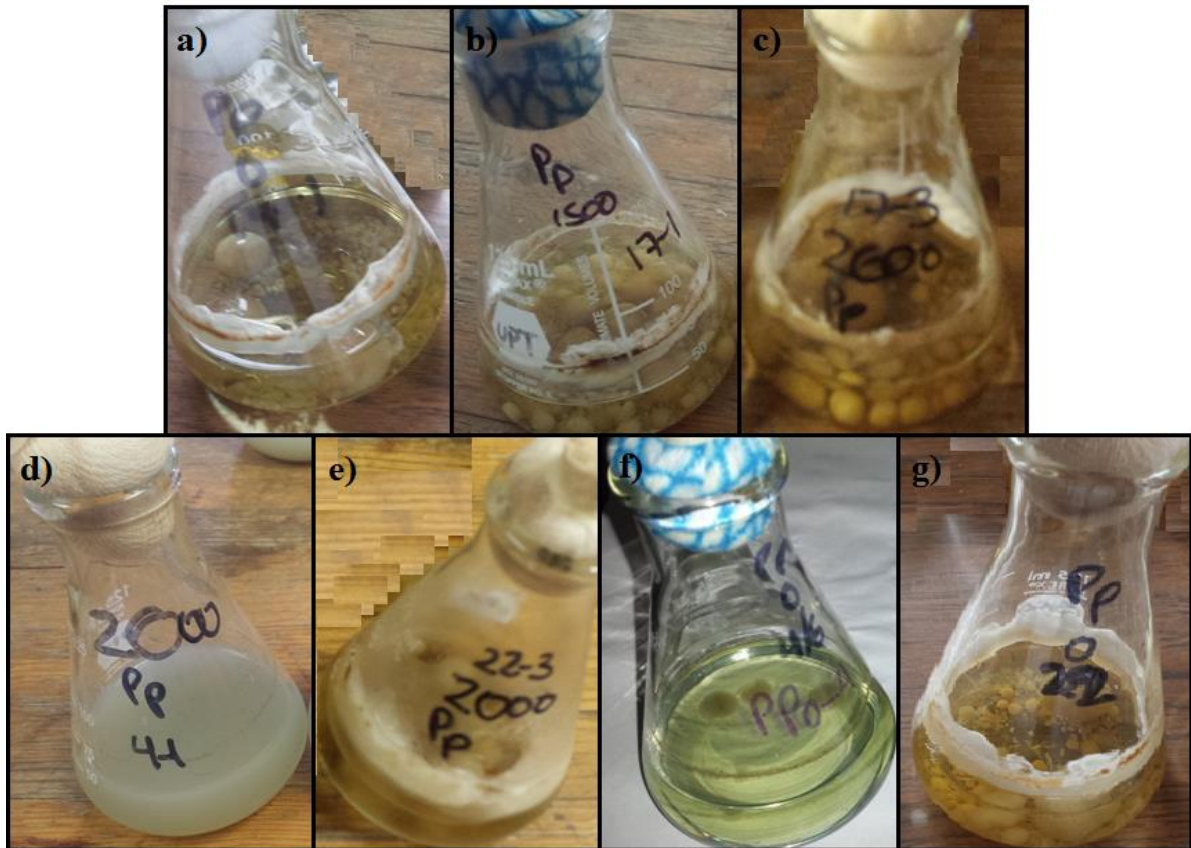


Figura 26. Biomasa de *Pleurotus pulmonarius* en medio a) SAF, b) 1500 y c) 2000 mg de DEHF/L. al día 17 de crecimiento. Incremento en la producción de biomasa de este hongo durante los días 4 y 22 de fermentación en un medio con 2000 mg de DEHF/L (d, e) y SAF (f, g).

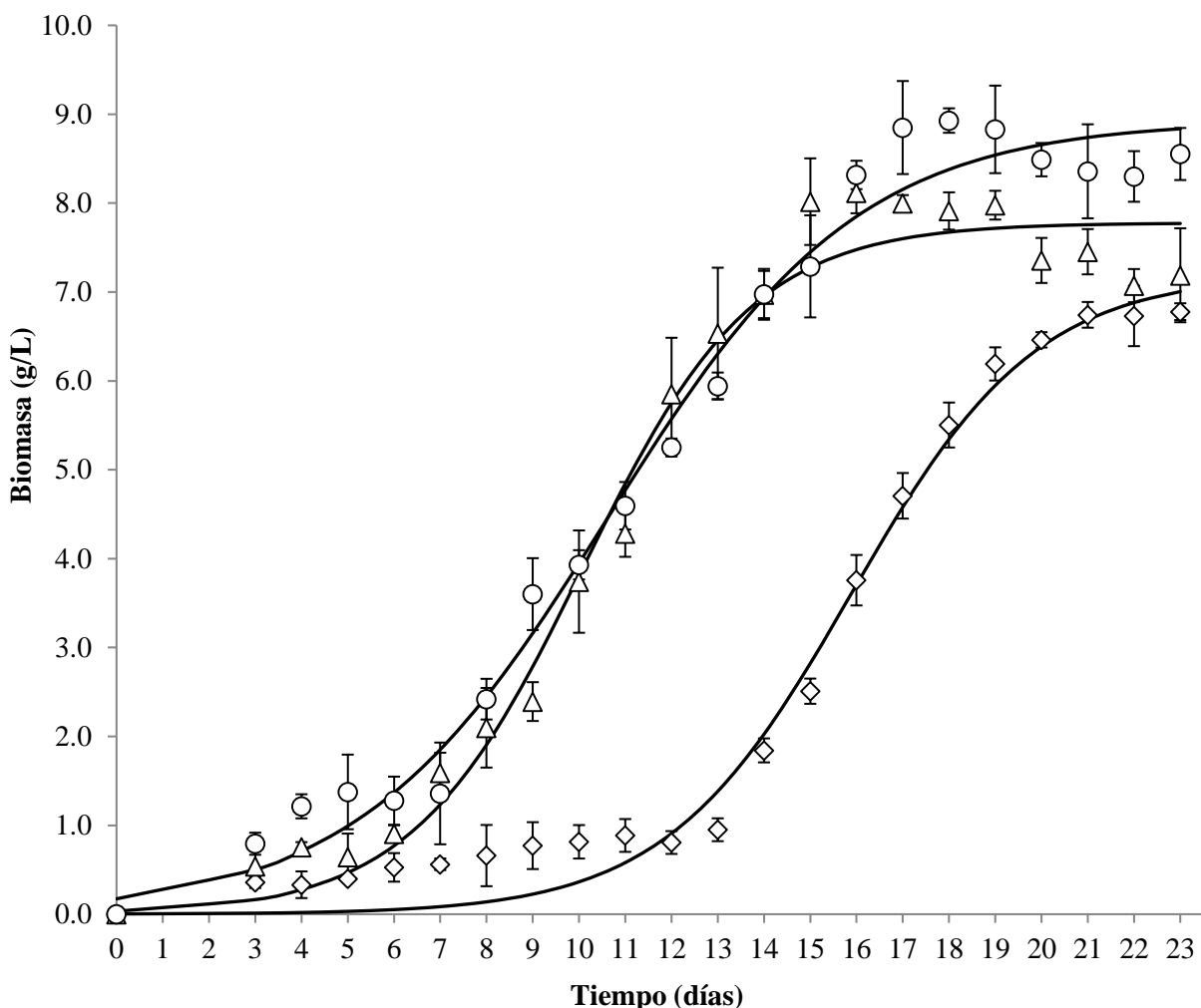


Figura 27. Crecimiento de *Pleurotus pulmonarius* en medio SAF (◇), 1500 (△) y 2000 (○) mg de DEHF/L en fermentación sumergida. Las figuras esquematizadas representan los valores reales obtenidos y las líneas continuas el ajuste obtenido mediante la aplicación del modelo logístico para cada tratamiento.

6.2. Determinación de la velocidad específica de crecimiento (μ) en *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus* ATCC32783 y *Pleurotus pulmonarius*

Como se muestra en la Tabla 5, para la cepa de *L. edodes* la μ fue similar en los tres tratamientos sin presentar diferencias significativas entre sí, lo que representa que no hay efecto de los tratamientos sobre la velocidad a la que crece este hongo aun en presencia de DEHF, pero sí en la producción de X_{max} , parámetro en el que los tratamientos probados sí tienen efecto, ya que sí hay una diferencia significativa entre los tres medios de cultivo.

En la cepa de *P. ostreatus* ATCC32783 de la mayor μ se presentó en el medio con la menor concentración de DEHF, siendo ésta de 0.0186 h^{-1} , seguida de la velocidad específica de crecimiento del medio SAF. La menor μ se presentó en el medio con mayor concentración de

DEHF, siendo ésta de 0.0147 h^{-1} . Esto demuestra que 2000 mg de DEHF/L sí tienen un efecto significativo sobre la μ de *P. ostreatus*, pero en un tratamiento con 500 mg menos y en uno sin DEHF el ritmo de crecimiento de esta cepa no será significativamente diferente entre sí. En cambio, la producción de X_{max} sí se ve afectada por los diferentes tratamientos de manera significativa entre sí.

Con respecto a la cepa *P. pulmonarius*, se observó el mismo patrón que en la cepa *P. ostreatus* en lo que refiere las variables μ y X_{max} . Teniendo que la mayor μ se presentó en el medio con la menor concentración de DEHF, siendo de 0.0226 h^{-1} , seguida de la μ del medio SAF. La menor μ se presentó en el medio con mayor concentración de DEHF, siendo de 0.0154 h^{-1} . Sin embargo, las velocidades de esta cepa fueron mayores que las de *P. ostreatus*. Esto nos dice que *P. pulmonarius*, a pesar de pertenecer al mismo género *Pleurotus*, crece más rápidamente.

Dado que la producción de la X_{max} sí se ve afectada por los diferentes tratamientos de manera significativa entre sí al igual que en *P. ostreatus*, se observó que para este parámetro se sigue el mismo modelo en ambas especies dependiendo de la concentración de DEHF presente, pero la producción de biomasa es mayor en *P. ostreatus*.

Tabla 5. Velocidad específica de crecimiento (μ) y biomasa máxima producida (X_{max}) por *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus* ATCC32783 y *Pleurotus pulmonarius* en medio SAF, 1500 y 2000 mg de DEHF/L después de 37, 23 y 24 días de incubación respectivamente en fermentación sumergida.

| Cepa | Parámetro | Medio de cultivo | | |
|---|---------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| | | Sin adición de DEHF | Concentración de DEHF/L | |
| | | | 1500 mg | 2000mg |
| <i>Lentinula edodes</i> | μ (h^{-1}) | 0.0074 ^a (0.0001) | 0.0074 ^a (0.00006) | 0.0070 ^a (0.0002) |
| | X_{max} (g/L) | 4.4681 ^c (0.1217) | 6.8866 ^b (0.0754) | 7.9028 ^a (0.0683) |
| <i>Pleurotus ostreatus</i> ATCC32783 | μ (h^{-1}) | 0.0182 ^b (0.0010) | 0.0186 ^b (0.00168) | 0.0147 ^a (0.0012) |
| | X_{max} (g/L) | 7.1054 ^c (0.1991) | 8.3781 ^b (0.2136) | 9.2901 ^a (0.1372) |
| <i>Pleurotus pulmonarius</i> | μ (h^{-1}) | 0.0208 ^b (0.0005) | 0.0226 ^b (0.0016) | 0.0154 ^a (0.0004) |
| | X_{max} (g/L) | 7.2067 ^c (0.1758) | 7.7779 ^b (0.1104) | 8.9282 ^a (0.0912) |

6.3. Degradación de 2000 y 1500 mg de DEHF/L

6.3.1. *Lentinula edodes*

En la figura 28 se observa el porcentaje de degradación de 1500 y 2000 mg de DEHF/L durante los primeros 17 días de fermentación por la cepa *Lentinula edodes*, dado que únicamente en estos primeros días de crecimiento se observó presencia del compuesto.

Se encontró que en el medio con 1500 mg de DEHF/L (Figura 28A) durante los primeros 15 días de cultivo, el 100% del DEHF en el medio se degradó a MEHF. Encontrando dicho metabolito a partir del día 10 y manteniéndose presente en el medio hasta (Figura 29, 30 y 31) el final de la fermentación. En esta concentración de DEHF, de acuerdo con los cromatogramas (Figura 29 y 30) obtenidos, durante los 15 primeros días que estuvo presente, el pico de DEHF fue detectado con tiempos de retención (RT) de 14.850, 14.856, 14.861, 14.868 y 14.914 min. Dada esta variación en los RT, los espectros de masa confirmaron la presencia de DEHF con una relación m/z de 390 siempre que se presentaba cualquiera de los RT ya mencionados y únicamente durante el día 10 también se observó la presencia de dodecil octil ftalato. En la figura 28A se observa que el 50% del DEHF se degradó en los primeros 6 días y el 50% restantes del día 6 al 15.

El pico del MEHF presentó RT de 14.89, 14.909 y 14.904 min, sin embargo, los espectros de masa además de confirmar la presencia de este metabolito con una relación m/z de 280 (durante los días 10 a 37 de la fermentación), también ratificó la presencia de diheptil ftalato, ditridecil ftalato y monobutil ftalato a lo largo de los días 16 a 30 de la fermentación.

En la figura 28B se observa el porcentaje de la degradación de 2000 mg de DEHF/L por la misma cepa, encontrado que al día 17 el 100% del DEHF en el medio se degradó MEHF. En un medio con mayor concentración de DEHF, el tiempo en que se degrada el compuesto es relativamente mayor en comparación con el medio con 1500 mg/L, ya que el 50% del compuesto se degradó en los primeros 7 días de incubación y el resto del compuesto se fue degradando en los 10 días siguientes.

El MEHF se encontró presente en el medio a partir del día 10, manteniéndose presente en el cultivo hasta el último día de la fermentación. De acuerdo con los cromatogramas obtenidos con esta cepa, durante los 15 días que estuvo presente el DEHF, su pico fue detectado con tiempos de retención (RT) de 14.850, 14.856, 14.861, 14.868 y 14.914 min. Dada esta variación en los RT, los

espectros de masa confirmaron la presencia de DEHF con una relación m/z de 390 siempre que se presentaba cualquiera de los RT ya mencionados y únicamente durante el día 10 también se encontró la presencia de dodecil octil ftalato.

El pico del MEHF presentó RT de 14.89, 14.909, 14.904 min, sin embargo, los espectros de masa además de confirmar la presencia de este metabolito con una relación m/z de 280 (durante los días 10 a 37 de la fermentación), también se encontró la presencia de diheptil ftalato, ditridecil ftalato y monobutil ftalato a lo largo de los días 17 a 30 de la fermentación.

A pesar de que el MEHF es uno de los metabolitos más comunes en la ruta de degradación del DEHF por otros microorganismos, en esta investigación se encontró la presencia de otros compuestos de elevado peso molecular antes de la formación de MEHF. Estos resultados nos confirmaron que este metabolito no es el único, ni el primero en formarse, ya que antes de su conformación e incluso en presencia aún de DEHF se estuvieron formando metabolitos dialquílicos de cadena larga que favorecieron los cambios ácidos de pH, además de compuestos cuyos picos presentes en los cromatogramas revelaron su importancia metabólica, tales como el 2,3-dihidro-3,5-dihidroxy-6-metil-4H-pirano-4-uno y algunos alcoholes y ácidos grasos frecuentes que reflejaron la separación del anillo bencénico y las cadenas alquílicas del DEHF, que en un inicio se encontraban unidos.

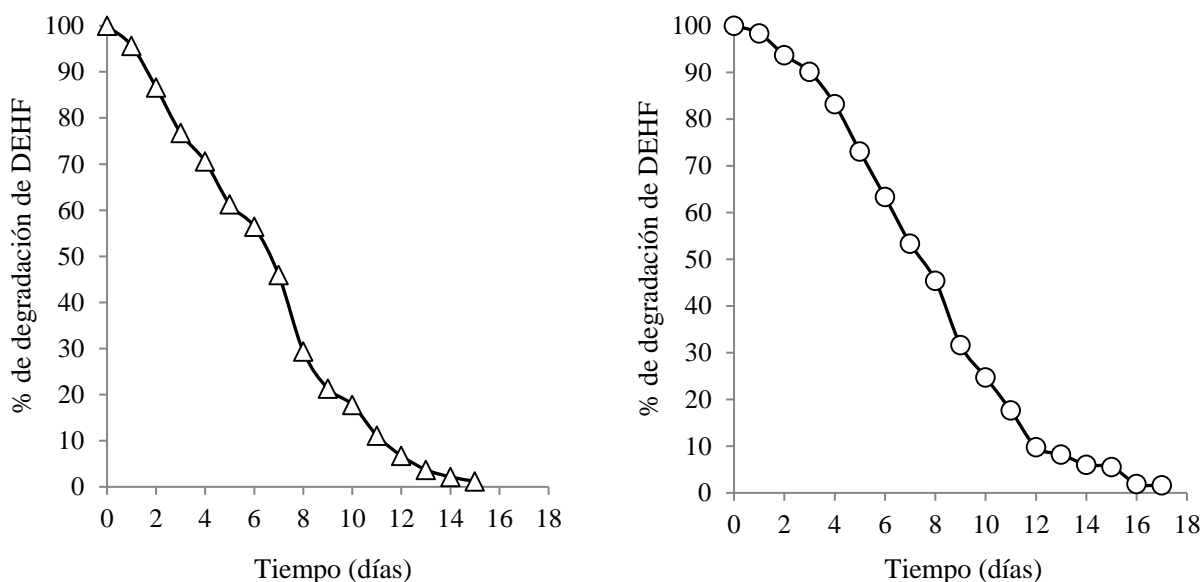


Figura 28. A) Porcentaje de degradación de 1500 (Δ) y B) 2000 (\circ) mg de DEHF/L por *Lentinula edodes* en fermentación sumergida.

Con base en los resultados obtenidos se propone una ruta de degradación para el DEHF por el hongo comestible *L. edodes* (Figura 32). En el primer paso, a partir del DEHF (Figura 33) se formó dodecil octil ftalato (Figura 34) por la separación de los grupos etilo de las cadenas dialquílicas. A estas cadenas en los extremos se les unieron cadenas de carbono para conformar una cadena lateral de 8 carbonos y otra cadena de 12 carbonos. Durante este primer paso se liberaron compuestos importantes, dados los picos que presentaron en los cromatogramas. Entre estos compuestos destacó el 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4Hpirano-4-uno, cuyo pico se presentó con un RT de 5.513, 5.495, 5.537 y 5.573 min con una abundancia importante a lo largo de los primeros 10 días de fermentación.

Otros metabolitos que también estuvieron presentes este tiempo con abundancias considerables y a los que probablemente se debe el cambio en la acidez del pH fueron: ácidos orgánicos como el ácido acético, ácido imidodicarbónico y el ácido 2-oxo-butanoico; y alcoholes y cetonas como el 2,2'-[oxibis(2,1-etanediiloxi)]di-etanol, 2-[2-[2-(2-butoxi)etoxi]etoxi]etanol, monoacetato de 1,2,3-propanetriol, 2,3-butanodiol, hexagol, glicidol. etanodiol y 1,3-dihidroxi-2-propanona. También se encontraron presentes compuestos aminados, tales como el aminoheptano, hidrazina, aziridina, propanamida y dimetilamina, sin embargo, cabe resaltar que las abundancias de estos compuestos fueron mínimas pero significativas para explicar los niveles de pH que se mantuvieron durante los primeros 6 días de cultivo.

La segunda reacción se dio del día 11 al 13 con la formación de diheptil ftalato (Figura 35), ditridecil ftalato (Figura 36) y MEHF (Figura 37) a partir del dodecil octil ftalato previamente formado o del mismo DEHF, ya que éste se encontró presente en el medio junto con los nuevos compuestos formados hasta el día 14 y 16 en los medios con 1500 y 2000 mg/l respectivamente. La formación de diheptil y ditridecil ftalato se dio por la separación de los grupos etilo de las cadenas dialquílicas en caso de formarse a partir del DEHF, para que a ambas cadenas en los extremos se les una un grupo metilo para la formación del diheptil ftalato y la unión de un heptano para la formación del ditridecil ftalato. Este heptano que se unió podría originarse de la deesterificación de la(s) cadenas alquílicas del diheptil ftalato o de otra ruptura a partir del dodecil octil ftalato. La formación de MEHF se dio por una reacción de deesterificación de una de las cadenas alquílicas del DEHF.

Tanto el ditridecil ftalato como el diheptil ftalato se encontraron presentes en el medio a partir del día 11 y hasta el día 13 y 15 respectivamente. EL MEHF estuvo presente junto con los dos metabolitos anteriores hasta el final de la fermentación.

La última reacción que se presentó dio como resultado la formación de MBF (Figura 37), únicamente los días 16 y 17. Este metabolito se formó a partir del MEHF, mediante la escisión del grupo etilo tanto de la ramificación como de la parte terminal de la cadena alquílica.

Durante estas reacciones se liberaron metabolitos que favorecieron la mayor acidificación del medio hasta el día 33 de la fermentación. Algunos de estos metabolitos fueron los mismos que se formaron durante la primera reacción, tales como el 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4Hpirano-4-uno (que se mantuvo presente hasta el día 20), 1,3-butanediol, 2,2'-[oxibis(2,1-etanediiloxi)]di-etanol, hexagol, dimetilamina, y la hidracina. Sin embargo también se formaron nuevos metabolitos, entre los que se encontraron principalmente ácidos grasos tales como: ácidos octadecanoicos, ácidos dodecanoicos, ácido propanoico, ácido pentafluoropropionico, ácido metoxiacético, ácido 4,9-decadienoico, ácido cis-vaccénico, ácido 9-tetradecenoico, ácido nonanoico, ácido pentanoico, ácido oleico, ácido 2-hexanodioico, ácido dicloroacético y ácido 13-bromotetradecanoico. Entre los alcoholes con mayor abundancia se encontraron: 2,3-butanediol, propanol, 2-(viniloxi)etanol, 2-(metoxi metoxi), etoxietano, pentanal, heptanal, tridecadienal, 14-metil-8-hexadecanal, 1,4,7,10,13,16-hexaocaciclooctadecano, isopropanol, butanal, 2-amino,1-propanol, 1-hexadecanol, etanedial, octadecadienol y 2-bromo-etanol. También se encontraron presentes otros compuestos con abundancias importantes, como el acetonitrilo, 15-crown-5 y 1-metildodecilamina.

Del día 33 al 37 se encontró la presencia en los cromatogramas de compuestos aminados con abundancias mayores en comparación con los alcoholes y ácidos orgánicos que aún se encontraban presentes. Entre los compuestos aminados encontrados destacaron: N-metil-1-octamina, 2,3,4,5-tetrahidropiridazina, 5-metil-2-hexanamina, 1-metildecilamina, 1-hexil-1-nitrociclohexano y aunque su abundancia fue mínima, se encontraron más de 20 picos (de 45-50) por cromatograma para óxido nitroso y dietilamina. Todavía se encontraron presentes alcoholes, ácidos orgánicos y compuestos hidrocarbonados, tales como: metil 13-octadecanoato, n-propil 11 octadecanoato, 2-[2-[2-(2-butoxi)etoxi]etoxi]etanol, 6-heptano-2,4-diol, 9-octadecanal, ácido cis-vaccénico, ácido pentanoico, ácido oleico, ácidos octadecanoicos, hexano trifluoroacetato 9-decan-1-ol, acetato 11,13-dimetil-12-tetradecan-1-ol y 12-Crown-4.

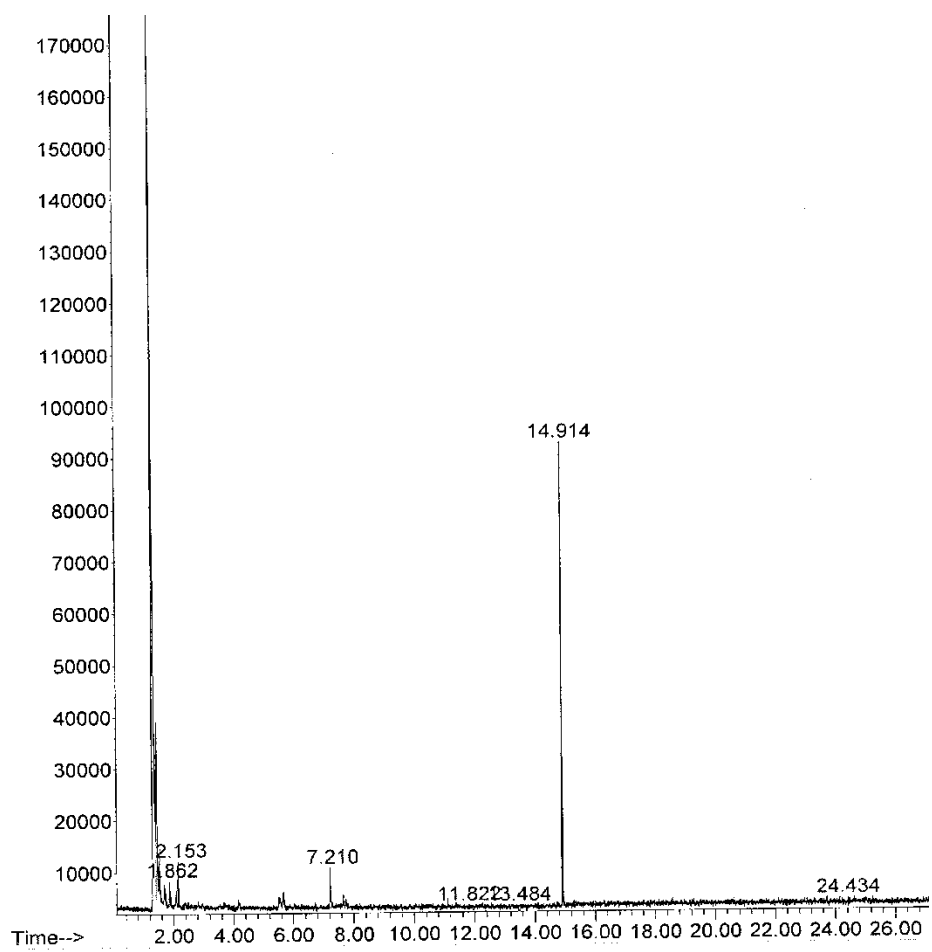


Figura 29. Cromatograma de compuestos presentes en el medio con 2000 mg de DEHF/L al día 3 de crecimiento de *L. edodes*. En el eje y se reporta la abundancia de los compuestos y el eje x corresponde al RT de cada compuesto.

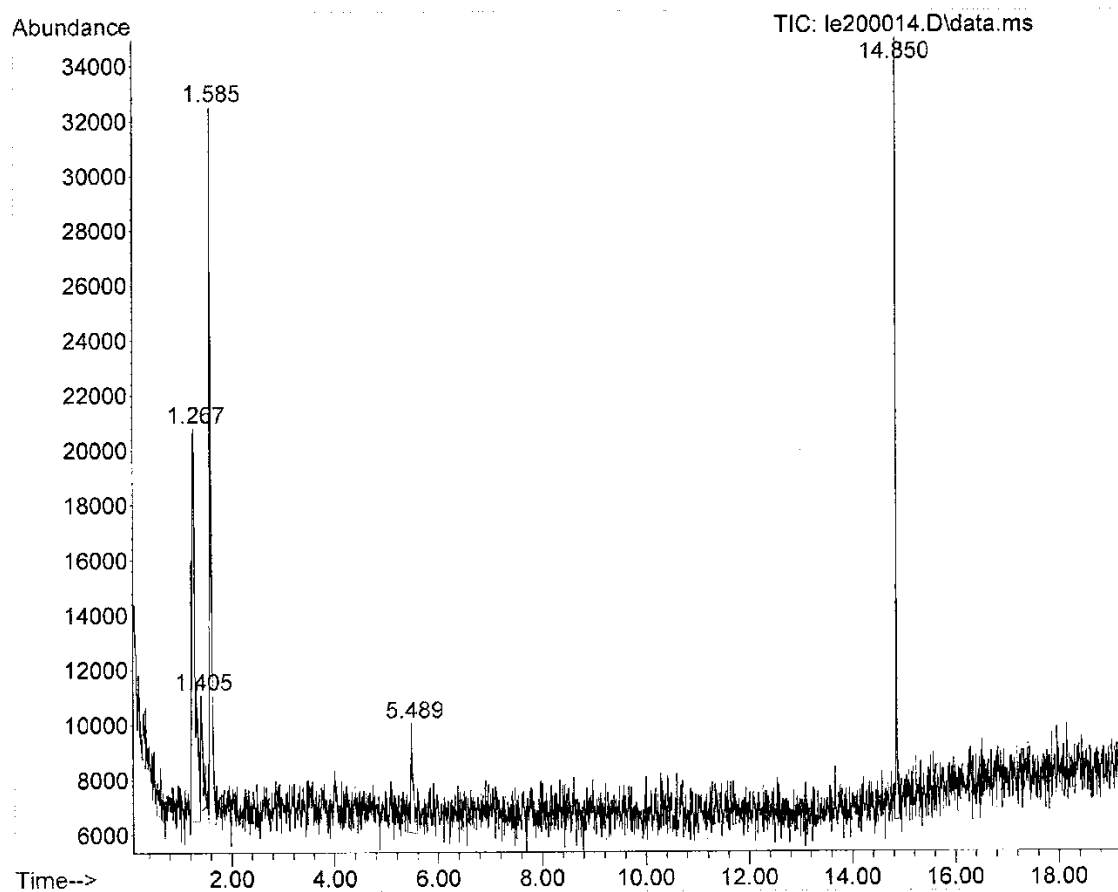


Figura 30. Cromatograma de compuestos presentes en el medio con 2000 mg de DEHF/L al día 14 de crecimiento de *L. edodes*. En el eje y se reporta la abundancia de los compuestos y el eje x corresponde al RT de cada compuesto.

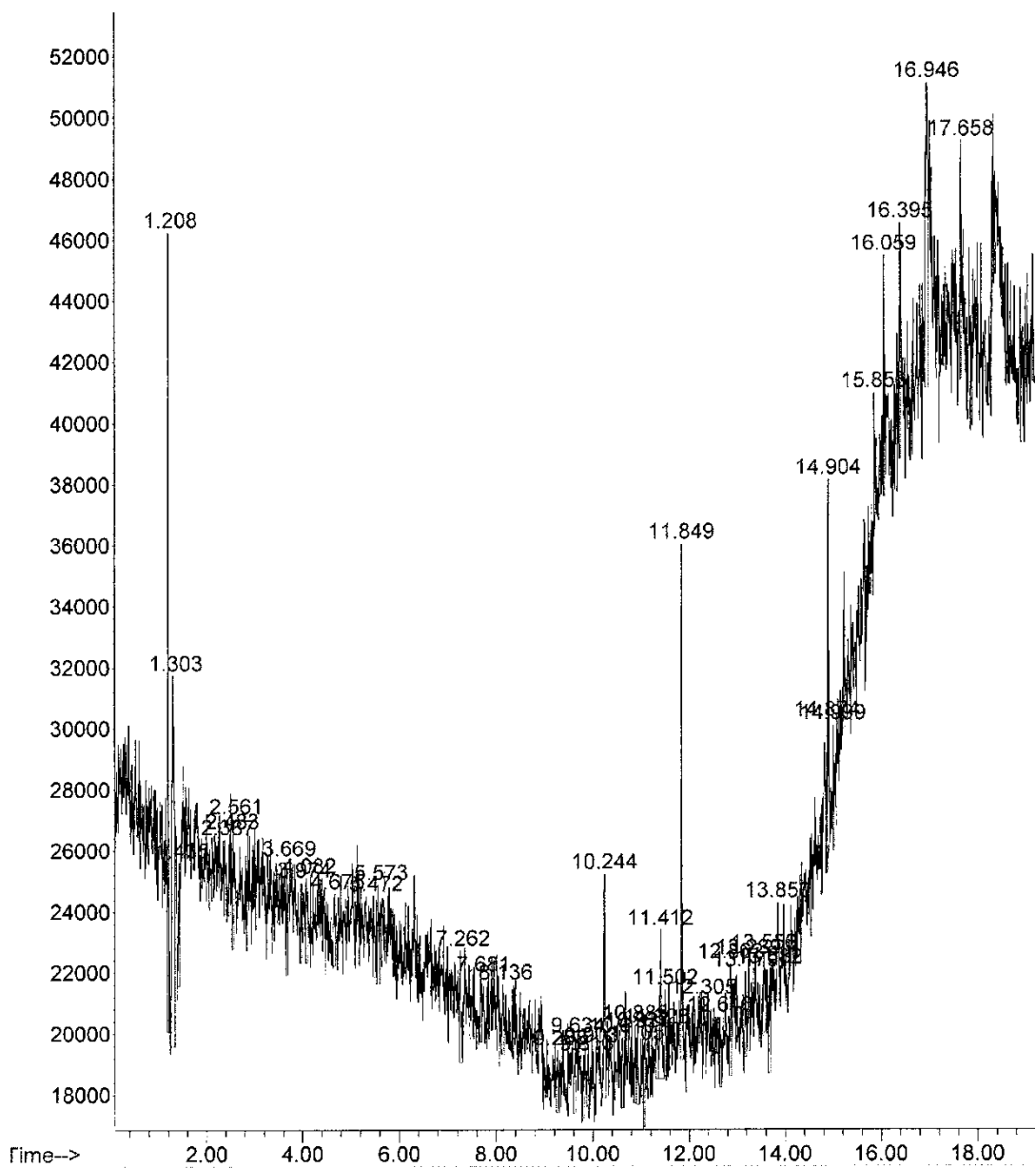


Figura 31. Cromatograma de compuestos presentes en el medio con 2000 mg de DEHF/L al día 32 de crecimiento de *L. edodes*. En el eje y se reporta la abundancia de los compuestos y el eje x corresponde al RT de cada compuesto.

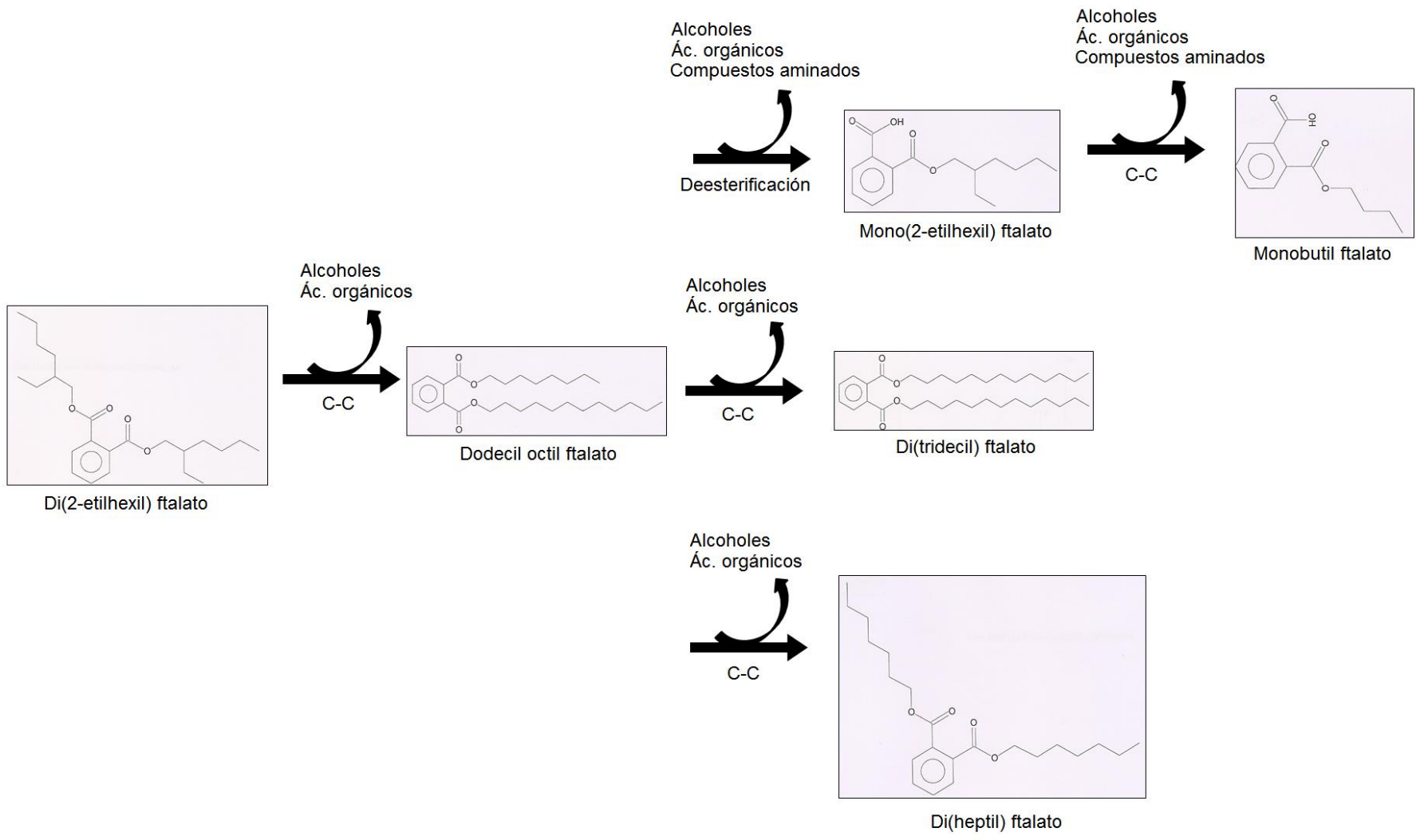


Figura 32. Propuesta de ruta de degradación de di(2-etilhexil ftalato) (DEHF) por el hongo comestible *Lentinula edodes*, pasando por la formación de dodecil octil ftalato, diheptil ftalato, ditridecil ftalato, monobutil ftalato y mono(2-etilhexil) ftalato (MEHF) como último metabolito formado.

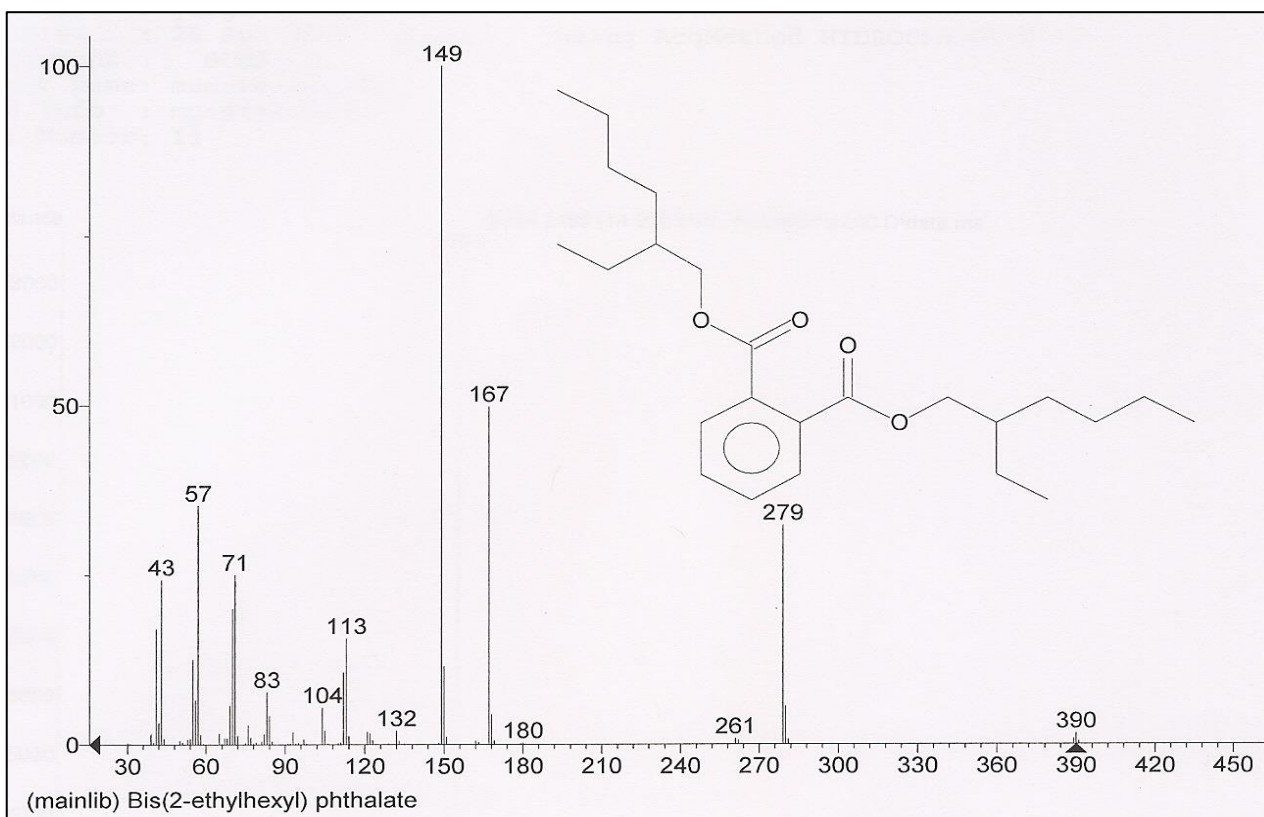


Figura 33. Espectro de masas del DEHF y sus respectivos iones. La relación m/z se representa en el eje x y el porcentaje de la abundancia relativa en el eje y .

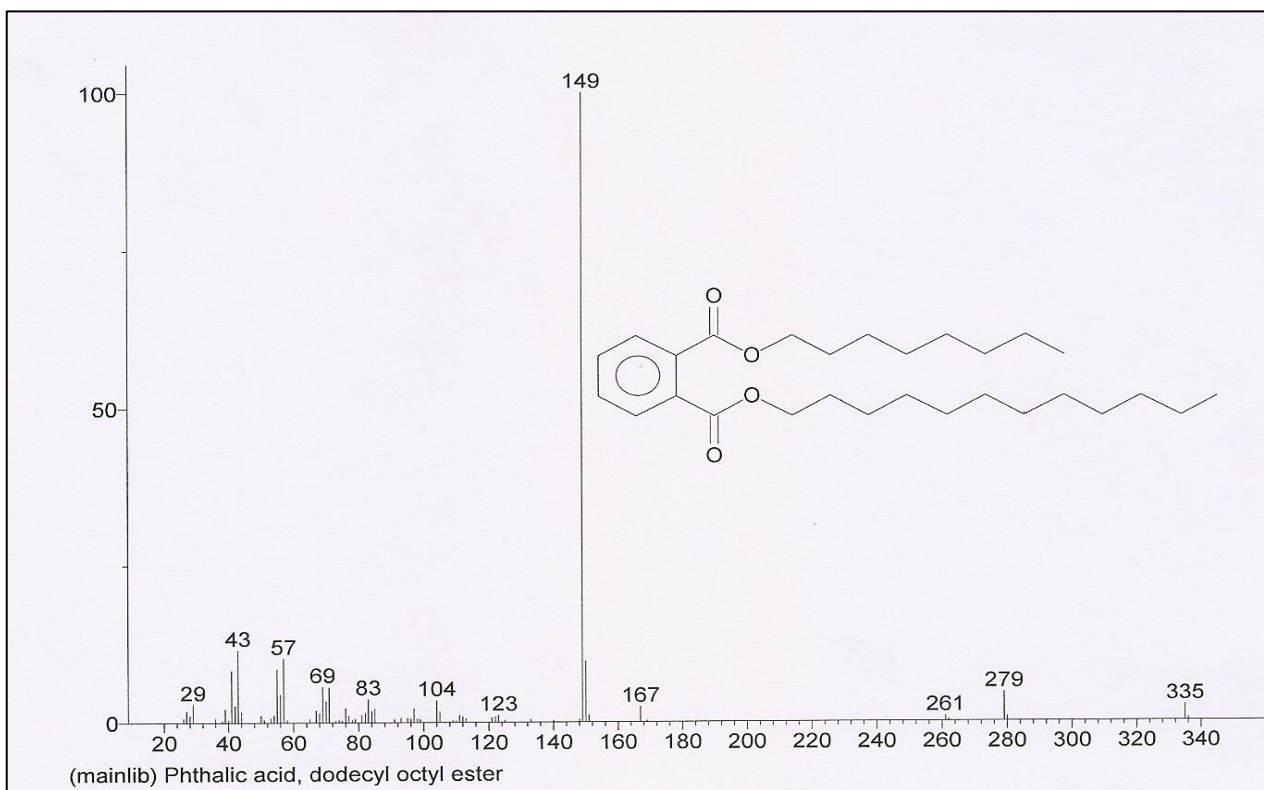


Figura 34. Espectro de masas del dodeciloctil ftalato y sus respectivos iones. La relación m/z se representa en el eje x y el porcentaje de la abundancia relativa en el eje y .

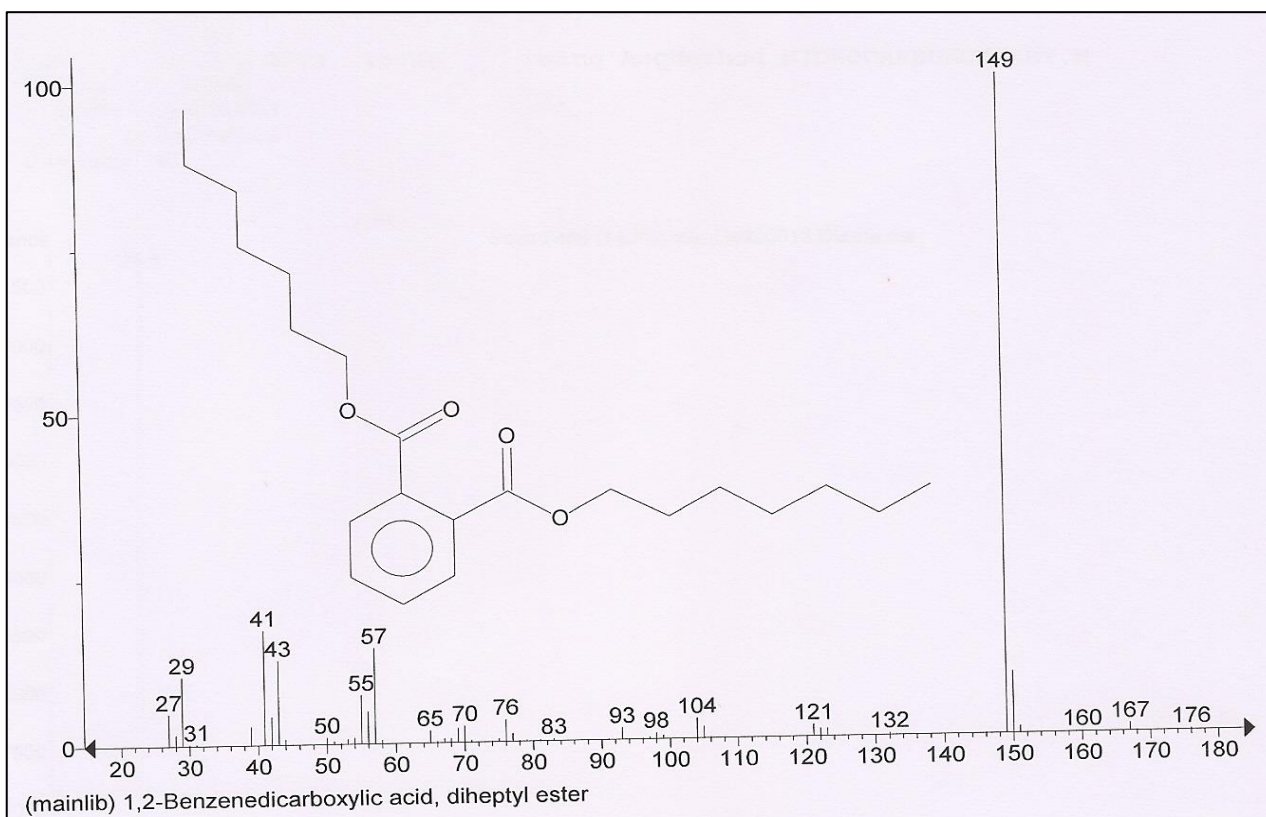


Figura 35. Espectro de masas del diheptil ftalato y sus respectivos iones. La relación m/z se representa en el eje x y el porcentaje de la abundancia relativa en el eje y.

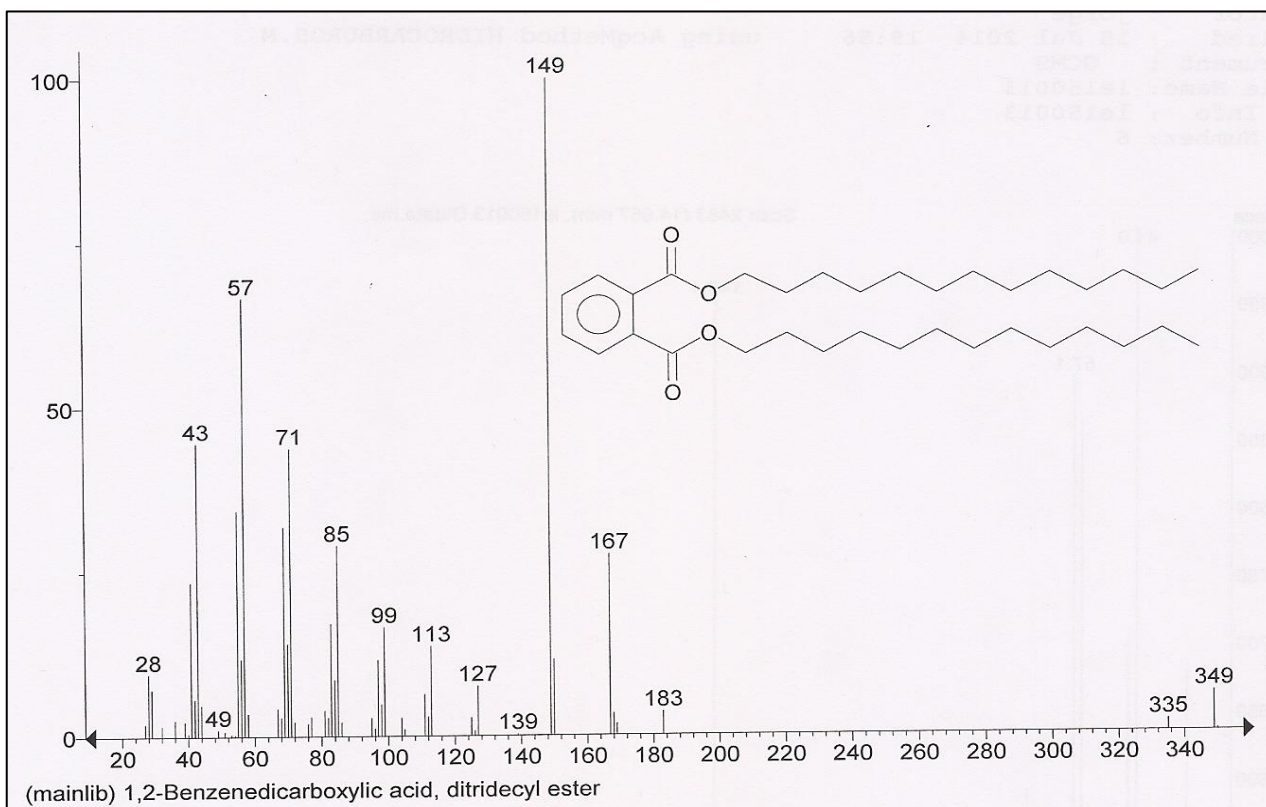


Figura 36. Espectro de masas del ditridecyl ftalato y sus respectivos iones. La relación m/z se representa en el eje x y el porcentaje de la abundancia relativa en el eje y.

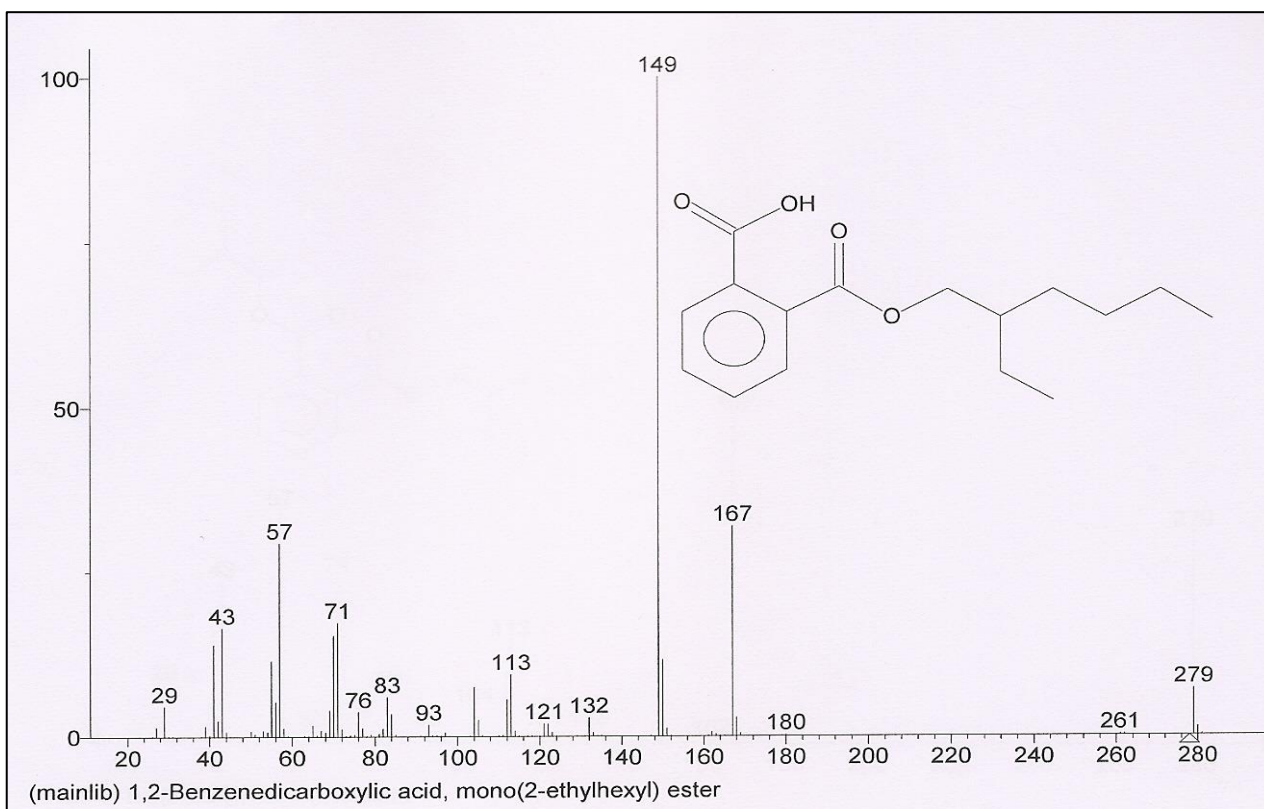


Figura 37. Espectro de masas del MEHF y sus respectivos iones. La relación m/z se representa en el eje x y el porcentaje de la abundancia relativa en el eje y .

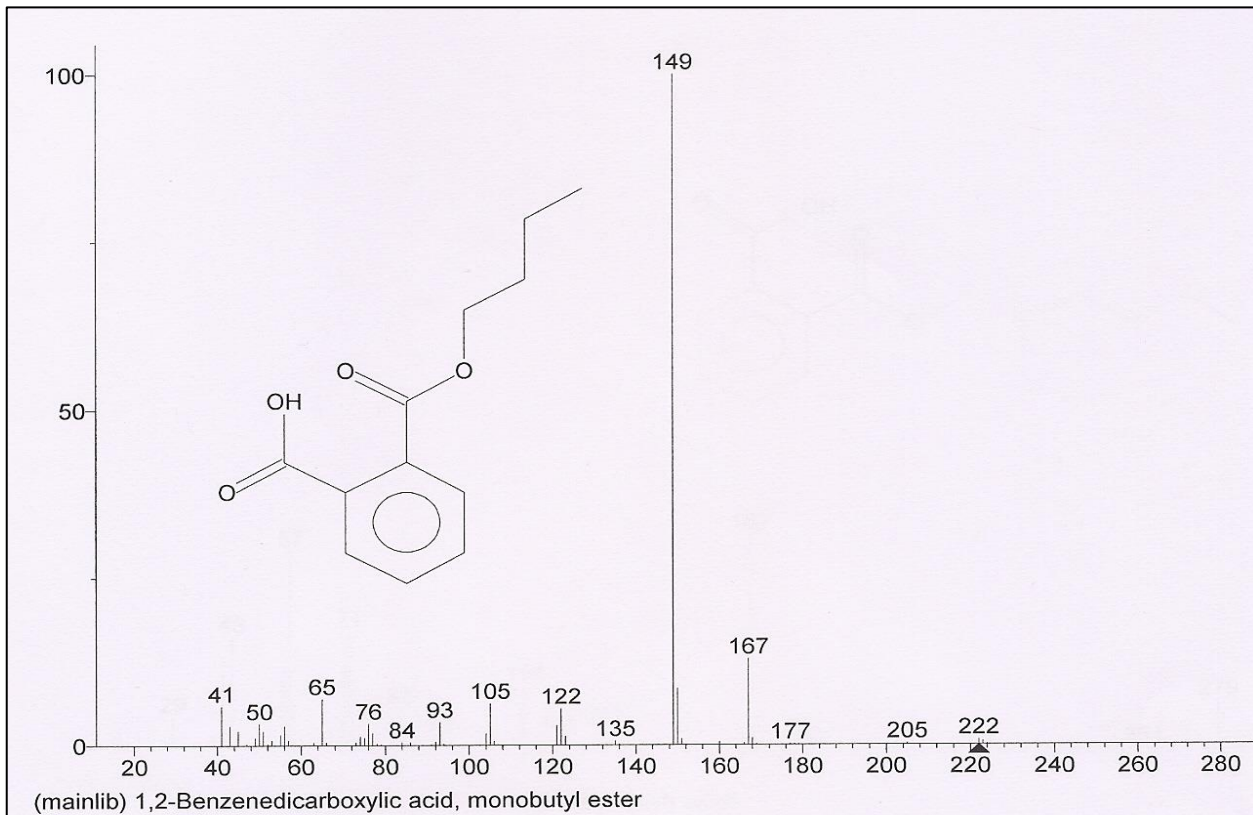


Figura 38. Espectro de masas del monobutil ftalato y sus respectivos iones. La relación m/z se representa en el eje x y el porcentaje de la abundancia relativa en el eje y .

6.3.2. *Pleurotus ostreatus* ATCC32783

En la figura 39 se observa el porcentaje de degradación de 1500 y 2000 mg de DEHF/L durante los primeros 14 y 16 días de fermentación por la cepa *P. ostreatus* ATCC32783, ya que únicamente en estos días de crecimiento se detectó presencia del compuesto.

En el medio con 1500 mg de DEHF/L (Figura 39A) durante los primeros 14 días de cultivo, el 100% del DEHF se degradó a MEHF, encontrando este metabolito a partir del día 3 de incubación y conservándose presente en el medio hasta el último día de la fermentación.

De acuerdo con los cromatogramas obtenidos (Figura 40) en esta concentración de DEHF, durante los 14 días que estuvo presente, el pico de DEHF fue detectado con tiempos de retención (RT) de 15.400, 15.406 y 14.961 min. Dada esta variación en los RT, los espectros de masa confirmaron la presencia de DEHF con una relación m/z de 390 cuando se presentaba cualquiera de los RT anteriores. Durante los días 2 a 4 se detectó la posible presencia de ciclohexil 2-pentil ftalato (Figura 44) y diisooctil ftalato (Figura 45), ya que el porcentaje de probabilidad arrojado por el cromatograma fue el mismo. Cabe resaltar que la relación m/z (149) del pico principal de ambos metabolitos fue la misma que para el pico principal del DEHF, MEHF y el resto de los metabolitos encontrados cuya conformación estructural se da a partir de ácido ftálico.

En la figura 39A se observa que el 50% del DEHF se degradó dentro de los primeros 3 días de cultivo y el 50% restantes en los siguientes 11 días.

El pico del MEHF (Figura 42) presentó RT de 15.400, 14.967, 14.961, 14.903 y 14.897 min, sin embargo, los espectros de masa confirmaron la presencia de este metabolito con una relación m/z de 280 (durante los días 3 a 24 de la fermentación). También se detectó la presencia de di(2-metilbutil) ftalato (Figura 46) el día 6 de la fermentación.

En la figura 39B se presenta el porcentaje de degradación de 2000 mg de DEHF/L por la misma cepa, encontrado que al día 16 de fermentación el 100% del DEHF en el medio se degradó a MEHF. En un medio con mayor concentración de DEHF, el tiempo en que se comienza a degradar el compuesto es el doble en comparación con el medio con 1500 mg/L, ya que el 50% del compuesto se degrada en los primeros 6 días y el resto del compuesto se va degradando en los 10 días siguientes.

En este tratamiento durante los días 2 a 4 también se detectó la posible presencia de ciclohexil 2-pentil ftalato (Figura 45) y diisooctil ftalato (Figura 46). El MEHF se encontró presente en el medio a partir del día 4, manteniéndose presente en el cultivo hasta el final de la fermentación.

De acuerdo con los cromatogramas obtenidos (Figura 41) con esta cepa, durante los 16 días que estuvo presente el DEHF, su pico fue detectado con tiempos de retención (RT) de 14.892, 14.897 y 14.898, min. A pesar de esta variación en los RT, los espectros de masa confirmaron la presencia de DEHF con una relación m/z de 390 siempre que se presentaba cualquiera de los RT anteriores. El pico del MEHF (Figura 43) presentó RT de 14.814, 14.808 y 14.898 min, sin embargo, los espectros de masa confirmaron la presencia de este metabolito con una relación m/z de 280 (durante los días 4 a 24 de la fermentación). También se detectó la posible presencia de di(2-metilbutil) ftalato (figura 33) el día 8 de la fermentación.

En esta investigación se encontró la presencia de otros compuestos de elevado peso molecular además del MEHF como posibles metabolitos resultantes de la degradación del DEHF. Estos resultados nos confirman que en presencia aún de DEHF y durante la formación del propio MEHF se pueden estar formando otros metabolitos dialquílicos de cadena larga, cuyos productos de degradación reflejan cambios en parámetros como el perfil de pH y perfil enzimático de las enzimas participantes en dichos procesos degradativos.

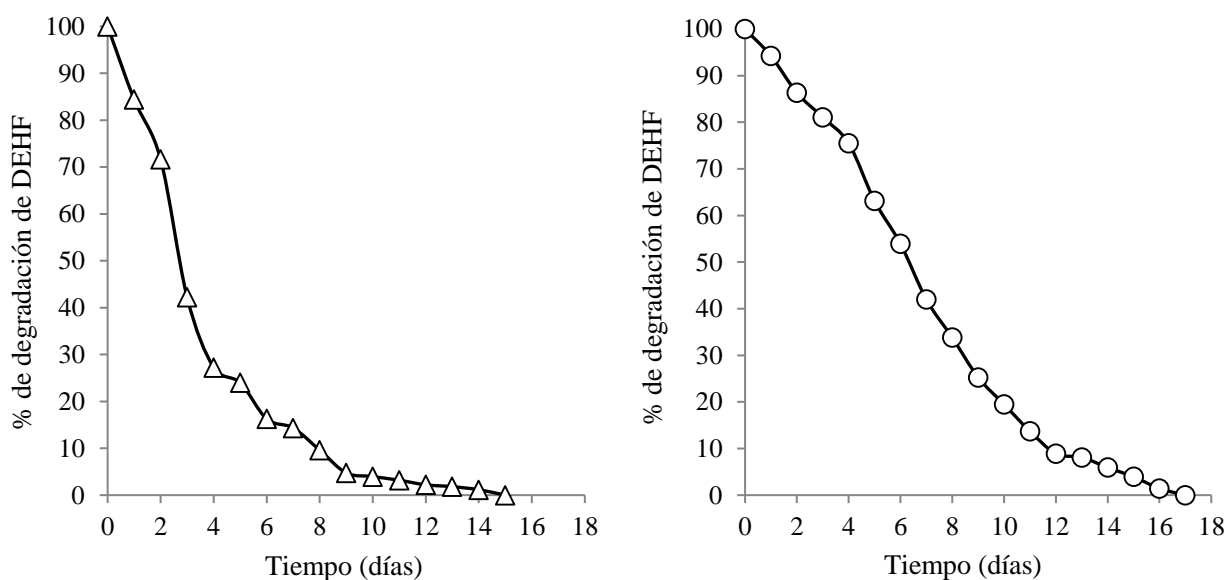


Figura 39. A). Degradación de 1500 (Δ) y B) 2000 (\circ) mg de DEHF/L por *Pleurotus ostreatus* ATCC32783 en fermentación sumergida.

Con base en los resultados obtenidos se propone una ruta de degradación para el DEHF por el hongo comestible *P. ostreatus* ATCC32783 (Figura 44). En la primera reacción, a partir del DEHF probablemente se formó ciclohexil 2-pentil ftalato y diisooctil ftalato. Para la formación del primer metabolito, de una cadena lateral se rompió primeramente el grupo etilo de la ramificación del carbono 2 y en el carbono 1 de la misma cadena se unió un grupo metilo, y después un grupo etilo del extremo de la misma cadena se separó para conformar el 2-pentil éster. En la otra cadena se llevó a cabo primero una deesterificación de la cadena completa y por otra reacción, ahora de esterificación se unió un ciclohexano al grupo éster. En el caso del diisooctil ftalato, a ambas cadenas alquílicas se les separó el grupo etilo ramificado y posteriormente cada uno se unió al final de una de las cadenas.

Durante este posible primer paso (primeros 4 días de cultivo) se liberaron compuestos con abundancias importantes en el cromatograma, los cuales favorecieron una ligera acidificación del medio. Dichos metabolitos fueron: (3-metil-oxiran-2-il) metanol, 2,3-butanediol, 9,17-octadecadienal, ácido carbónico, ácido n-hexadecanoico, ácido cis-11,14-eicosadienoico, ácido tetradecanoico, hexano, y N,N-dimetil-propanamida,

Es posible que un segundo paso se esté dando a partir del día 4, con la formación de MEHF a partir del DEHF a través de una reacción de deesterificación de una de sus cadenas alquílicas.

Otro paso importante que se llevó a cabo probablemente al mismo tiempo que los tres metabolitos previamente mencionados a partir del DEHF, es la conformación de di(2-metilbutil) ftalato. Este compuesto se obtuvo de una primera separación del grupo metilo terminal en la ramificación de las cadenas alquílicas y posteriormente de la separación del grupo etilo de los extremos de las mismas cadenas alquílicas. Cabe resaltar que la presencia de este posible metabolito únicamente se detectó el día 6 y 8 en los medios con 1500 y 2000 mg de DEHF/L.

Durante estas reacciones, del día 5 a 10 se liberaron metabolitos que favorecieron los cambios ligeramente básicos observados en el perfil de pH. Estos metabolitos fueron: 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-pirano-4-uno, 9,17-octadienal, etanol, glicidol, ácido tetradecenoico, ácido n-hexadecanoico, ácido oleico, hexano, oleilamina, 1-heptadecanamina, N,N-dimetil-propanamida, ácido imidodicarbónico, L-alanina, dimetil-(6-metil-2-tioxo-[1,3,2]oxadiazofinan-2-il)amina, 1,4-di(3-aminopropil)piperazina, 2,7-dimetil-3-tioxo-5-oxo-4,6(2H)-dihidro-1,2,4-triazepina.

Del día 11 al 20 se liberó glicidol, 2-[2-(2-butoxi)etoxi]etanol, etanol, 1,4,7,10,13,16-hexaoxociclooctadecano, 1,3,3-trimetoxibutano, 3,-diisopropoxi-1,1,1,5,5,5-hexanetiltrisiloxano, 1,4-dioxan-2-il hidroperóxido, hexametil-ciclotrisiloxano, hexametil-2-etilacridina ciclotrisiloxano, heptametiltrisiloxano, 15-crown-5, etano, 3-amino-6metil-tieno[2,3-b]piridina-2-carboxamida, ácido silícico, ácido hexanoico, ácido carbónico, isonitrosoacetofenona y 2-etilacridina.

Del día 21 a 24 se liberaron los siguientes compuestos: 2-(viniloxi)-etanol, 1,3,3-trimetoxibutano, pentaetilen glicol, 1-[2-[2-(1-metiletoxi)etoxi]etoxi]-etanol, aminopropanol,, 2-cloro-4,6di(metiltio)-1,3,5-triacina, N-metil-1-adamantanoacetamida, bencenometanamina, 2-fluoroacetamida, aminopropanol, 7-amino[1,2,4]triazol[1,5-alpiramidina-6-ácido carboxílico, N-[4-(trimetilsilil)fenil]acetamida, propanamida, 4-dehidroxi-N-(4,5-metilenedioxi.2-nitrobencilideno)tiramina, 1,1,1,3,5,5,5-heptametiltrisiloxano, 2-etilacridina, ácido silísico, 1-bezazireno-1-ácido carboxílico. Cabe resaltar que los compuestos aminados presentaron las mayores abundancias en los cromatogramas.

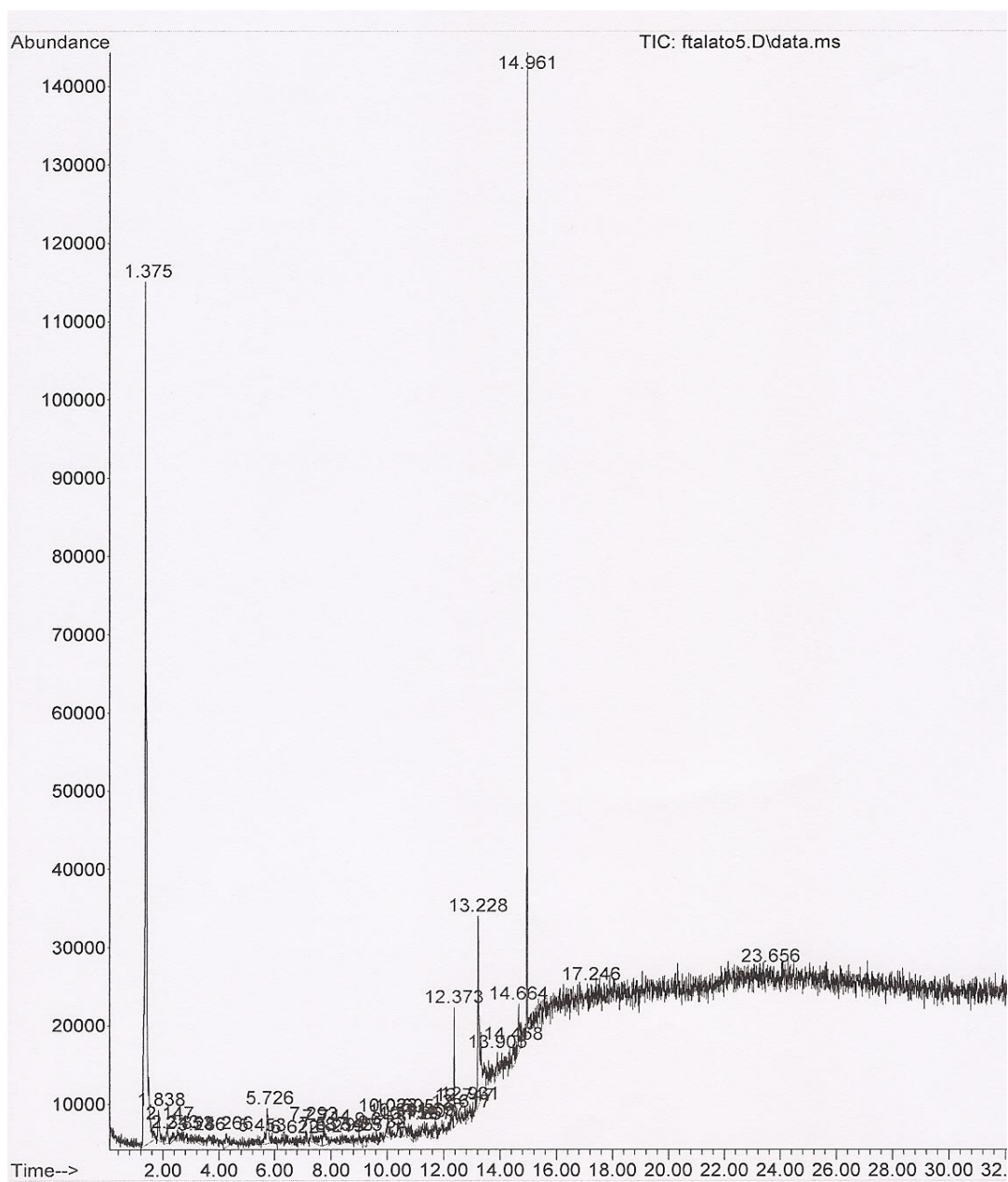


Figura 40. Cromatograma de compuestos presentes en el medio con 1500 mg de DEHF/L al día 4 de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* ATCC32783. En el eje y se reporta la abundancia de los compuestos y el eje x corresponde al RT de cada compuesto.

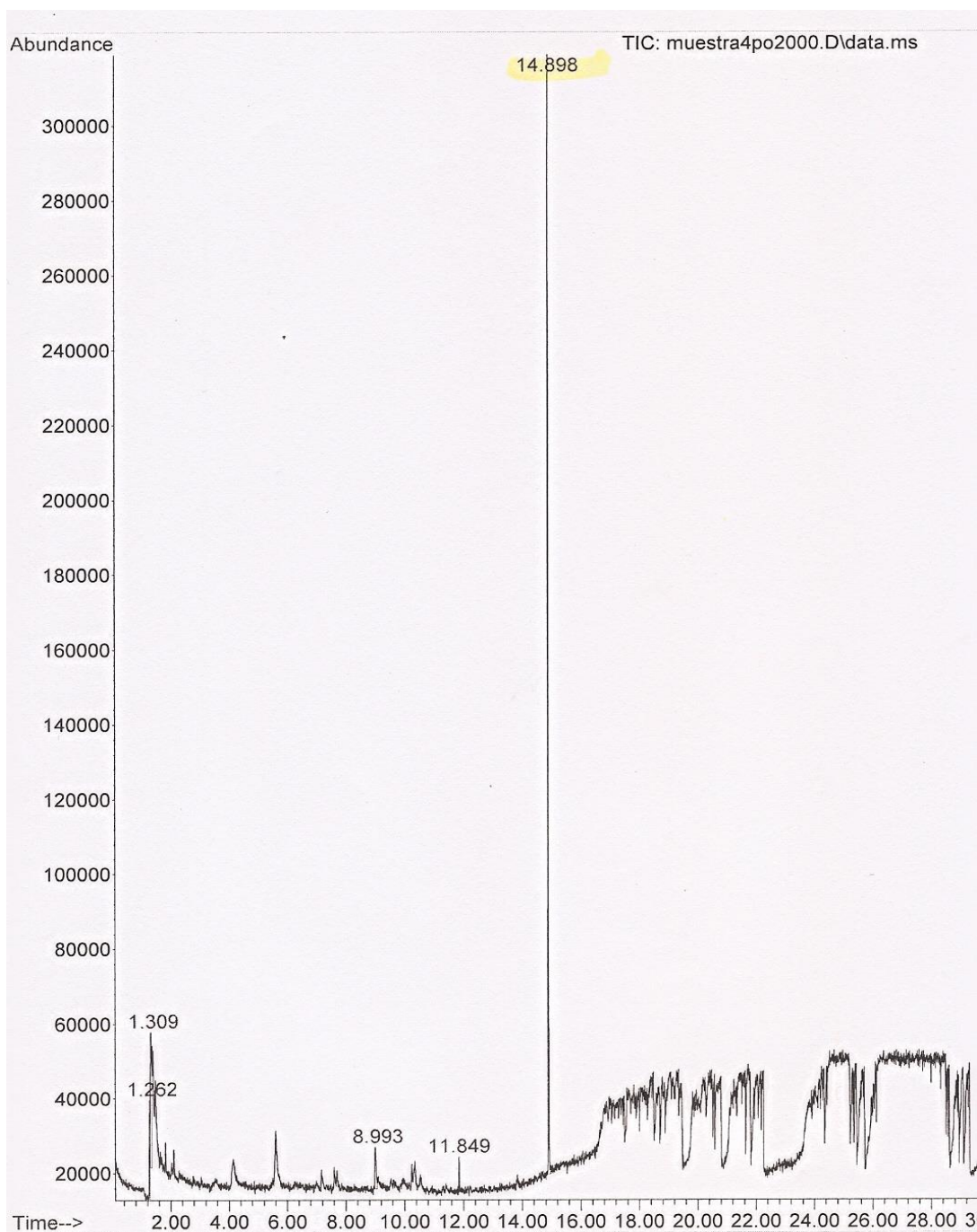


Figura 41. Cromatograma de compuestos presentes en el medio con 2000 mg de DEHF/L al día 4 de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* ATCC32783. En el eje y se reporta la abundancia de los compuestos y el eje x corresponde al RT de cada compuesto.

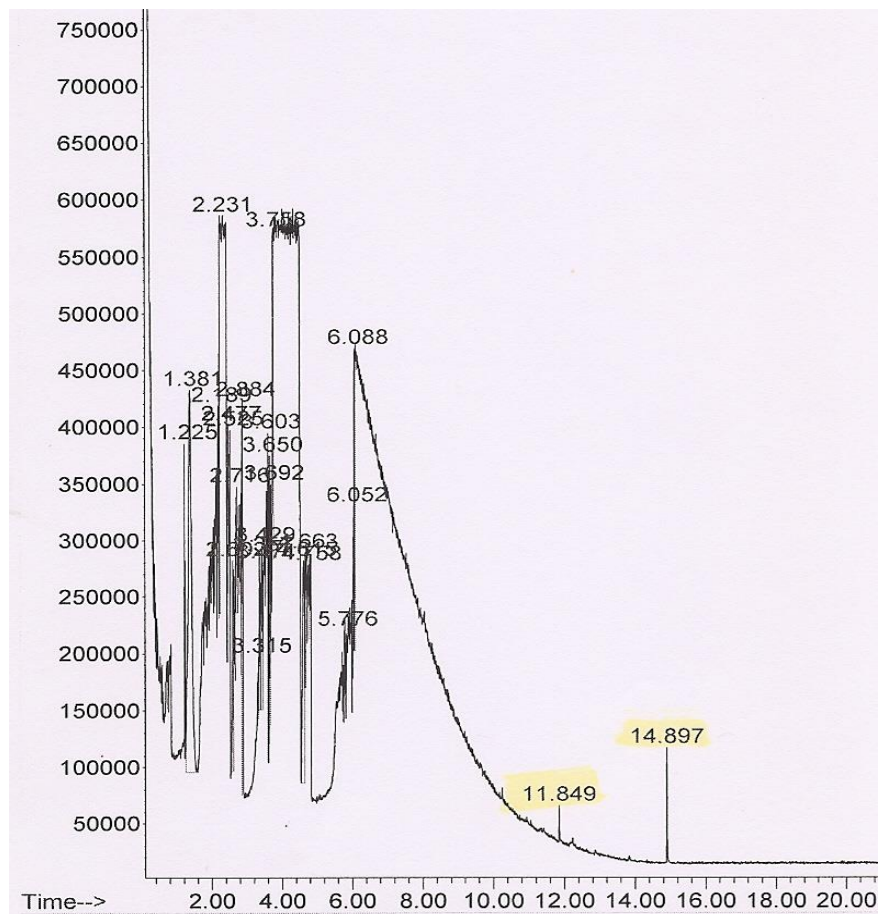


Figura 42. Cromatograma de compuestos presentes en el medio con 1500 mg de DEHF/L al día 22 de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* ATCC32783. En el eje y se reporta la abundancia de los compuestos y el eje x corresponde al RT de cada compuesto.

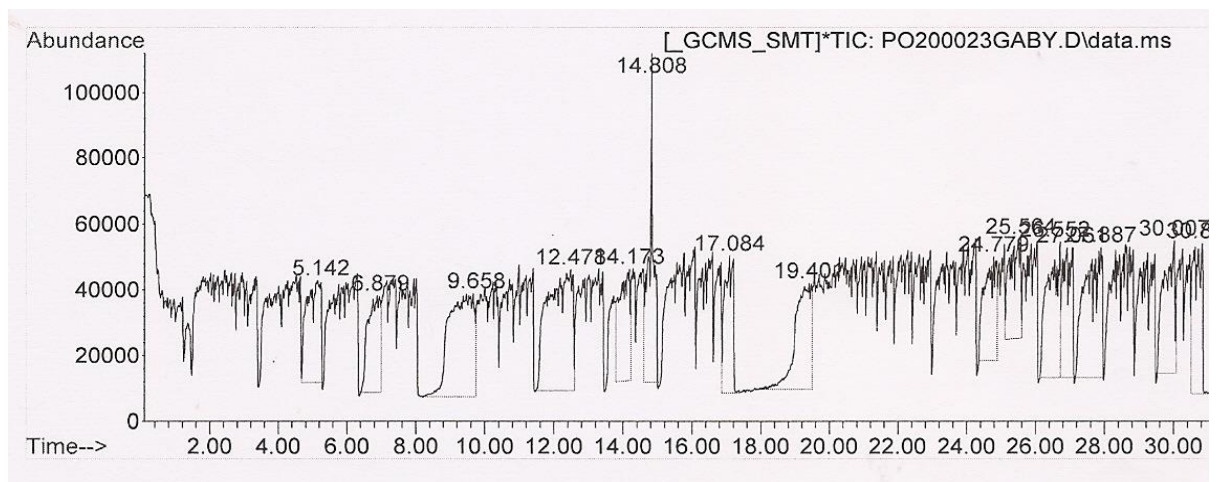


Figura 43. Cromatograma de compuestos presentes en el medio con 2000 mg de DEHF/L al día 23 de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* ATCC32783. En el eje y se reporta la abundancia de los compuestos y el eje x corresponde al RT de cada compuesto.

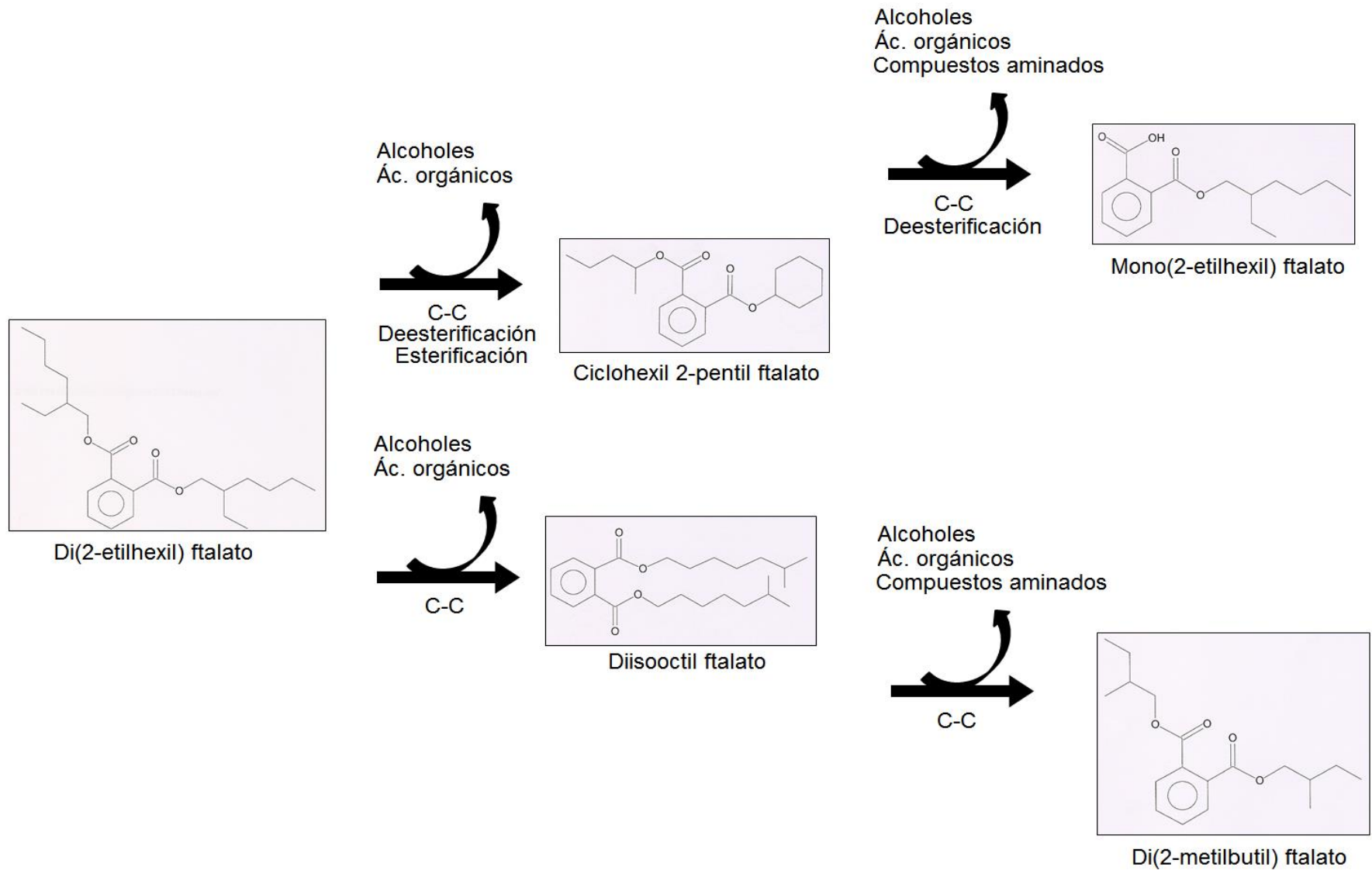


Figura 44. Propuesta de ruta de degradación de di(2-etilhexil ftalato) (DEHF) por el hongo comestible *Pleurotus ostreatus* ATCC32783, pasando por la formación de ciclohexil 2-pentil ftalato, diisooctil ftalato, di(2-metilbutil) ftalato y mono(2-etilhexil) ftalato (MEHF) como último metabolito formado.

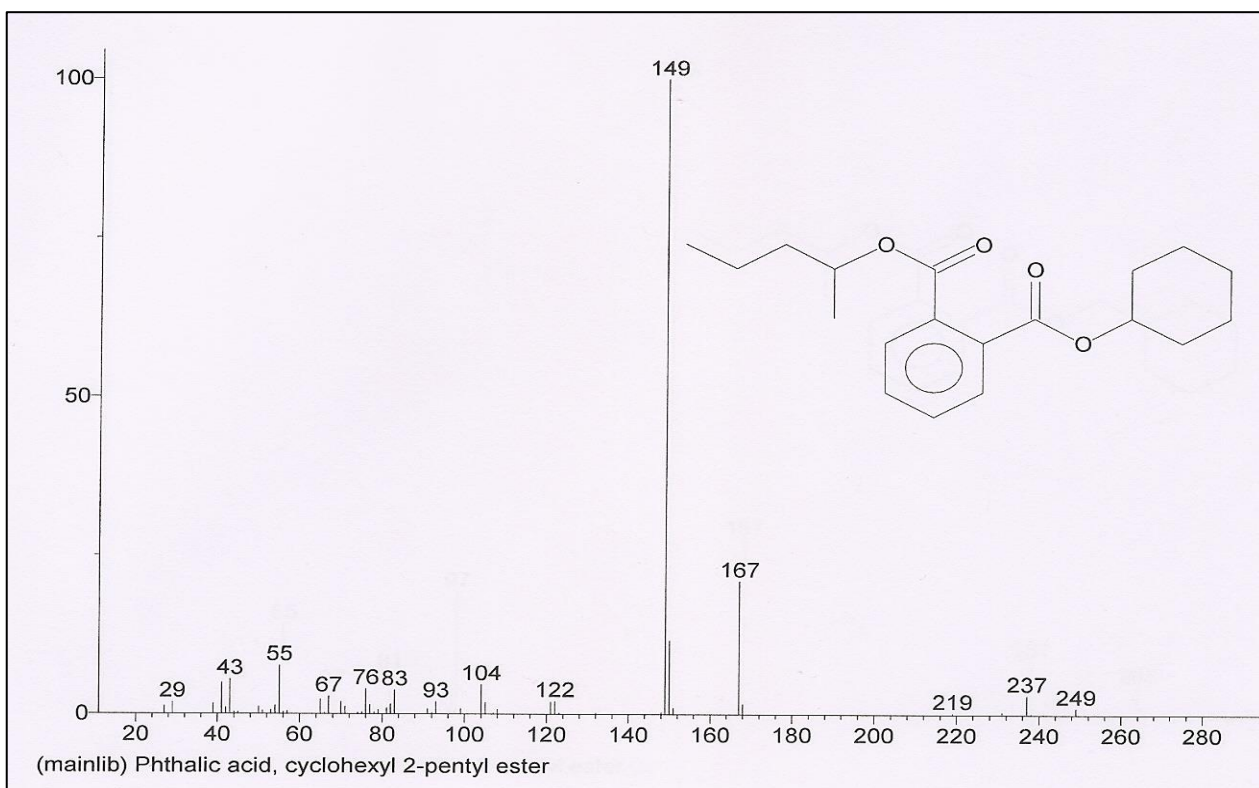


Figura 45. Espectro de masas del ciclohexil 2-pentil ftalato y sus respectivos iones. La relación m/z se representa en el eje x y el porcentaje de la abundancia relativa en el eje y.

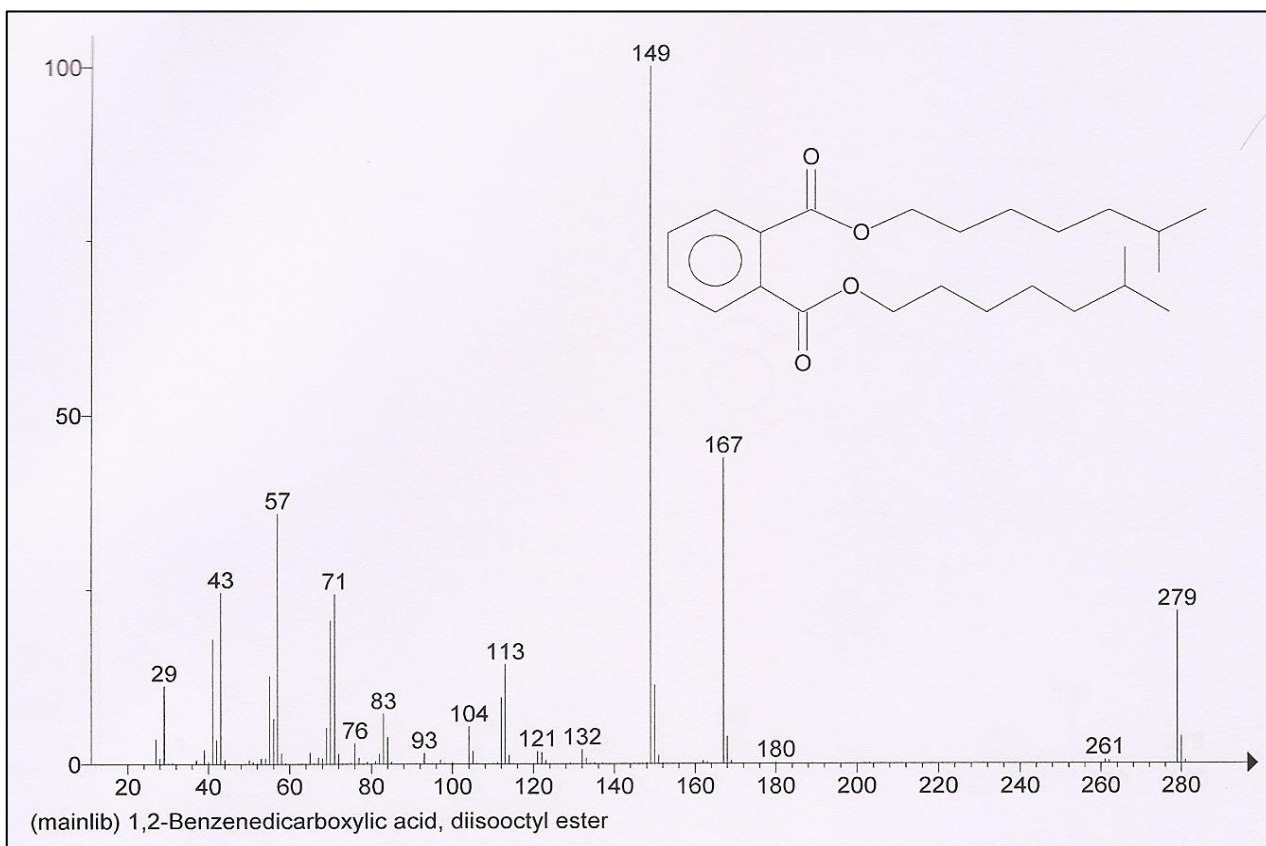


Figura 46. Espectro de masas del diisooctil ftalato y sus respectivos iones. La relación m/z se representa en el eje x y el porcentaje de la abundancia relativa en el eje y.

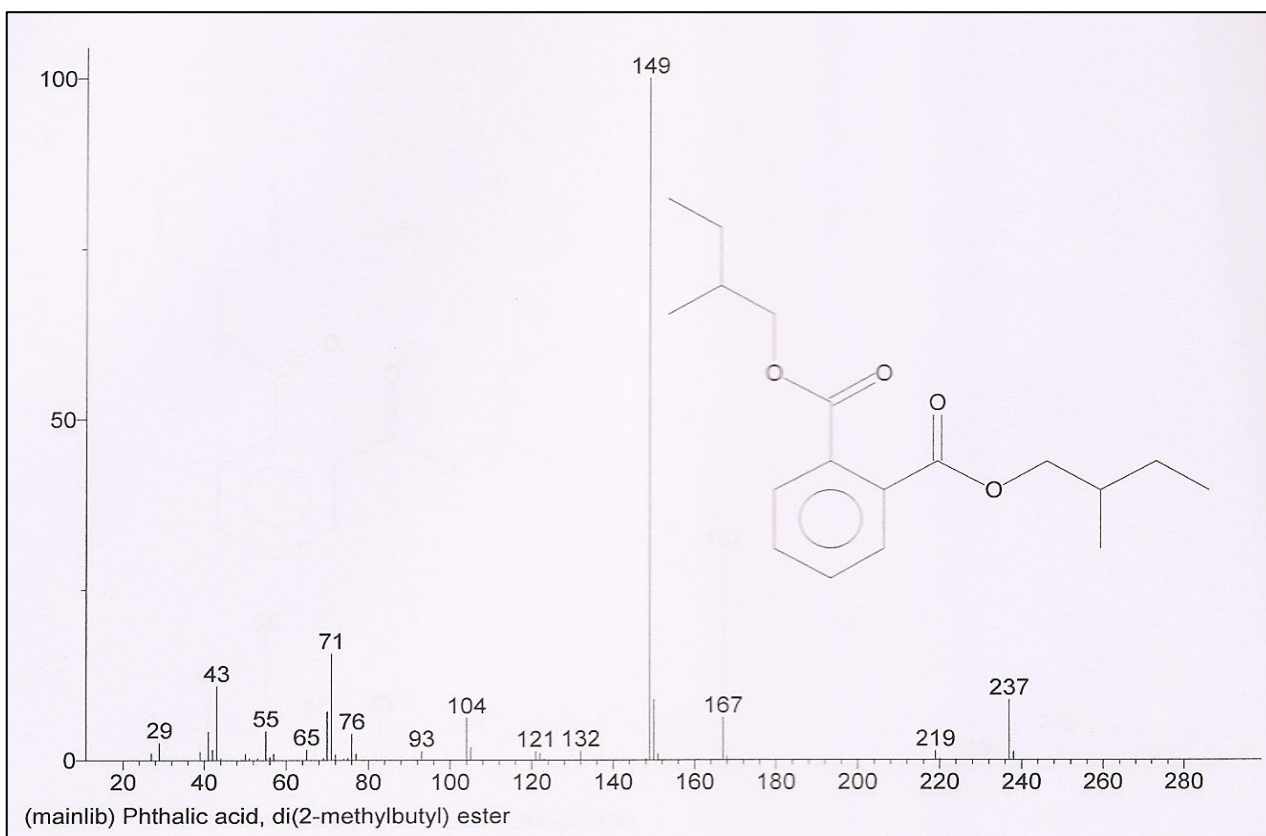


Figura 47. Espectro de masas del di(2-metilbutil) ftalato y sus respectivos iones. La relación m/z se representa en el eje x y el porcentaje de la abundancia relativa en el eje y .

6.3.3. *Pleurotus pulmonarius*

En la figura 48 se observa el porcentaje de degradación de 1500 y 2000 mg de DEHF/L por la cepa *Pleurotus pulmonarius* durante los primeros 12 y 14 días de fermentación, dado que únicamente en estos días de crecimiento se detectó presencia del compuesto.

En el medio con 1500 mg de DEHF/L (Figura 48A) durante los primeros 12 días de cultivo, el 100% del DEHF se degradó en 2-etilhexil hexil ftalato, ciclohexil 2-pentil ftalato, di(2-metilbutil) ftalato y MEHF, encontrando este último metabolito a partir del día 2 de incubación y hasta el final de la fermentación. El 50% del DEHF se degradó dentro de los primeros 4 días de fermentación y el 50% restantes en los siguientes 8 días.

Los cromatogramas obtenidos (Figura 49) de este tratamiento mostraron que el DEHF estuvo presente durante los primeros 12 días de cultivo con un pico cuyos RT variaron entre valores de 14.897, 14.908, y 14.926 min. Sin embargo, los espectros de masa confirmaron la presencia de DEHF con una relación m/z de 390 cuando se presentaba cualquiera de los RT anteriores. Durante los días 1 a 5 se detectó la posible presencia de 2-etilhexil hexil ftalato (figura 54), del día 1 a 8 del ciclohexil 2-pentil ftalato y del día 3 a 6 del di(2-metilbutil) ftalato. Cabe resaltar que la relación m/z (149) del pico principal de los tres metabolitos fue la misma que para el pico principal del DEHF, el MEHF y el resto de los metabolitos encontrados cuya conformación estructural se da a partir de ácido ftálico.

El pico del MEHF (Figura 51) presentó RT de 14.908 y 14.914 min, no obstante, los espectros de masa confirmaron la presencia de este metabolito con una relación m/z de 280 (durante los días 2 a 23 de la fermentación).

En la figura 48B se muestra el porcentaje de degradación de 2000 mg de DEHF/L por la misma cepa, encontrado que al día 14 de fermentación el 100% del DEHF en el medio se degradó hasta MEHF. En un medio con mayor concentración de DEHF, el tiempo en que se comienza a degradar el compuesto no es tan diferente en comparación con el medio con 1500 mg/L, ya que el 50% del compuesto se degrada en los primeros 5 días y el resto se fue degradando en los 9 días siguientes.

En este tratamiento durante los días 2 a 5 también se detectó la posible presencia de 2-etilhexil hexil ftalato, de ciclohexil 2-pentil ftalato del día 2 a 8 y de di(2-metilbutil) ftalato del día 4 a 7. El MEHF se encontró presente en el medio a partir del día 4, manteniéndose presente en el cultivo hasta el final de la fermentación.

De acuerdo con los cromatogramas obtenidos (Figura 50), durante los 14 días que estuvo presente el DEHF, su pico fue detectado con tiempos de retención (RT) de 14.914, 14.932, min. A pesar de esta variación en los RT, los espectros de masa confirmaron la presencia de DEHF con una relación m/z de 390 siempre que se presentaba cualquiera de los RT anteriores.

El pico del MEHF (Figura 52) presentó RT de 14.914 y 15.400 min, sin embargo, las probabilidades mostradas en los cromatogramas y los espectros de masa confirmaron la presencia de este metabolito con una relación m/z de 280.

Dado que se encontró la posible presencia de otros compuestos de elevado peso molecular además del MEHF como posibles metabolitos resultantes de la degradación de DEHF, los resultados nos confirman que en presencia aún de DEHF y durante la formación del propio MEHF se pueden estar formando otros metabolitos dialquílicos de cadena larga, cuyos productos de degradación reflejan cambios en parámetros como el perfil de pH y perfiles enzimáticos.

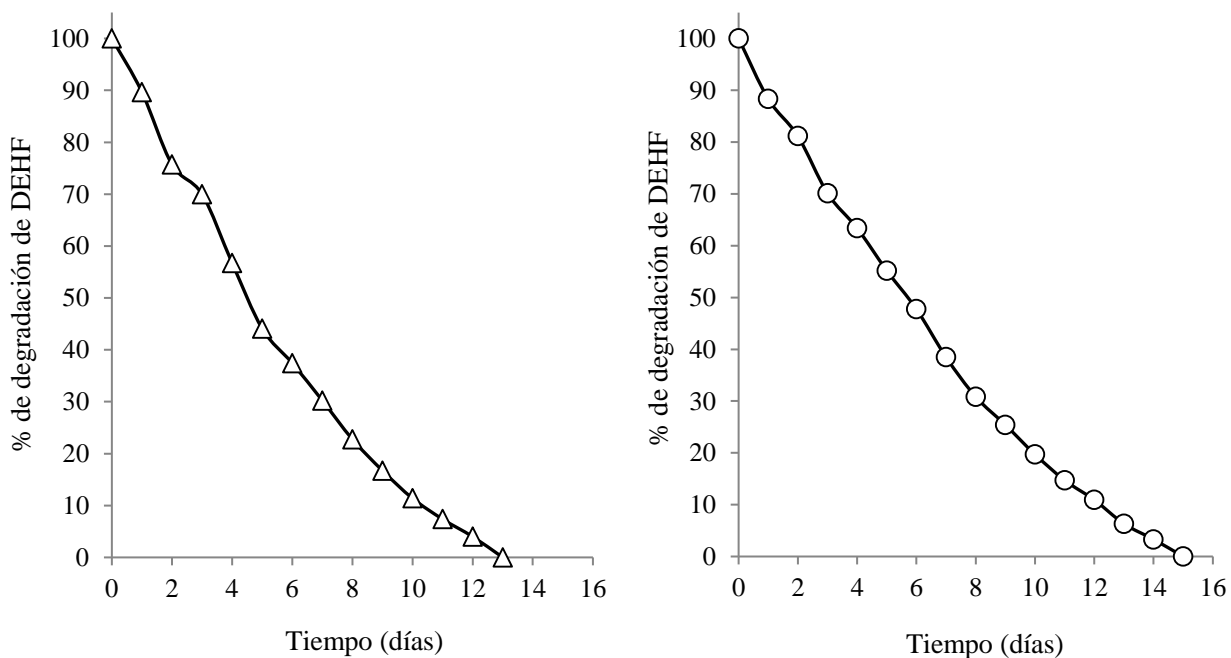


Figura 48. A). Degradación de 1500 (Δ) y B) 2000 (\circ) mg de DEHF/L por *Pleurotus pulmonarius* en fermentación sumergida.

Con base en los resultados obtenidos por los cromatogramas y espectros de masa se propuso una ruta de degradación para el DEHF por el hongo comestible *P. pulmonarius* (Figura 53). Durante la primera reacción, a partir del DEHF probablemente se formó 2-etilhexil hexil ftalato, ya que este metabolito es casi el mismo que el DEHF y la energía implicada en su formación sería menor, dado que únicamente se escinde de una de las cadenas alquílicas el grupo etil ramificado del carbono 2.

En una segunda reacción se formó ciclohexil 2-pentil ftalato, para lo que de una cadena lateral se rompió primeramente el grupo etilo de la ramificación del carbono 2 y en el carbono 1 de la misma cadena se unió un grupo metilo, después un grupo etilo del extremo de la misma cadena se separaría, conformando el 2-pentil éster. En la otra cadena probablemente se llevó a cabo primero una deesterificación de la cadena completa y a través de otra reacción (pero ahora de esterificación) se unió un ciclohexano al grupo éster.

Otro paso importante que se llevó a cabo a partir del DEHF, fue la conformación de di(2metilbutil) ftalato. Este compuesto se obtuvo de una primera separación del grupo metilo terminal en la ramificación de las cadenas alquílicas y posteriormente de la separación del grupo etilo de los extremos de las mismas cadenas alquílicas.

La última transformación se dio a partir de la formación de MEHF a partir del DEHF a través de una reacción de deesterificación de una de sus cadenas alquílicas.

A lo largo de la fermentación se liberaron compuestos con abundancias importantes obtenidas en los cromatogramas, los cuales mantuvieron niveles de pH neutros en el medio durante los 23 días de cultivo. Dichos metabolitos ácidos, con grupo alcohol e hidrocarbonados fueron: ácido acético, ácido tiocianico, ácido 4-metil-2-oxovalérico, ácido 4-nitro-3-oxobutírico, etanol, hexanol, heptanal, dimetilhidrazona propanal, 5-(hidroximetil)2-furancarboxaldehído, 5-isopropilideno-3,3-dimetil-dihidrofurano-2-uno, monoacetato de 1,2,3-propanetriol, 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-pirano-4-uno, 3,5-dihidroxi-2-metil-4H-pirano-4-uno, dihidro-4-hidroxi-2(3H)-furanona, dihidro-3,5-dimetil-2(3H)-furanona, 1-propanol, 2-butanal, 1,2-crown-4, pentaetilenglicol, 1,2-bencenodiol, ciclobutanol, 2,4-dihidro-2,4,5-trimetil-3H-pirazol-3-uno, 1,3-hidroxy-2-propanona, 1,4,7,10,13,16-hexaoxaciclooctadecano, 2,3-dimetil-,cis-oxirano, 2-metoxi-2-octano, metil silano y hexano.

Los compuestos aminados fueron: tris(dimetilamino)metano, dimetilhidrazona, triacetina, N-hidroxi-N-metil-metamina, 5-metil-quinolina, adenina, 5-metil-pirimidin-4,6-diol, 4,5-diamino-6-hidroxipirimidina, 1,3,5-triazina-2,4,6-triamina, 1,4-dimetil-piperazina, N,N-dimetil-propanamida, N-metil-1,3-propanediamina, 4-aminopirazol(3,4-d)pirinamida, o-metilisourea hidrógeno sulfato, 2-metil-azetidina, 2,3-2H-4-metil-imidazol-2-uno, isonitrosoacetofenona y 5-amino-1H-imidazo-4-carbozamida.

Cabe mencionar que después del día 15 las abundancias en todos los metabolitos formados (a excepción de los ésteres de ftalato) observados en los cromatogramas disminuyeron considerablemente, siendo la más alta de 9%.

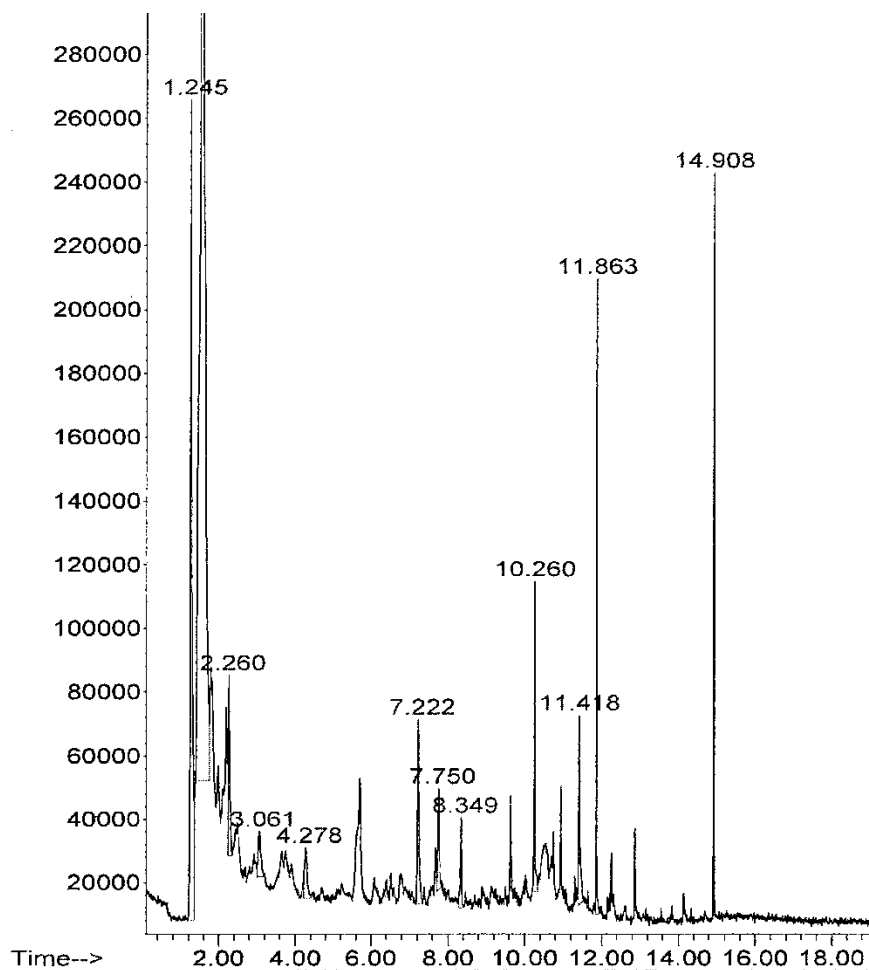


Figura 49. Cromatograma de compuestos presentes en el medio con 1500 mg de DEHF/L al día 3 de crecimiento de *Pleurotus pulmonarius*. En el eje y se reporta la abundancia de los compuestos y el eje x corresponde al RT de cada compuesto.

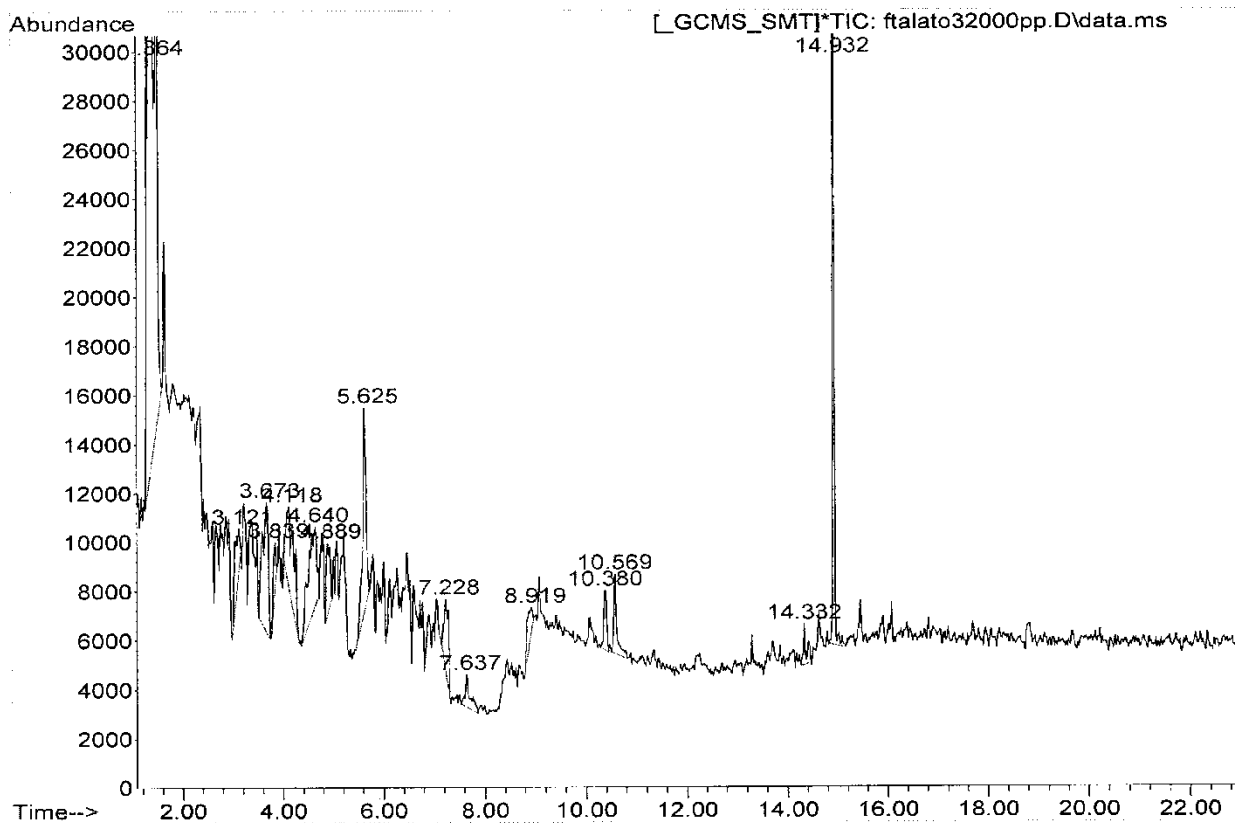


Figura 50. Cromatograma de compuestos presentes en el medio con 2000 mg de DEHF/L al día 3 de crecimiento de *Pleurotus pulmonarius*. En el eje y se reporta la abundancia de los compuestos y el eje x corresponde al RT de cada compuesto.

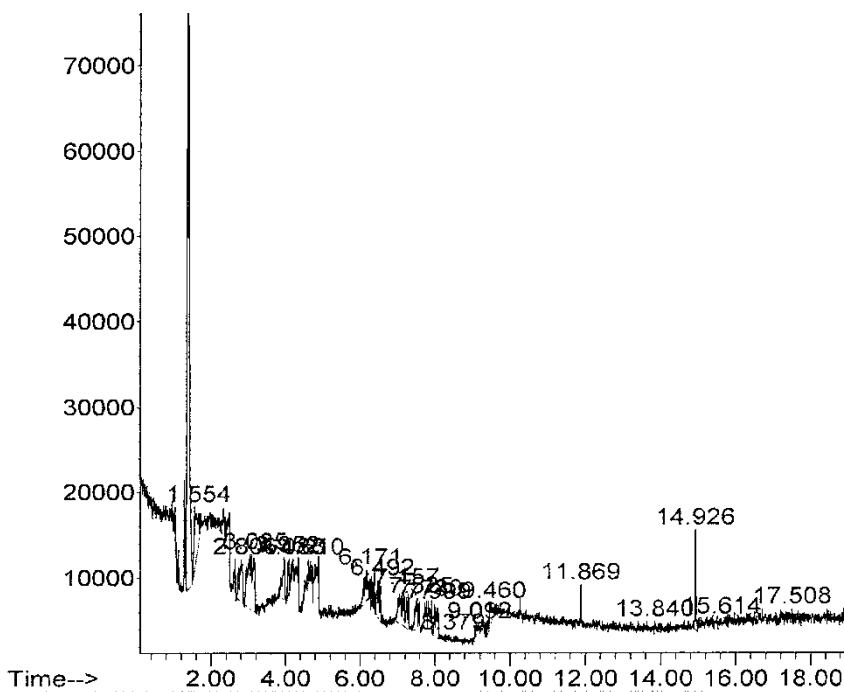


Figura 51. Cromatograma de compuestos presentes en el medio con 1500 mg de DEHF/L al día 22 de crecimiento de *Pleurotus pulmonarius*. En el eje y se reporta la abundancia de los compuestos y el eje x corresponde al RT de cada compuesto.

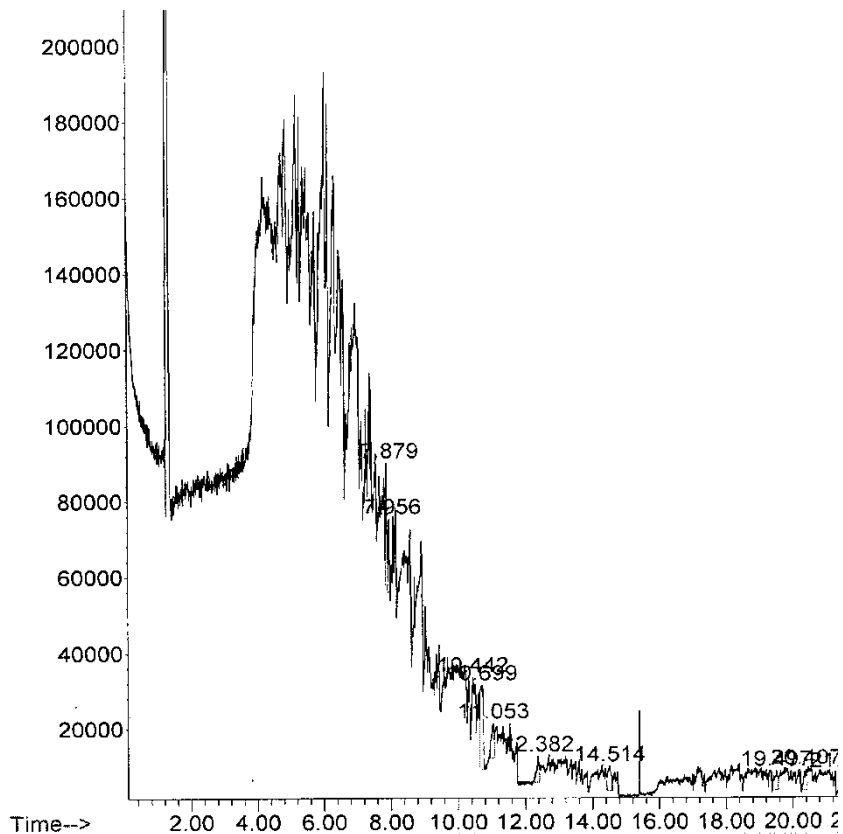


Figura .52 Cromatograma de compuestos presentes en el medio con 1500 mg de DEHF/L al día 22 de crecimiento de *Pleurotus pumlmonarius*. En el eje y se reporta la abundancia de los compuestos y el eje x corresponde al RT de cada compuesto.

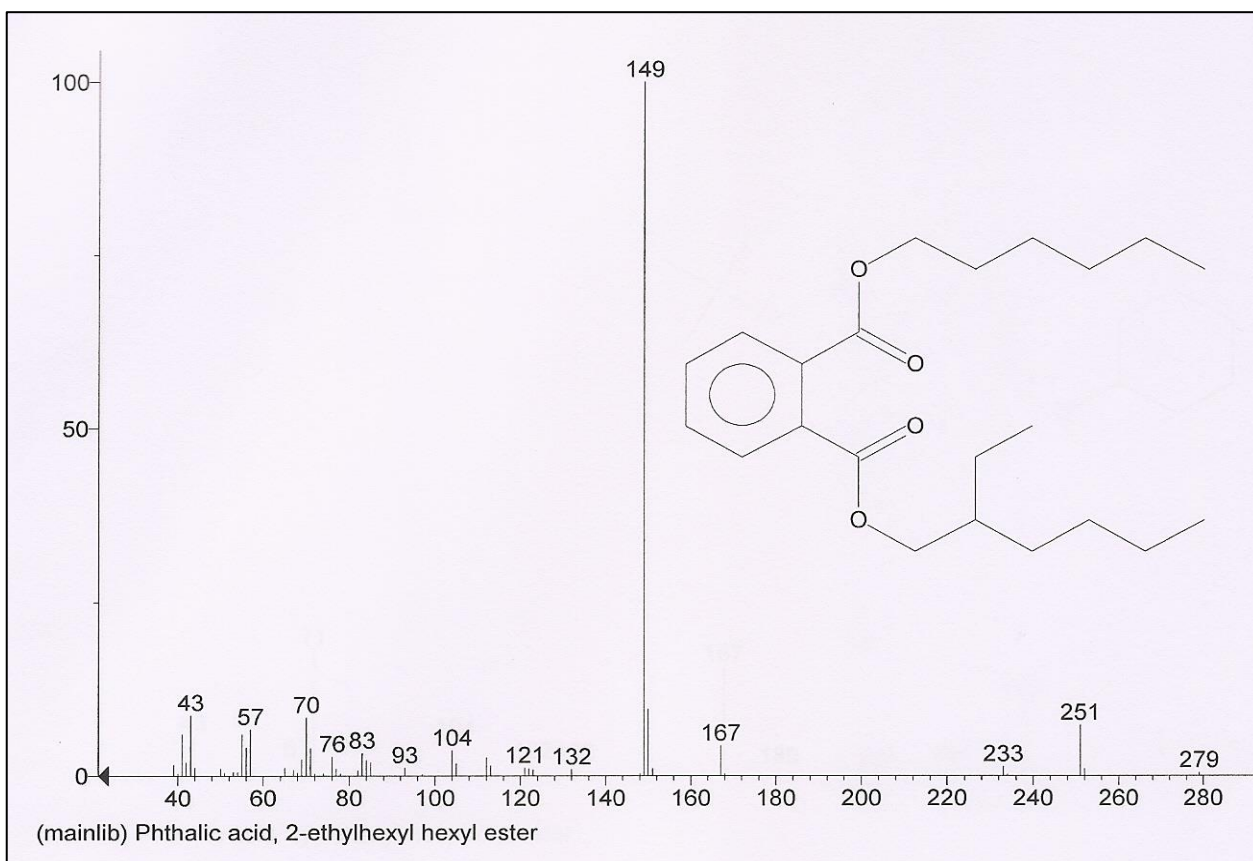


Figura 54. Espectro de masas del 2-etilhexil hexil ftalato y sus respectivos iones. La relación m/z se representa en el eje x y el porcentaje de la abundancia relativa en el eje y.

6.4. Perfil de pH

6.4.1. *Lentinula edodes*

En la Figura 55 se muestra el perfil de pH de *L. edodes*, el cual en los tres tratamientos presentó una tendencia general a disminuir hasta niveles de 2.9 y mantenerse oscilando en niveles ácidos.

En el medio SAF el pH se mantuvo en niveles neutros de hasta 5.5 durante la fase de crecimiento de adaptación, durante la fase de crecimiento exponencial el pH decreció hasta 3.2 y durante la fase estacionaria se mantuvo en niveles de 3.27 a 4.1.

En el tratamiento que contenía 1500 mg de DEHF/L el pH decayó al punto más ácido obtenido, que fue de 2.9. Éste se presentó el día 18, tiempo que se encuentra dentro del inicio de la fase exponencial de crecimiento de este hongo y punto en el que ya se ha terminado de degradar el DEHF y hay presencia de MEHF en el medio. Lo que va acompañado de la formación de ácidos orgánicos y alcohol conformados a partir de la separación de la cadena alquílica que da lugar al MEHF.

En el medio con 2000 mg de DEHF/L el pH disminuyó a valores ligeramente menos ácidos en comparación con el otro tratamiento que contenía DEHF, con el valor más ácido obtenido de 3.01, el cual se presentó durante la fase de crecimiento estacionaria.

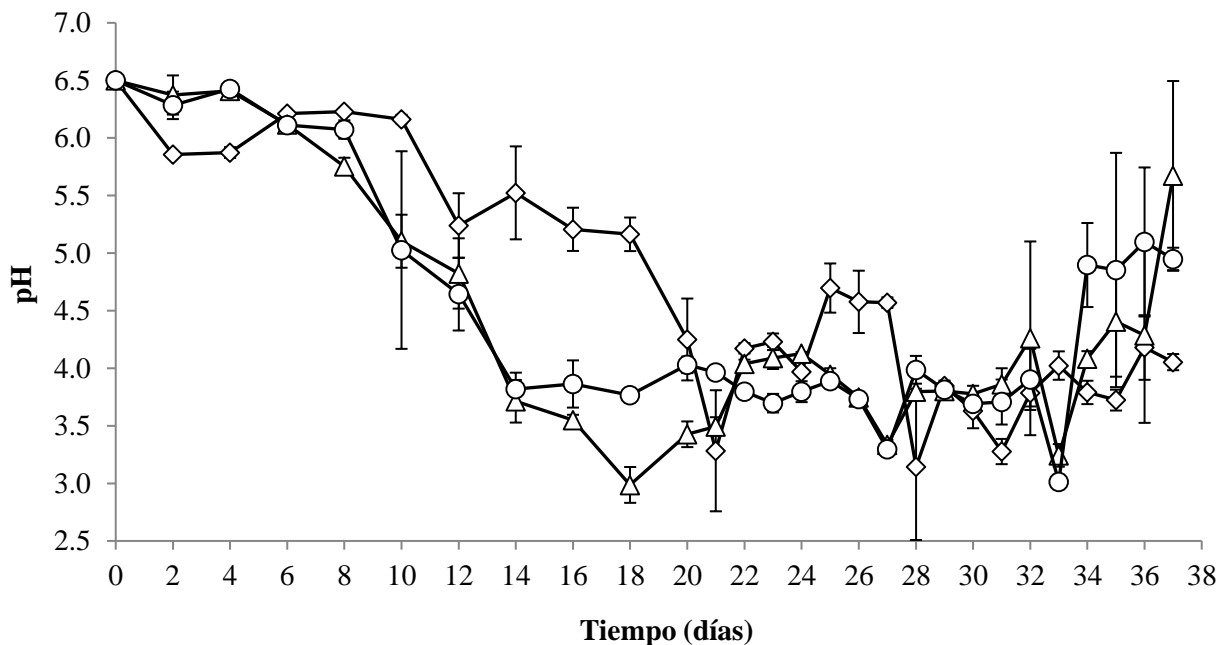


Figura 55. Perfil de pH durante el crecimiento de *Lentinula edodes* en medio sin adición de ftalato (MSAF) (\diamond), 1500 (\triangle) y 2000 (\circ) mg de DEHF/L en fermentación sumergida.

6.4.2. *Pleurotus ostreatus* ATCC32783

En la Figura 56 se muestra el perfil de pH de *P. ostreatus* ATCC32783, el cual en los tratamientos que contenían DEHF presentó una tendencia general oscilar en niveles neutros durante los primeros 10 días de incubación para posteriormente disminuir a niveles de entre 5.5 y 6.0. Y al mantenerse en la fase estacionario se fue incrementando el pH hasta alcanzar valores neutros de entre 6.8 y 7.5.

En el tratamiento testigo el pH se mantuvo en niveles neutros de entre 6.2 y 7.0 a lo largo de la fermentación, sin presentar cambios drásticos durante las fases de crecimiento.

En el medio que contenía 1500 mg de DEHF/L el pH incrementó hasta 7.1 al día 8 (inicio de la fase exponencial), tiempo en el que también se termina de degradar el DEHF y a partir del día 9 el pH disminuyó hasta valores entre 5.8 y 6.1, lo que concuerda con la producción de MEHF ya presente en el medio, lo que estuvo acompañado de la formación en mayor abundancia de alcoholes y ácidos orgánicos y compuestos aminados conformados a partir de la separación de la cadena alquílica que dio lugar al MEHF. Lo que provocó el incremento en la acidez del medio alcanzando niveles neutros. Posteriormente, a partir de los días 17 y 18 comenzó un incremento del pH de 6.3 hasta 7.1, durante este tiempo se presentó también la fase estacionaria de crecimiento y la producción compuestos aminados.

En el cultivo con 2000 mg de DEHF/L el pH incrementó hasta 7.2 al día 11, tiempo en el que también se encontraba el inicio de la fase exponencial y el proceso como tal de la degradación del DEHF. A partir del día 12 el pH alcanzó valores de 5.9, lo que concuerda con la producción de MEHF, alcoholes y ácidos orgánicos en abundancias considerables en el medio, resultando así, un incremento en la acidez del medio. Posteriormente, a partir del día 19 se observó un incremento del pH de 6.9 a 7.4, durante este tiempo se presentó también la fase de crecimiento estacionaria y la producción de compuestos con grupos amino y amida en mayor abundancia.

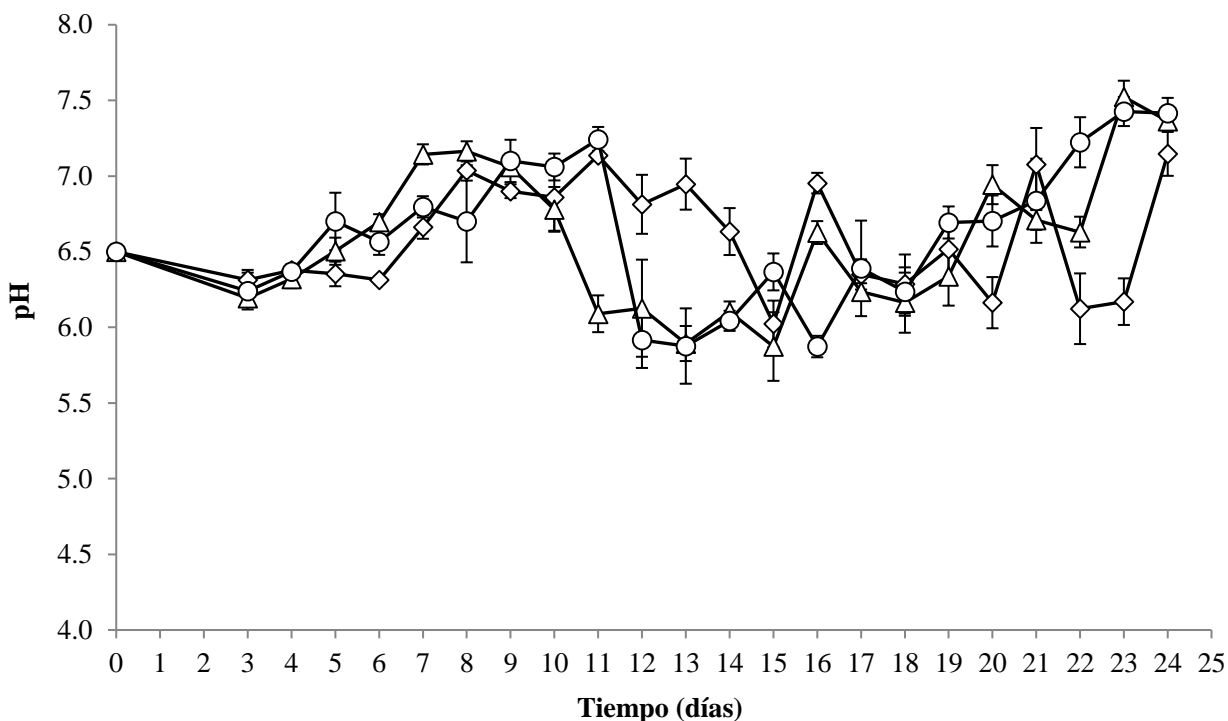


Figura 56. Perfil de pH durante el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* ATCC32783 en medio sin adición de ftalato (MSAF) (\diamond), 1500 (\triangle) y 2000 (\circ) mg de DEHF/L en fermentación sumergida.

6.4.3. *Pleurotus pulmonarius*

En la Figura 57 se muestra el perfil de pH de *P. pulmonarius*, el cual en los tratamientos que contenían DEHF presentó una tendencia general a oscilar en niveles neutros a lo largo de la fermentación, con niveles que variaron entre 5.9 y 7.4.

En el medio testigo el pH se mantuvo en niveles neutros entre 6.2 y 6.6 a lo largo de la fermentación, sin presentar cambios significativos. En cambio, en el medio que contenía 1500 mg de DEHF/L el pH incrementó ligeramente de 6.1 en el día 3 a 6.5 en el día 9, tiempo en el que se seguía degradando el DEHF. Estos niveles se mantuvieron entre 6.5 y 7.0 hasta el día 13, tiempo en el que ya no había presencia de DEHF, pero sí de MEHF.

Del día 13 y hasta el final de la fermentación los niveles se mantuvieron entre 6.3 y 6.6.

En el cultivo con 2000 mg de DEHF/L el pH incrementó ligeramente de 6.1 en el día 3 a 6.7 en el día 10, tiempo en el que se degradaba el DEHF y había presencia de otros ésteres de ftalato formados. Estos niveles se mantuvieron entre 6.6 y 6.9 hasta el día 14, tiempo en el que la presencia de DEHF en el medio era casi nula.

Del día 14 y hasta el final de la fermentación los niveles disminuyeron hasta 5.6 y se mantuvieron entre 5.9 y 6.0.

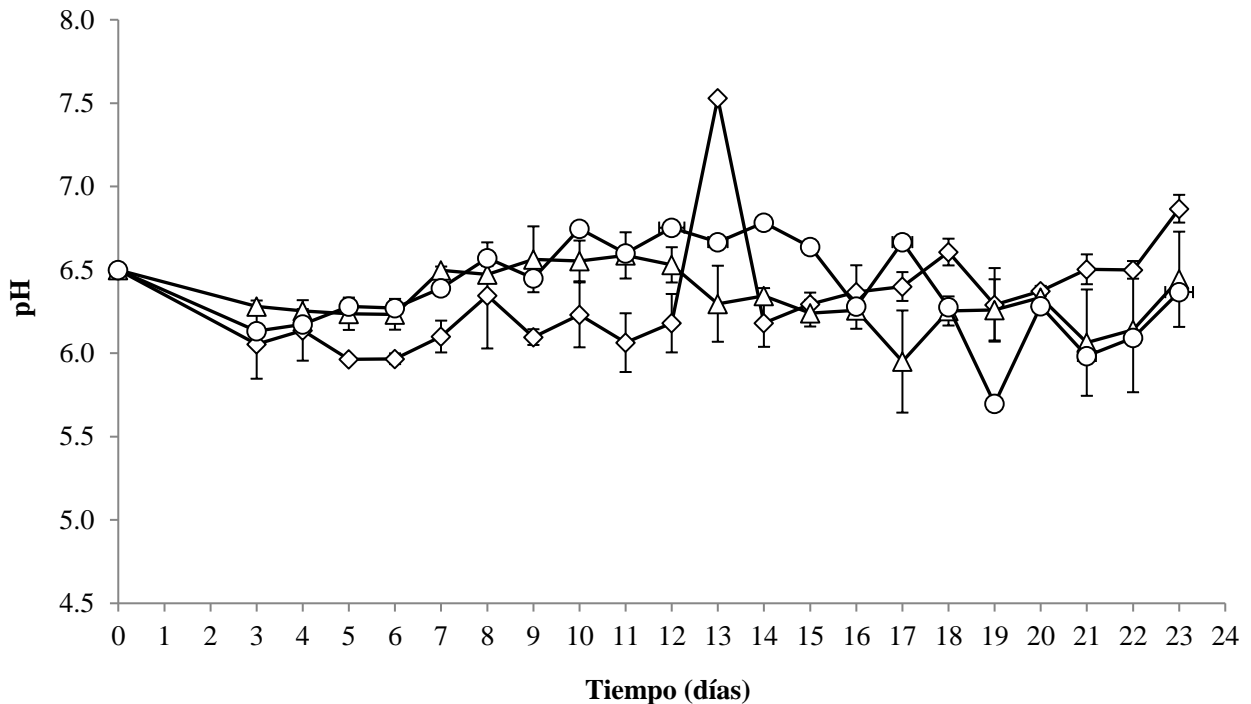


Figura 57. Perfil de pH durante el crecimiento de *Pleurotus pulmonarius* en medio sin adición de ftalato (MSAF) (◇), 1500 (△) y 2000 (○) mg de DEHF/L en fermentación sumergida

6.5. Actividad enzimática extracelular de lacasas

6.5.1. *Lentinula edodes*

La actividad de lacasas en los tres medios de cultivo para *L. edodes* (Figura 58) siguió el mismo patrón de incremento conforme transcurrió el tiempo de fermentación.

En el medio testigo esta cepa presentó una actividad de lacasas de 8 a 54 U/L del día 2 al 23 de incubación, tiempo en el que crecía el hongo en su fase exponencial. A partir del día 24 y hasta el 32 los niveles de lacasas se mantuvieron oscilando entre 24 y 48 U/L y a partir del día 33 (tiempo de la fase estacionaria) y hasta el final de la fermentación la actividad incrementó hasta alcanzar las 188 U/L.

En el medio con 1500 mg de DEHF/L la actividad de estas enzimas se mantuvo oscilando entre 35 y 133 U/L del día 2 al 29 de crecimiento, presentando un decremento de la actividad hasta 35 U/L

el día 14, tiempo en el que se terminaron de degradar las últimas moléculas de DEHF. A partir del día 30 comenzó a incrementarse la actividad de las lacasas, presentando los mayores picos al final de la fermentación. El primero fue de 688 U/L de la enzima producida el día 32, mismo día en el que se comienza la producción en mayor abundancia de compuestos aminados por el procesodegradativo, indicando una participación importante de alguna lacasa diferente o una isoenzima de lacasa específica que utilicen como sustrato alguno de estos compuestos. Esto también indica que la actividad de esta lacasa se ve inducida por la producción de estos metabolitos o de otros formados como parte natural del metabolismo de este hongo.

La mayor actividad de lacasas de las tres cepas se presentó en esta cepa y en este tratamiento, siendo de 969.7479 U/L.

En el tratamiento con 2000 mg de DEHF/L la actividad de lacasas se mantuvo en niveles entre 25 y 177 U/L del día 2 al día 24 (tiempo del crecimiento exponencial). El día 25 se incrementó la actividad de estas enzimas hasta 215 U/L, manteniendo estos niveles con ligeras oscilaciones hasta el día 33 (inicio de la fase estacionaria), tiempo en que en el medio se encontraba presente el MEHF. Del día 33 hasta el final de la fermentación los niveles de actividad de la enzima se incrementaron hasta alcanzar las 537.8033 U/L.

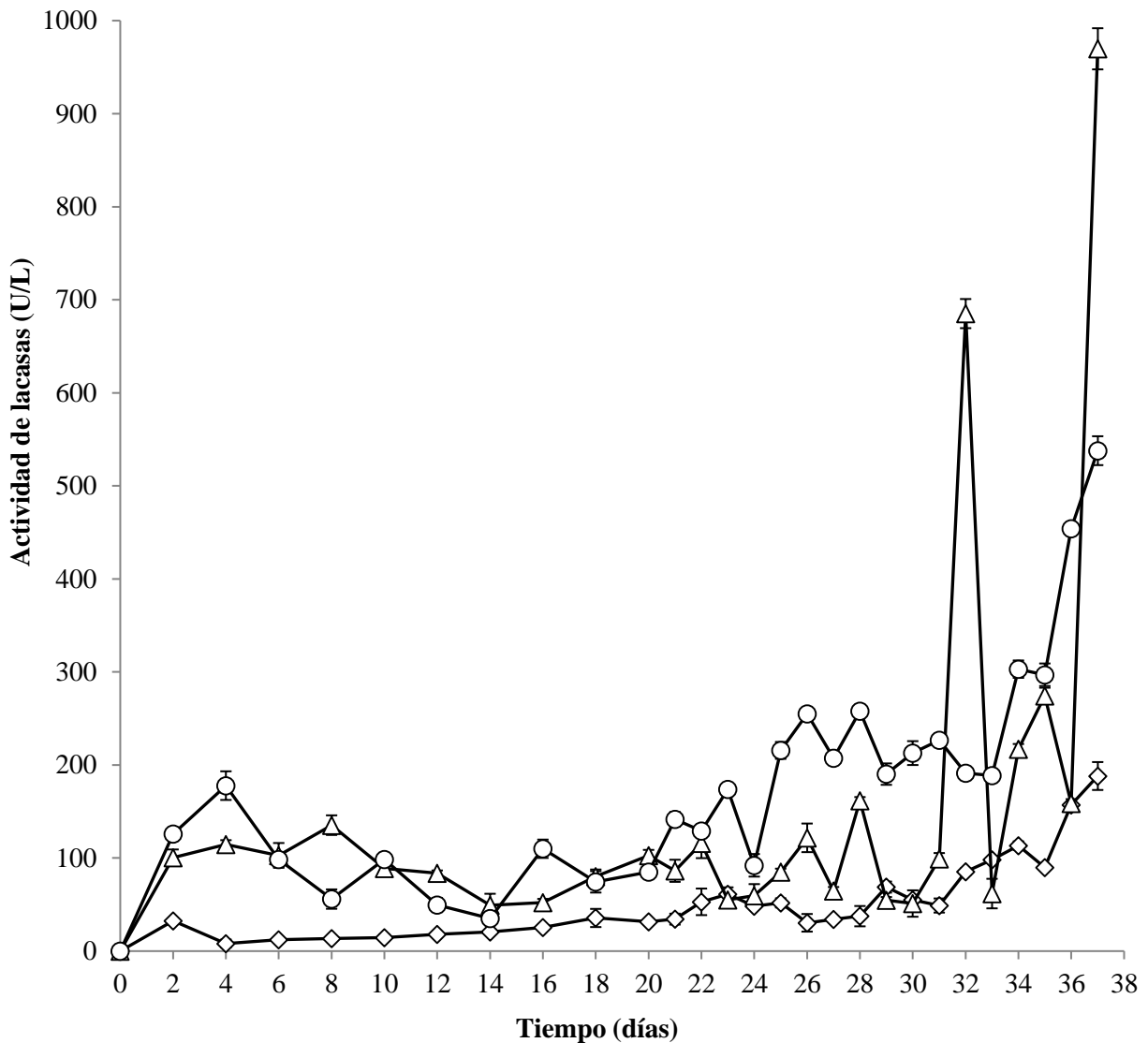


Figura 58. Actividad de lacasas de *Lentinula edodes* en medio SAF (◇), 1500 (△) y 2000 (○) mg de DEHF/L en fermentación sumergida.

6.5.2. *Pleurotus ostreatus* ATCC32783

Los perfiles de actividad de lacasas de la cepa *Pleurotus ostreatus* ATCC32783 se muestran en la figura 59. Esta cepa en el medio SAF presentó una actividad catalítica de 2 a 15 U/L del día 3 al 11 de incubación. El día 12 incrementó su actividad alcanzando el primer pico con 167.95 U/L. Posteriormente, durante el mismo tiempo de crecimiento exponencial pero al día 14, alcanzó la mayor actividad de lacasas, con 202.36 U/L. Después la actividad se vio disminuida conforme continuaron los días de fermentación, manteniendo niveles de 24 a 82 U/L de los días 15 a 24.

En el medio con 1500 mg de DEHF/L la actividad de lacasas se mantuvo disminuyendo de 194 a 54 U/L del día 2 al 9, tiempo en el aún había DEHF en el medio pero a una concentración menor al 40 %.

Al tiempo 12 (durante la fase de crecimiento exponencial) se presentó el primer pico alto con 247.19 U/L. Posteriormente, al día 18 la actividad se vio disminuida hasta 45 U/L y de aquí y hasta el final de la fermentación incrementó la actividad de estas enzimas. Al final de la fase estacionaria (día 23) se presentó el mayor pico de actividad con 281.3 U/L.

Cabe resaltar que la mayor actividad presentada en este medio fue la más alta presentada en los tres tratamientos con esta cepa.

En el medio con la mayor concentración de DEHF la actividad de lacasas disminuyó del día 3 al 7 (fase de crecimiento de adaptación) partiendo de 46 U/L hasta 22 U/L. Tiempo en el que el poco más del 50 % del DEHF se degradó.

Durante la fase de crecimiento exponencial, del día 7 al 12 se observó el primer incremento de la actividad hasta 167.9 U/L, tiempo en el que el MEHF ya se encontraba presente en el medio.

Del día 12 al 16 la actividad disminuyó hasta 37 U/L y de aquí y hasta el día 21 los niveles se mantuvieron oscilando entre 49 y 90 U/L. Finalmente, del día 21 y hasta el final de la fermentación se incrementó la actividad de lacasas hasta 202.80 U/L, este también fue el tiempo en el que se incrementaron ligeramente las abundancias de los compuestos con grupos amino y amidas.

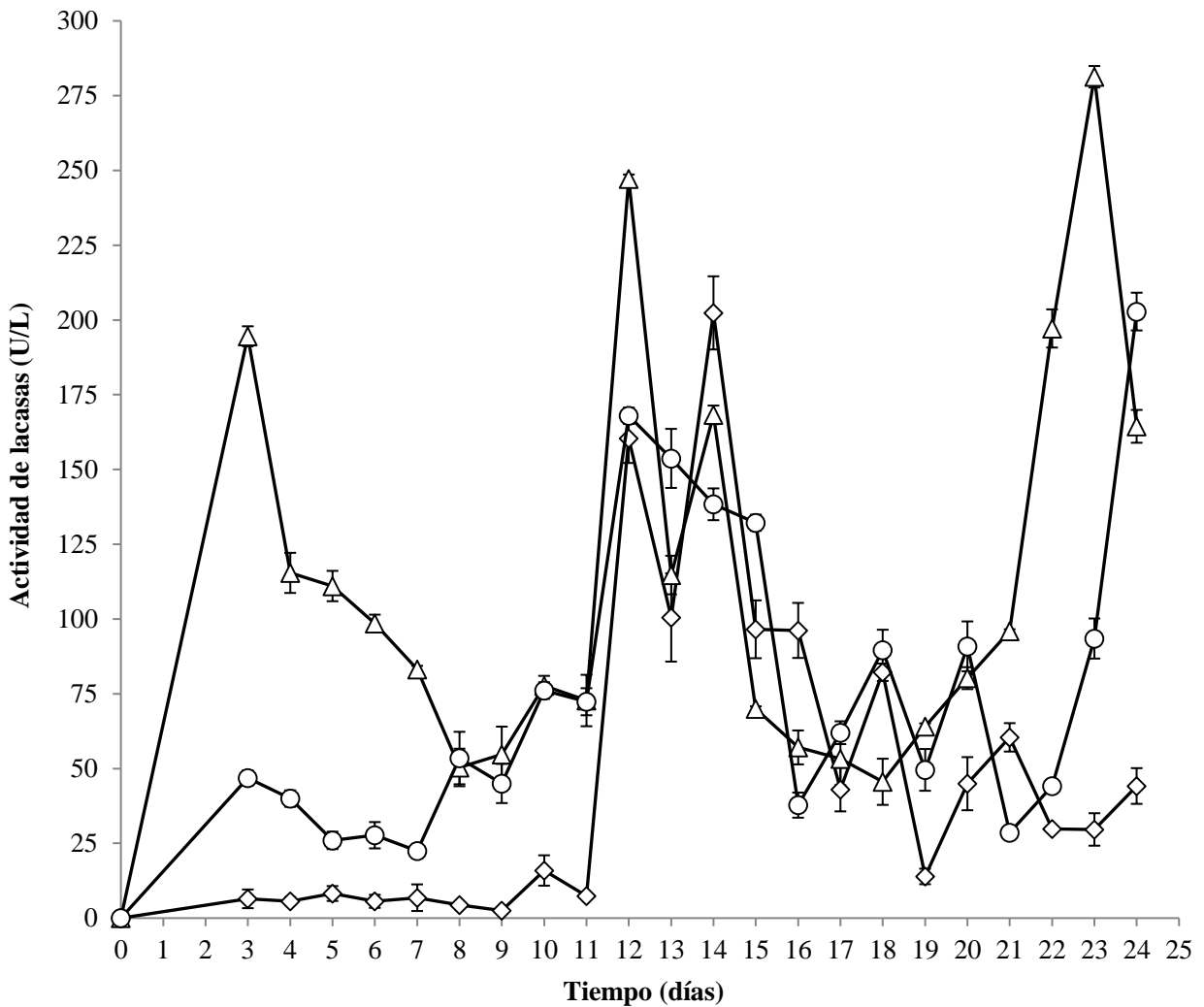


Figura 59. Actividad de lacasas de *Pleurotus ostreatus* ATCC32783 en medio SAF (◇), 1500 (△) y 2000 (○) mg de DEHF/L en fermentación sumergida.

6.5.3. *Pleurotus pulmonarius*

La figura 60 muestra los perfiles de actividad de lacasas de la cepa *Pleurotus pulmonarius*. En el tratamiento testigo presentó una actividad de lacasas que se mantuvo entre 7 y 40 U/L del día 3 al 10. Posteriormente los niveles se incrementaron hasta 312.38 U/L al día 16. A partir de este día y hasta el tiempo 19 disminuyeron los niveles de actividad de la enzima hasta 63.55 U/L. Del día 19 hasta el final de la fermentación los niveles de actividad se mantuvieron entre 63 y 385. Sin embargo, el mayor pico de actividad se observó al día 22 de incubación con 427.08 U/L.

En el medio con la menor concentración de DEHF la actividad de lacasas se incrementó de 73 a 168.66 U/L del día 3 al 5, siendo la actividad presentada al día 5 la que presentó el pico más alto en este tratamiento.

Del día 5 al 8 la actividad disminuyó hasta 40 U/L, debido probablemente a la presencia de uno de los ésteres de ftalato formados durante la degradación de DEHF. Actúan uno de éstos o varios como inhibidor de esta enzima.

Del día 9 y hasta terminar la fermentación los niveles de lacasas se mantuvieron oscilando entre 40 y 90 U/L.

En el tratamiento con 2000 mg de DEHF/L la actividad de lacasas osciló entre 49 y 120 U/L los primeros 10 días de incubación (tiempo en el que se degradó el DEHF a ésteres de ftalato de elevado peso molecular), lo que nos indica que el DEHF en concentraciones elevadas o alguno de sus ésteres de ftalato formados podrían de tener un efecto inductor sobre la actividad de esta enzima o isoforma. Del día 10 al 15 se incrementaron los niveles de actividad hasta 339.80 U/L, siendo este el pico más alto de actividad. Posterior a este tiempo y hasta el día 19, la actividad disminuyó hasta 106.4 U/L y a partir de este día y hasta el final de la fermentación la actividad se mantuvo oscilando en niveles de entre 88 y 140 U/L.

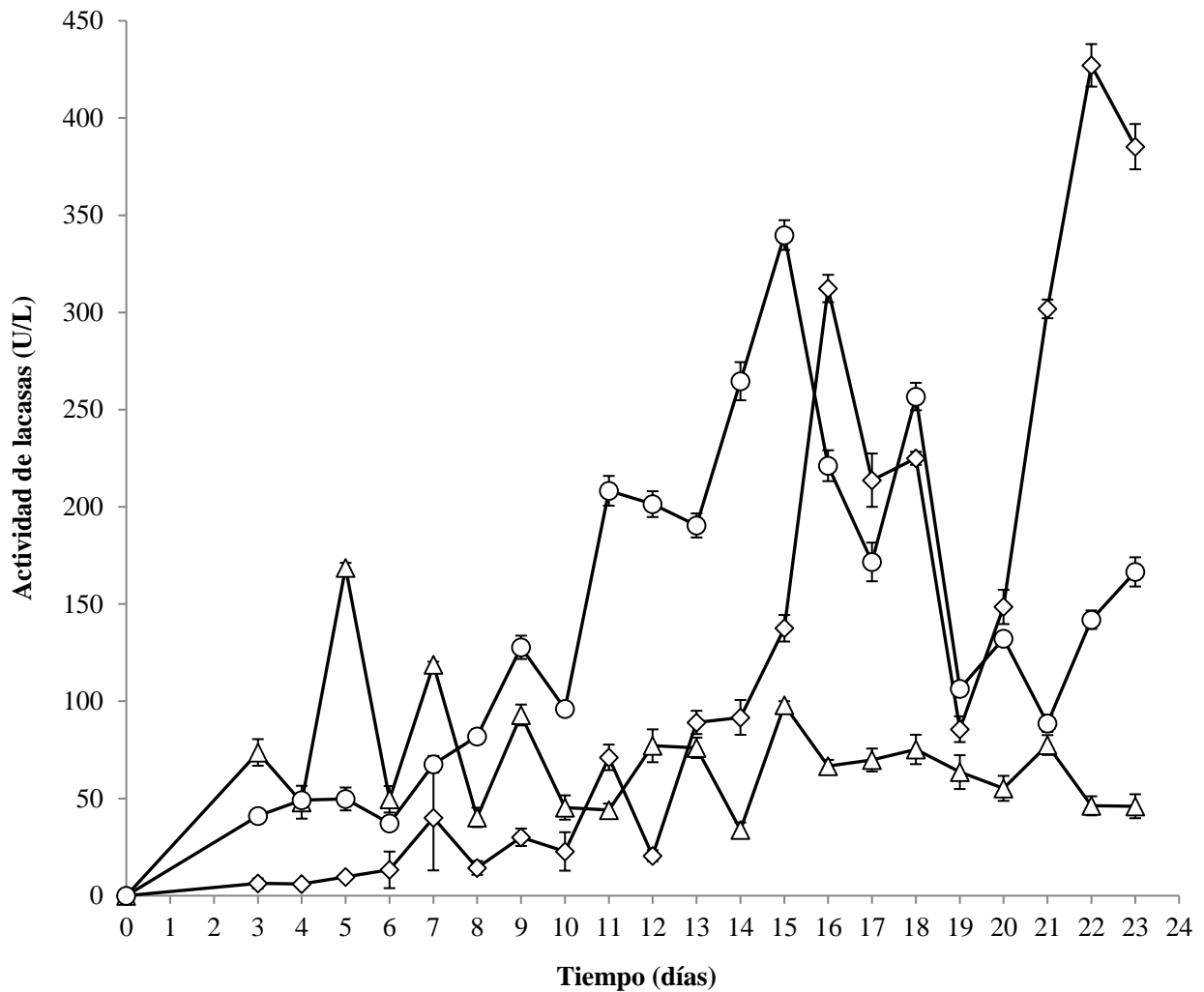


Figura 60. Actividad de lacasas de *Pleurotus pulmonarius* en medio SAF (◇), 1500 (△) y 2000 (○) mg de DEHF/L en fermentación sumergida.

6.5.4. Determinación de los rendimientos enzimáticos de lacasas E_{max} , $Y_{E/X}$, q_p y P

En la tabla 6 se muestran los resultados de los rendimientos enzimáticos de lacasa para cada una de las cepas en los tres tratamientos probados.

Para la cepa *L. edodes* la actividad máxima (E_{max}) de lacasas más alta se presentó en el medio con 1500 mg de DEHF/L, siendo ésta de 969.75 U/L, seguida de la E_{max} en el medio con 2000 mg de DEHF/L con 537.80 U/L y por último, la obtenida en el medio SAF con 188.15 U/L. Las E_{max} obtenidas de los tres diferentes tratamientos se presentaron el último día del cultivo.

El rendimiento del a enzima con respecto a la biomasa ($Y_{E/X}$) es un parámetro que nos indica la cantidad de enzima que se está formando por gramo de biomasa. Para esta cepa el mayor $Y_{E/X}$ se

obtuvo en el medio con 1500 mg de DEHF/L, siendo éste de 140.82 U de lacasa por gramo de biomasa (U/g X), seguido del Y_{EX} alcanzado en el medio con 2000 mg de DEHF/l con 68.05 U/g X. El Y_{EX} más bajo se determinó en el medio SAF con 42.11 U/g X.

La tasa específica de formación de lacasa (q_p) es un parámetro que representa las unidades de lacasa producidas por gramo de biomasa por hora (U/g X/h). Para *L. edodes* la mayor q_p se obtuvo, en el medio con 1500 mg de DEHF/L, siendo de 1.04 U/g X/h, seguida de la q_p obtenida en el medio con 2000 mg de DEHF/L, con 0.48 U/g X/h y por último de la q_p obtenida en el medio SAF con 0.31 U/g X/h.

La productividad (P) es la relación que existe entre la mayor actividad enzimática de lacasa producida por litro de medio y el tiempo en horas que tomó dicha producción (U/L/h). La P más alta se obtuvo al igual que en los tres rendimientos anteriores en el medio con menor concentración de DEHF, con 1.09 U/L/h, seguida de la encontrada en el medio con mayor concentración de DEHF con 0.61 U/L/h. Por último se tuvo la P del medio SAF con 0.21 U/L/h.

De acuerdo con el ANOVA y la prueba de intervalos de Tukey aplicados, sí se presentó una diferencia significativa entre los tres tratamientos para los cuatro rendimientos enzimáticos evaluados. Lo que nos indica que los tratamientos sí afectan significativamente la determinación de estos rendimientos para esta cepa.

P. ostreatus ATCC32783 presentó la E_{max} de lacasas más alta en el tratamiento con 1500 mg de DEHF/L, siendo ésta de 282.32 U/L el día 23 de la fermentación, seguida de la E_{max} en el medio con 2000 mg de DEHF/L con 202.80 U/L el último día de cultivo. Y por último la obtenida en el medio SAF con 202.37 U/L al día 14. Cabe resaltar que de acuerdo con el análisis estadístico no hubo diferencia significativa en la E_{max} obtenida entre el tratamiento SAF y aquél que contenía 2000 mg de DEHF/L, pero sí se presentó una diferencia significativa entre estos tratamientos y el que contenía 1500 mg de DEHF/L. Esto nos dice que los tratamientos SAF y con altas concentraciones de DEHF no tienen efecto significativo sobre los resultados de este parámetro, pero que una concentración no tan elevada de DEHF, como es la de 1500 mg/L sí afecta la actividad de lacasas para esta cepa.

Para esta cepa el mayor Y_{EX} se obtuvo en el tratamiento con 1500 mg de DEHF/L, siendo de 33.58 U/g X, seguido del Y_{EX} alcanzado en el medio SAF con 28.48 U/g X. El Y_{EX} más bajo se determinó en el tratamiento con 2000 mg de DEHF/L con 21.43 U/g X. El análisis estadístico realizado indicó que sí hay una diferencia significativa entre los tres tratamientos para el Y_{EX} .

En esta cepa la mayor q_p también se obtuvo, en la fermentación con 1500 mg de DEHF/L, siendo de 0.63 U/g X/h, seguida al igual que en el parámetro anterior, da la q_p obtenida en el medio con SAF con 0.52 U/g X/h. Y por último la q_p de la obtenida en el tratamiento con 2000 mg de DEHF/L con 0.32 U/g X/h. El ANOVA realizado y la prueba post-hoc de Tukey indicaron que sí hay una diferencia significativa entre los tres tratamientos para la q_p .

A diferencia de los rendimientos anteriores, la P más alta se obtuvo en el medio SAF con 0.60 U/L/h, seguida de la obtenida en el tratamiento con menor concentración de DEHF con 0.51 U/L/h, por último, la P más baja se determinó en la fermentación con mayor concentración de DEHF con 0.35 U/L/h. El análisis estadístico indicó que sí hubo un efecto significativo de cada uno de los tratamientos sobre este parámetro.

En comparación con las otras dos cepas, *P. pulmonarius* presentó la E_{max} de lacasas más alta en el tratamiento SAF, la cual fue de 427.08 U/L el día 22 de la fermentación, seguida de la E_{max} en el medio con 2000 mg de DEHF/L con 339.80 U/L al quinto día de cultivo y por último, le siguió la obtenida en el tratamiento con 1500 mg de DEHF/L con 168.67 U/L al día 15.

En esta cepa el mayor Y_{EX} se obtuvo en el medio SAF con de 59.26 U/g X, seguido del Y_{EX} alcanzado en el medio con 2000 mg de DEHF/L con 38.06 U/g X. El Y_{EX} más bajo se presentó en la fermentación con menor concentración de DEHF, presentando 21.69 U/g X.

En esta cepa la mayor q_p también se obtuvo en el medio SAF con 1.23 U/g X/h, seguida al igual que en el parámetro anterior, da la q_p obtenida en el medio con mayor concentración de DEHF, presentando 0.59 U/g X/h. Por último se tuvo la q_p obtenida en el medio con 1500 mg de DEHF/L, cuantificando 0.49 U/g X/h.

A diferencia de los rendimientos anteriores, la P más alta se obtuvo en la fermentación que contenía la menor concentración de DEHF con 1.41 U/L/h, seguida de la obtenida en el tratamiento con 2000 mg de DEHF/L, la cual fue de 0.94 U/L/h. La P más baja se registró en el medio SAF con 0.81 U/L/h.

Los resultados obtenidos mediante el ANOVA y la prueba de intervalos de Tukey aplicados en esta cepa, indicaron que sí se presentó una diferencia significativa entre los tres tratamientos para los cuatro rendimientos enzimáticos evaluados. Lo que nos probó que los tratamientos sí tienen un efecto significativo sobre la determinación de estos rendimientos para *P. pulmonarius*.

Tabla 6: Rendimientos enzimáticos de lacasas de *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus* ATCC32783 y *Pleurotus pulmonarius*, crecidos en medio SAF y dos concentraciones diferentes de DEHF en fermentación sumergida.

| Cepa | Rendimientos | Medio de cultivo | | |
|---|------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| | | SAF | Concentración de DEHF (mg/L) | |
| | | | 1500 | 2000 |
| <i>Lentinula edodes</i> | E_{max} (U/L) | 188.15 ^c (15.00) | 969.75 ^b (22.11) | 537.80 ^a (15.53) |
| | Y_{EX} (U/g X) | 42.11 ^c (3.52) | 140.82 ^b (3.57) | 68.05 ^a (1.88) |
| | q_p (U/g X/h) | 0.31 ^c (0.03) | 1.04 ^b (0.03) | 0.48 ^a (0.02) |
| | P (U/L/h) | 0.21 ^c (0.02) | 1.09 ^b (0.02) | 0.61 ^a (0.02) |
| <i>Pleurotus ostreatus</i> ATCC32783 | E_{max} (U/L) | 202.37 ^a (12.23) | 281.32 ^b (3.59) | 202.80 ^a (6.31) |
| | Y_{EX} (U/g X) | 28.48 ^c (0.98) | 33.58 ^b (1.30) | 21.83 ^a (0.36) |
| | q_p (U/g X/h) | 0.52 ^c (0.01) | 0.63 ^b (0.06) | 0.32 ^a (0.02) |
| | P (U/L/h) | 0.60 ^c (0.04) | 0.51 ^b (0.01) | 0.35 ^a (0.01) |
| <i>Pleurotus pulmonarius</i> | E_{max} (U/L) | 427.08 ^c (10.95) | 168.67 ^b (2.53) | 339.80 ^a (7.64) |
| | Y_{EX} (U/g X) | 59.26 ^c (0.87) | 21.69 ^b (0.41) | 38.06 ^a (0.85) |
| | q_p (U/g X/h) | 1.23 ^c (0.05) | 0.49 ^b (0.03) | 0.59 ^a (0.01) |
| | P (U/L/h) | 0.81 ^c (0.02) | 1.41 ^b (0.02) | 0.94 ^a (0.02) |

Medias con la misma letra en una fila no presentaron diferencias significativas. Los números dentro del paréntesis corresponden a la desviación estándar de tres experimentos separados.

6.6. Actividad enzimática extracelular de esterases

6.6.1. *Lentinula edodes*

La actividad de esterases en los dos medios de cultivo con DEHF para *L. edodes* siguieron el mismo patrón de actividad, en comparación con la actividad en el medio testigo, la cual se mantuvo en niveles menores a 62 U/L durante los 37 días transcurridos (Figura 61).

En el tratamiento testigo, esta cepa presentó una actividad de esterases de 10 a 23 U/L del día 2 al 21 de incubación, tiempo en el que crecía el hongo en su fase exponencial. A partir del día 22 y hasta el 27 los niveles de se incrementaron ligeramente de 22 a 30 U/L. Del día 28 y hasta el día 36 la actividad disminuyó y se mantuvo entre 12 y 23 U/L. Sin embargo el día 37 se presentó un incremento de la actividad de 61.51 U/L, alcanzando su único pico en este tiempo.

En el medio con 1500 mg de DEHF/L la actividad de estas enzimas subió el día 2 a 145.78 U/L, siendo éste el primer pico de máximo actividad, tiempo en el que se comenzó la degradación de DEHF y probablemente las altas concentraciones de este compuesto indujeron la actividad de una esterasa que participa en la conversión inicial de DEHF a MEHF mediante la hidrólisis del enlace éster de una de las cadenas alquílicas a través de una deesterificación.

Del día 4 al 8 baja la actividad se mantuvo entre 34 y 37 U/L. Al día 10 volvió a incrementarse hasta alcanzar el pico más alto con 266 U/L. En este tiempo comienza a observarse únicamente la presencia de MEHF en el medio.

Del día 12 al 28 la actividad disminuye y se mantiene oscilando entre 16 y 50 U/L, durante este tiempo el hongo aún se encuentra en crecimiento exponencial y en el medio hay MEHF. Del día 29 al 34 la actividad disminuye y se mantiene entre 27 y 35 U/L. durante este tiempo se presentan metabolitos resultantes tanto de la degradación del DEHF (ácidos orgánicos y alcoholes) como del metabolismo natural de este hongo, lo que probablemente induce la actividad de otra esterasa. Al final de la fase estacionaria de crecimiento la actividad comienza a incrementarse hasta las 61.5 U/L alcanzadas el día 37.

En el tratamiento con 2000 mg de DEHF/L la actividad de esterases inició el día 2 con un pico de 179.83 U/L, en este tiempo comenzó la degradación de DEHF y probablemente las altas concentraciones de este compuesto estimularon la actividad de la misma esterasa que la expresada en el medio con 1500 mg de DEHF/L. Del día 4 al 8 bajó la actividad y se mantuvo entre 34 y 76 U/L. Al día 10 volvió a incrementarse la actividad hasta alcanzar el pico más alto con 268.38 U/L, durante este tiempo la concentración de DEHF ya había disminuido casi en más del 50 %, por lo que los ésteres de ftalato formados hasta este día también pudieron inducir la actividad de otra esterasa o isoforma de esterasa que actuara sobre éstos.

Del día 12 al 29 la actividad disminuyó y se mantuvo oscilando entre 24 y 38 U/L, durante este tiempo el hongo aún se encontraba en crecimiento exponencial y en el medio había MEHF.

Del día 30 al 37 la actividad se incrementó ligeramente y se mantuvo entre 37 y 85 U/L.

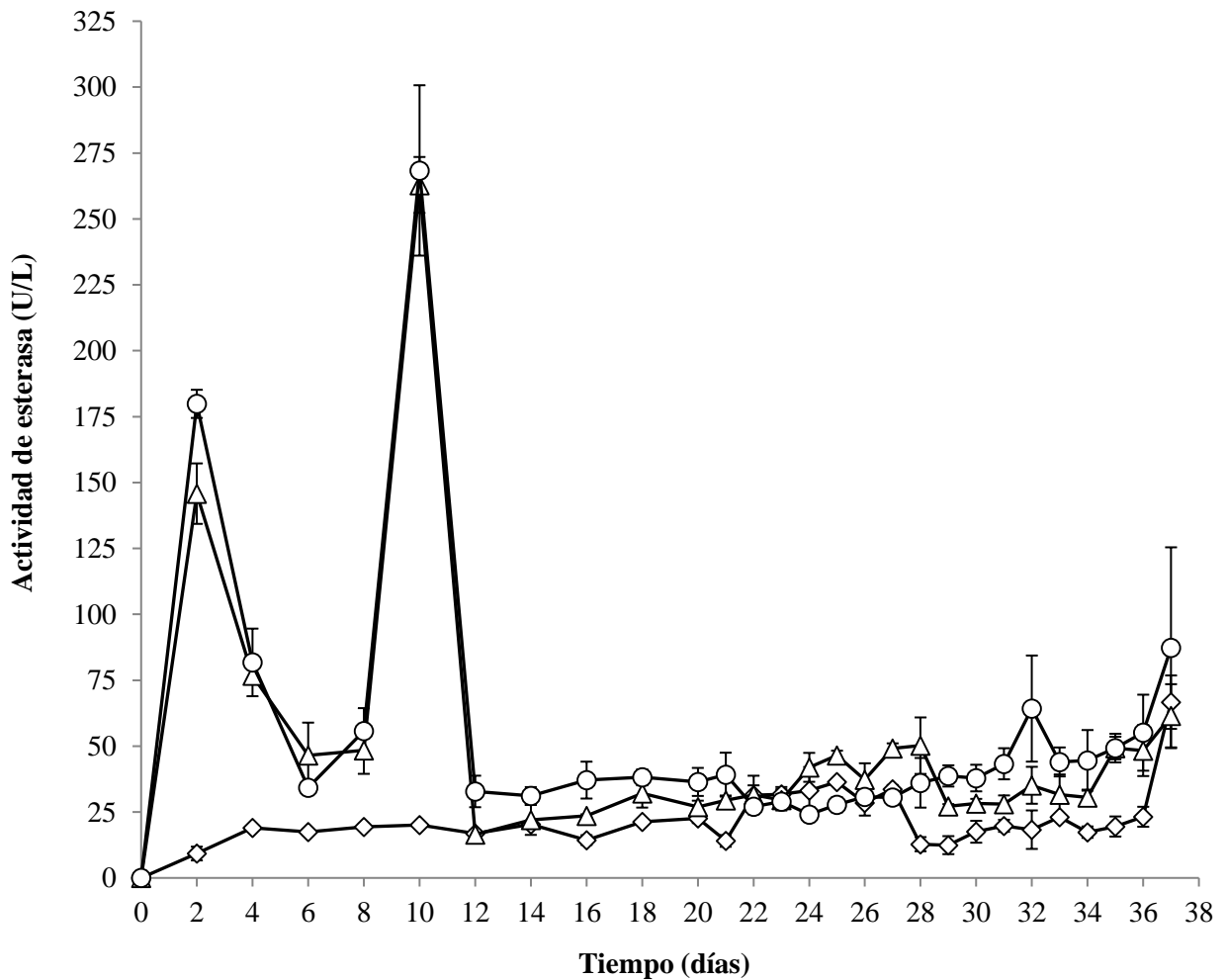


Figura 61. Actividad de estererasas de *Lentinula edodes* en medio SAF (◇), 1500 (△) y 2000 (○) mg de DEHF/L en fermentación sumergida.

6.6.2. *Pleurotus ostreatus* ATCC32783

De los tres medios de cultivo empleados, en el medio SAF se presentó la mayor actividad de estererasas para la cepa *P. ostreatus* ATCC32783 (Figura 62). En el medio testigo del día 3 al 12 se incrementó la actividad de 60 a 101 U/L. En el día 13 disminuyó la actividad a 56 U/L y a partir de este tiempo y hasta el día 18 se incrementó hasta 431.63 U/L. Este día se presentó el mayor pico de actividad.

El día 19 la actividad decreció hasta 222 U/L y durante las 48 horas siguientes, alcanzó las 295 U/L, para decrecer la actividad hasta 15 U/L dos días después y volver a aumentar el último día de fermentación hasta 260 U/L.

En el tratamiento con 1500 mg de DEHF/L, la actividad de estas enzimas subió del día 3 al día 8 hasta 266.8 U/L, siendo éste el pico de máxima actividad. Durante este tiempo se llevó a cabo parte de la degradación de DEHF a MEHF asando por la formación de otros ésteres de ftalato, lo que demuestra la participación de estas enzimas durante este proceso, teniendo protagonismo mediante la hidrólisis del enlace éster de una de las cadenas alquílicas alguno de los ésteres de ftalato del tratamiento.

Del día 9 al 15 bajó la actividad y se mantuvo entre 23 y 66 U/L, en este lapso de tiempo se encontraba presente el MEHF en el medio, cuyo incremento en concentración podrían inducir la actividad de otra esterasa o isoesterasa, explicando el incremento de actividad el día 15 con 109 U/L.

Del día 16 al 21 la actividad disminuyó y se mantuvo oscilando entre 50 y 78 U/L, durante este tiempo el hongo aún se encontraba en crecimiento estacionario y de los ésteres de ftalato presentes al inicio, únicamente se encontró MEHF.

En el cultivo con 2000 mg de DEHF/L la actividad de esterasas subió el día 3 al día 8 hasta 119.12 U/L, siendo éste el primer pico de máxima actividad, durante este tiempo se llevó a cabo la degradación de DEHF a MEHF, demostrando la participación de estas enzimas durante este proceso. Del día 9 al 19 bajó la actividad y se mantuvo entre 48 y 80 U/L, tiempo en el que estaban diferentes ésteres de ftalato en el medio, incluyendo aún DEHF.

Del día 20 al 24 la actividad se incrementó hasta 115 U/L, lapso de tiempo en el que se presentó el mayor pico de actividad con 130.31 U/L el día 22.

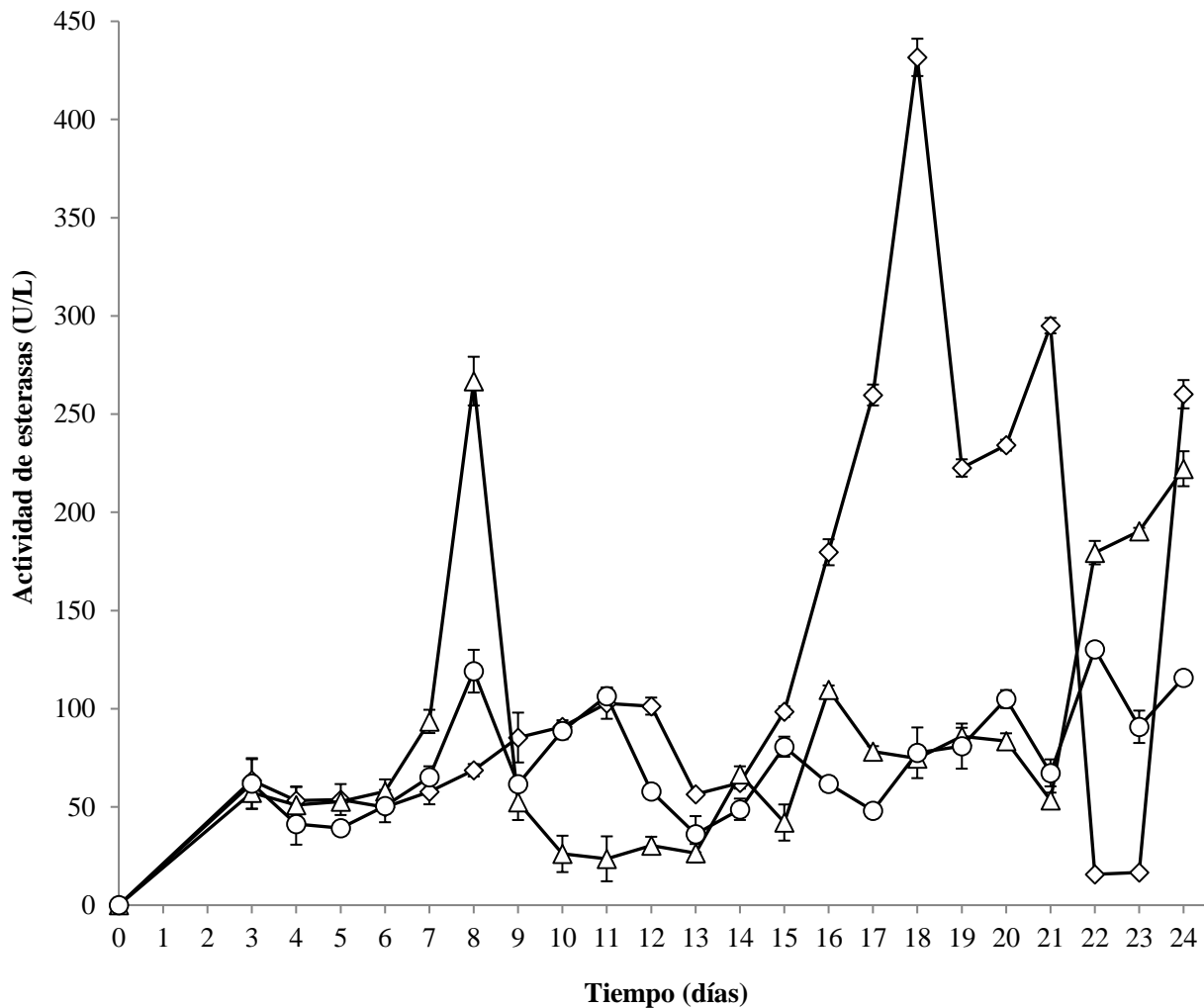


Figura 62. Actividad de estereras de *Pleurotus ostreatus* ATCC32783 en medio sin adición de ftalato (MSAF) (◇), 1500 (△) y 2000 (○) mg de DEHF/L en fermentación sumergida.

6.6.3. *Pleurotus pulmonarius*

De los tres medios de cultivo empleados y como en la otra especie del género *Pleurotus*, en el medio MSAF se presentó la mayor actividad de estereras para *P. pulmonarius* (Figura 63). En el medio testigo del día 3 al 6 se incrementó la actividad de 34 a 56 U/L.

El día 8 alcanzó hasta 221.20 U/L, y del día 9 hasta el día 12 se vio disminuida de 55 a 67 U/L. El día 13 presentó un incremento marcado de actividad, con 394.89 U/L alcanzadas. Del día 14 al 20 la actividad osciló entre 100 y 237 U/L y los días 21 y 23 presentaron los dos picos más altos de actividad, con 486.47 y 497.21 U/L.

En el cultivo con 1500 mg de DEHF/L la actividad de esterases subió del día 3 al 5 hasta 309.27 U/L, durante este tiempo se degradaba el 50 % del DEHF. Del día 5 al 9 la actividad disminuyó hasta 43 U/L, en este tiempo se encontraban presentes en el medio tres ésteres de ftalato además del DEHF y el MEHF, los cuales pudieron tener efecto sobre la actividad de esterases.

Del día 9 al 14 se mantuvo entre 43 y 55 U/L, en este lapso de tiempo se degradaron las últimas moléculas de DEHF presentes en el medio.

Del día 15 al 23 la actividad incrementó hasta alcanzar su pico máximo de actividad, con 434.60 U/L, sin embargo, en este punto ya no hay presencia de MEHF, pero sí de otros compuestos con enlaces éster que inducen la actividad de estas enzimas.

En el tratamiento con la mayor concentración de DEHF/L la actividad de esterases se incrementó ligeramente a 84 U/L el día 4 y a partir de este día y hasta el día 6 disminuyó a 50 U/L, lo que concuerda con la formación de ésteres de ftalato dialquílicos de elevado peso molecular, pero no de la formación de MEHF.

Del día 6 al 15 aumentó la actividad hasta 184 U/L lo que va de la mano con la formación de DEHF observado en el medio, teniendo estas enzimas una participación activa durante este proceso, siendo otra esterasa u otra isoforma de la misma esterasa que participa en la degradación de DEHF.

Al finalizar su crecimiento, durante la fase estacionaria, el día 20 y 22 se presentan los picos más altos de actividad con 435.21 y 437.10 U/L.

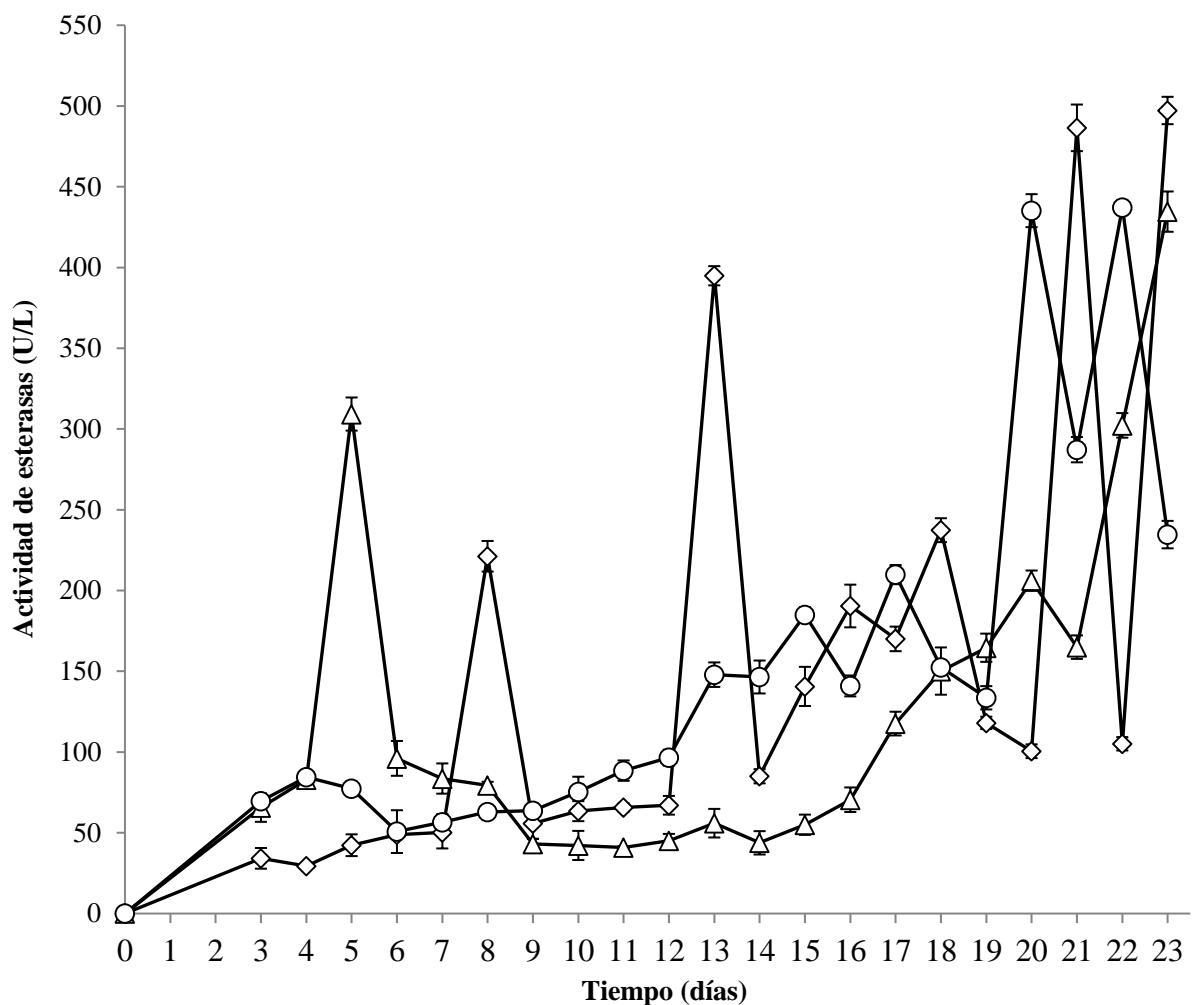


Figura 63. Actividad de estereras de *Pleurotus pulmonarius* en medio SAF (◇), 1500 (△) y 2000 (○) mg de DEHF/L en fermentación sumergida.

6.6.4. Determinación de los rendimientos enzimáticos de estereras E_{max} , $Y_{E/X}$, q_p y P

En la tabla 7 se muestran los resultados de los rendimientos enzimáticos de as estereras para cada una de las cepas con los tres tratamientos probados.

En la cepa *L. edodes* la actividad máxima (E_{max}) de estereras más alta se presentó en el medio con 2000 mg de DEHF/L al día 12 de cultivo, siendo ésta de 268.38 U/L. En orden de sucesión le siguió la E_{max} del medio con 1500 mg de DEHF/L al día 10 con 262.88 U/L. Y en último lugar se presentó la E_{max} obtenida en el medio SAF con 66.69 U/L también al día 10.

En comparación con el rendimiento anterior, para esta cepa el mayor $Y_{E/X}$ se obtuvo en el medio con 1500 mg de DEHF/L con 38.17 U de esterera formadas por gramo de biomasa (U/g X),

seguido del $Y_{E/X}$ alcanzado en el medio con 2000 mg de DEHF/L con 33.96 U/g X. El $Y_{E/X}$ más bajo se observó en el medio SAF con 14.92 U/g X.

Para *L. edodes* la mayor q_p (tasa específica de formación de esterasa) también se obtuvo en el medio con 1500 mg de DEHF/L, siendo de 0.28 U/g X/h, continuando con la q_p obtenida en el medio con 2000 mg de DEHF/L, con 0.24 U/g X/h. Al final el valor más bajo obtenido se encontró en el medio SAF con 0.11 U/g X/h.

La P (productividad) más alta observada se obtuvo al igual que en la E_{max} , en el medio con mayor concentración de DEHF, con 1.12 U/L/h, seguida de la encontrada en el medio con menor concentración de DEHF con 1.10 U/L/h. Por último se tuvo la P del medio SAF con 0.08 U/L/h.

De acuerdo con el análisis estadístico realizado, en los rendimientos evaluados, en los tratamientos con DEHF no se presentaron diferencias significativas entre sí, sin embargo, sí hubo diferencias entre el tratamiento SAF y los tratamientos con las dos diferentes concentraciones de DEHF. Lo que nos indica que los tratamientos con DEHF, sin importar la concentración empleada, sí afectan significativamente la determinación de estos rendimientos para esta cepa en comparación con el tratamiento sin DEHF.

La cepa *P. ostreatus* ATCC32783 presentó la E_{max} de esterasas más alta en el tratamiento con testigo (SAF), siendo ésta de 431.63 U/L el día 23 de la fermentación, seguida de la E_{max} en el medio con 2000 mg de DEHF/L con 202.80 U/L el último día de cultivo. Y por último la obtenida en el medio SAF con 202.37 U/L al día 14.

Para esta cepa el mayor $Y_{E/X}$ se obtuvo en el tratamiento SAF con 60.75 U/g X, seguido al igual que en el parámetro anterior del $Y_{E/X}$ alcanzado en el medio con 1500 mg de DEHF/L con 31.85 U/g X. El $Y_{E/X}$ más bajo se observó en el tratamiento con 2000 mg de DEHF/L con 14.03 U/g X.

Al igual que en los dos rendimientos previos, la mayor q_p registrada para esta cepa se obtuvo en el medio testigo (SAF) con 1.11 U/g X/h, seguida por la q_p obtenida en el medio con menor concentración de DEHF, siendo ésta de 0.59 U/g X/h. La q_p obtenida en el tratamiento con 2000 mg de DEHF/L fue la menor, con 0.21 U/g X/h.

A diferencia de los rendimientos anteriores, la P más alta se obtuvo en el tratamiento con 1500 mg de DEHF/L con 0.60 U/L/h, seguida de la obtenida en el tratamiento SAF con 1.00 U/L/h, por último, la P más baja se registró en el tratamiento con mayor concentración de DEHF, siendo ésta de 0.25 U/L/h.

De acuerdo con el ANOVA y la prueba de intervalos de Tukey aplicados, sí se presentó una diferencia significativa entre los tres tratamientos para los cuatro rendimientos enzimáticos evaluados. Lo que nos indica que los tratamientos sí afectan significativamente la determinación de estos rendimientos para esta cepa.

Al igual que en la cepa anterior, *P. pulmonarius* presentó la E_{max} de esterases más alta en la fermentación testigo (SAF) con 497.22 U/L el día 23 de la fermentación, seguida de la E_{max} en el medio con 2000 mg de DEHF/L con 437.11 U/L al día 22 de crecimiento, por último le siguió la E_{max} obtenida en el tratamiento con 1500 mg de DEHF/L con 434.61 U/L al día 23. El análisis estadístico aplicado mostró que no hay diferencia significativa entre los tratamientos con DEHF, sin embargo sí hubo diferencia entre el tratamiento SAF y los tratamientos con las concentraciones de DEHF. Esto nos dice que los tratamientos con DEHF, sin importar la concentración empleada afectan significativamente la actividad de esterases en comparación con un tratamiento sin DEHF.

Para *P. pulmonarius* el mayor Y_{EX} también se obtuvo en el medio SAF con de 68.99 U/g X, sin embargo, ahora fue el Y_{EX} obtenido en el medio con menor concentración de DEHF el que le siguió en orden descendente, con 55.88 U/g X. El Y_{EX} más bajo se observó en la fermentación con mayor concentración de DEHF, presentando 48.96 U/g X.

La mayor q_p se obtuvo en la fermentación SAF con 1.43 U/g X/h, seguida al igual que en el parámetro anterior, da la q_p obtenida en el medio con 1500 mg de DEHF/L con 1.26 U/g X/h. Y por último se registró la q_p del medio con 2000 mg de DEHF/L, cuantificando 0.75 U/g X/h.

Para estos dos rendimientos, los resultados obtenidos mediante el ANOVA y la prueba de intervalos de Tukey aplicados, demostraron que sí se presentó una diferencia significativa entre los tres tratamientos.

La P (productividad) más alta para *P. pulmonarius* se obtuvo en la fermentación SAF con 0.90 U/L/h, seguida de la obtenida en el tratamiento con 2000 mg de DEHF/L, la cual fue de 0.94 U/L/h. La P más baja se registró en la fermentación que contenía la menor concentración de DEHF, la cual fue de 0.81 U/L/h.

El análisis estadístico realizado mostró que el efecto que los tratamientos con diferentes concentraciones de DEHF sobre la productividad no es significativo, sin embargo, el efecto que un medio SAF tiene sobre este parámetro sí es significativamente diferente de un medio adicionado con DEHF.

Tabla 7: Rendimientos enzimáticos de esterasas de *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus* ATCC32783 y *Pleurotus pulmonarius*, crecidos en medio SAF y dos concentraciones diferentes de DEHF en fermentación sumergida.

| Cepa | Rendimientos | Medio de cultivo | | |
|---|-------------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| | | SAF | Concentración de DEHF (mg/L) | |
| | | | 1500 | 2000 |
| <i>Lentinula edodes</i> | E_{max} (U/L) | 66.69 ^b (10.14) | 262.88 ^a (10.61) | 268.38 ^a (32.85) |
| | $Y_{E/X}$ (U/g X) | 14.92 ^b (2.71) | 38.17 ^a (1.92) | 33.96 ^a (4.02) |
| | q_p (U/g X/h) | 0.11 ^b (0.02) | 0.28 ^a (0.02) | 0.24 ^a (0.03) |
| | P (U/L/h) | 0.08 ^b (0.04) | 1.10 ^a (0.04) | 1.12 ^a (0.14) |
| <i>Pleurotus ostreatus</i> ATCC32783 | E_{max} (U/L) | 431.63 ^c (9.49) | 266.82 ^b (12.39) | 130.32 ^a (2.67) |
| | $Y_{E/X}$ (U/g X) | 60.75 ^c (0.37) | 31.85 ^b (2.32) | 14.03 ^a (0.48) |
| | q_p (U/g X/h) | 1.11 ^c (0.07) | 0.59 ^b (0.06) | 0.21 ^a (0.02) |
| | P (U/L/h) | 1.00 ^c (0.02) | 1.39 ^b (0.06) | 0.25 ^a (0.01) |
| <i>Pleurotus pulmonarius</i> | E_{max} (U/L) | 497.22 ^b (8.47) | 434.61 ^a (12.47) | 437.11 ^a (4.29) |
| | $Y_{E/X}$ (U/g X) | 68.99 ^c (0.58) | 55.88 ^b (2.06) | 48.96 ^a (0.98) |
| | q_p (U/g X/h) | 1.43 ^c (0.04) | 1.26 ^b (0.09) | 0.75 ^a (0.01) |
| | P (U/L/h) | 0.90 ^b (0.02) | 0.79 ^a (0.02) | 0.83 ^a (0.01) |

Medias con la misma letra en una fila no presentaron diferencias significativas. Los números dentro del paréntesis corresponden a la desviación estándar de tres experimentos separados.

6.7. Cuantificación de glucosa

En la figura 64 se observa la curva patrón o curva de calibración utilizada para la determinación de g/l de la glucosa consumida en los diferentes tratamientos al emplear el método de DNS para azúcares reductores.

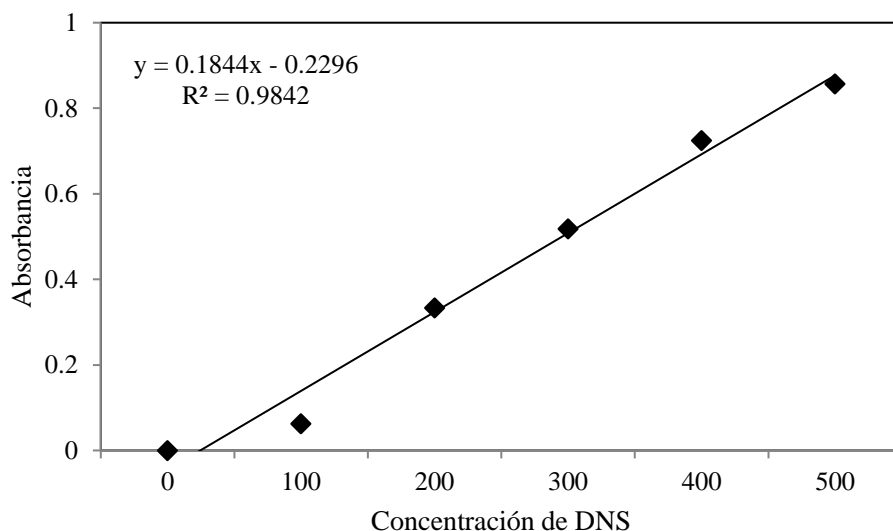


Figura 64. Curva patrón de glucosa por el método de azúcares reductores con DNS.

6.7.1. *Lentinula edodes*

Como se puede observar en la figura 65, en un medio testigo (SAF) esta cepa no alcanzó a consumir más del 50% de la concentración inicial de glucosa durante los 37 días de fermentación. Durante la fase de crecimiento exponencial (día 18 a 34) de este hongo se presentó el mayor consumo de glucosa, el cual fue de aproximadamente 3 g/L. El lento consumo de esta única fuente de carbono en el medio dio como resultado la menor X_{max} obtenida en comparación con los otros dos tratamientos. Esto también explica por qué a penas al día 34 el hongo comienza a entrar en fase de crecimiento estacionaria. Cabe destacar que aun cuando se terminó la fermentación a los 37 días de incubación y el hongo ya había entrado a la fase de crecimiento estacionaria, en el medio aún se encontraba presente el 50 % de esta fuente de carbono.

En el tratamiento con 1500 mg de DEHF/L se puede observar que durante los primeros días de crecimiento del hongo (durante su fase de adaptación), éste consume el 30% de la glucosa. Es durante este período de tiempo en que la degradación del DEHF a metabolitos de menor peso

molecular (probablemente menos tóxicos para el desarrollo del hongo), estimula posteriormente el rápido consumo de glucosa, dando como resultado la fase crecimiento exponencial. Es durante este tiempo (día 18 a 31) que *L. edodes* consume el 70% de la glucosa restante y una vez que la ha terminado de consumir es que entra a la fase de crecimiento estacionaria.

Es debido a este rápido consumo de la glucosa que la X_{max} se ve incrementada significativamente en comparación con el medio testigo.

Al igual que en el tratamiento anterior, en el medio con la mayor concentración de DEHF se observó que durante la fase de crecimiento de adaptación, este hongo consume el 30% de la glucosa al mismo tiempo que se da la degradación del DEHF a metabolitos de menor peso molecular. Lo que estimula posteriormente el rápido consumo de glucosa, dando como resultado la fase crecimiento exponencial. Es durante esta fase (día 16 a 30) que el hongo consume la mayor cantidad de glucosa restante (70%) y una vez que la ha terminado de consumir entra a la fase de crecimiento estacionaria.

Es por esto que la X_{max} se ve incrementada significativamente en comparación con el medio con menor concentración de DEHF y el medio testigo, obteniendo los valores más grandes para esta variable en este tratamiento.

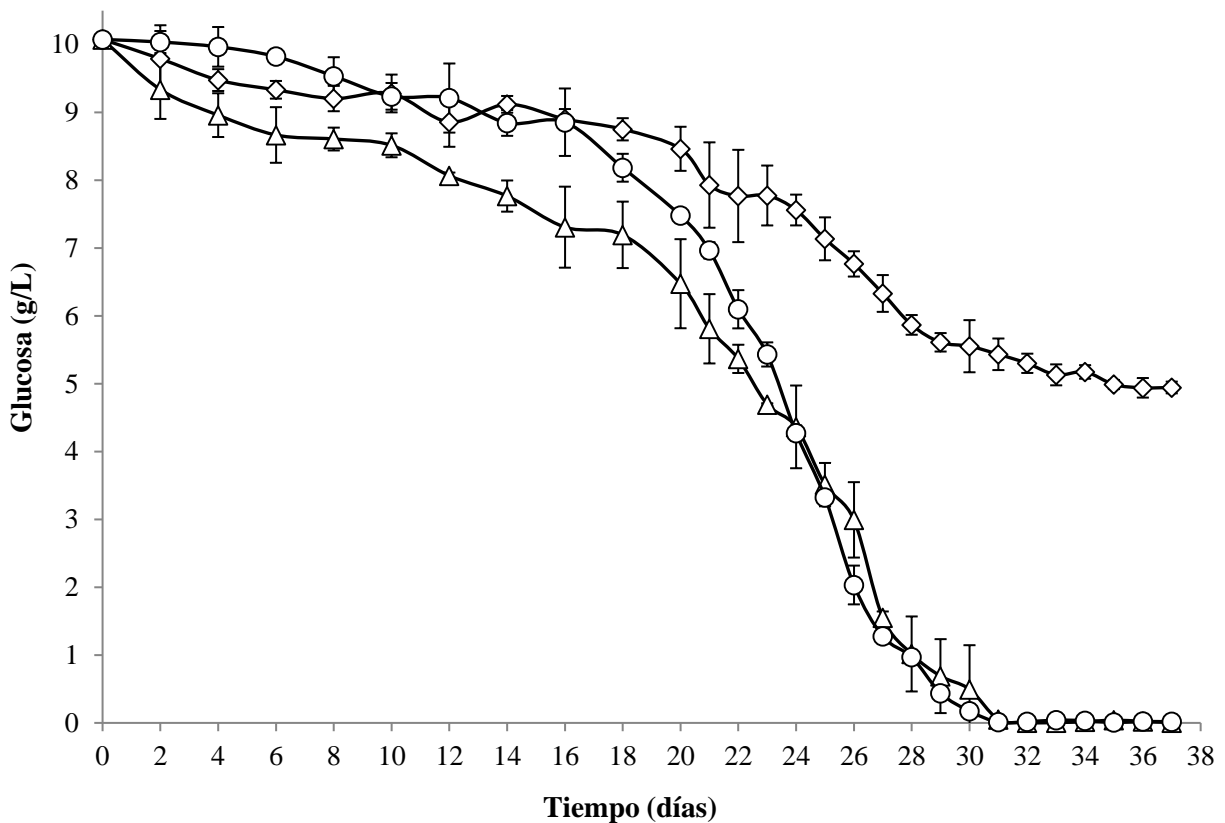


Figura 65. Perfil de concentración de glucosa de *Lentinula edodes* en medio SAF (◇), 1500 (△) y 2000 (○) mg de DEHF/L en fermentación sumergida.

6.7.2. *Pleurotus ostreatus* ATCC32783

En la figura 66 se puede observar como en los tres tratamientos el hongo *P. ostreatus* ATCC32783 consumió toda la glucosa antes de entrar en a sus respectivas fases de crecimiento estacionarias.

En un tratamiento testigo (SAF) la cepa consumió cerca del 12 % de la cantidad inicial de glucosa durante los primeros 9 días de incubación (fase de crecimiento de adaptación y fase de transición a la exponencial), lo que explica el lento crecimiento durante este lapso de tiempo. Durante la fase de crecimiento exponencial (día 10 a 18) de este hongo se presentó el mayor consumo de glucosa, el cual fue de aproximadamente 8.8 g/L. En este medio *P. ostreatus* ATCC32783 tardó más tiempo en consumir el total de la glucosa presente como única fuente de carbono y energía, lo que dio como resultado la menor producción de X_{max} obtenida en contraste con el resto de los tratamientos.

En el tratamiento con 1500 mg de DEHF/L se puede observar que durante los primeros días de crecimiento, el hongo (durante su fase de adaptación) consume el 20% de la glucosa. Durante este período de tiempo esta cepa degradó el 87 % del DEHF a metabolitos de menor peso molecular (probablemente menos tóxicos para su desarrollo), lo que estimuló posteriormente el rápido consumo de glucosa, dando como resultado la fase crecimiento exponencial. Es durante este tiempo (día 7 a 14) que *P. ostreatus* ATCC32783 consume el 80% de la glucosa restante y una vez que la ha terminado de consumir es que entra a la fase de crecimiento estacionaria. Cabe Destacar que a la par se fue degradando el 13% restante del DEHF a MEHF.

Es debido a este rápido consumo de la glucosa que la X_{max} se ve incrementada significativamente en comparación con el medio testigo.

En un medio con mayor concentración de DEHF, éste incremento tiene un efecto significativo en el tiempo de consumo de glucosa, dado que se va haciendo más lento. Sin embargo, al igual que en el tratamiento anterior, en un medio con 2000 mg de DEHF/L se observó que es durante la fase de crecimiento de adaptación que el hongo consume la menor cantidad de glucosa (cerca del 15%). Es el mismo lapso de tiempo en el que se observa la degradación de la mayor concentración de DEHF (75 %) a metabolitos de menor peso molecular. Esto estimula posteriormente el rápido consumo de glucosa, dando como resultado la fase crecimiento exponencial. Es durante esta fase (día 9 a 16) que el hongo consume la mayor cantidad de glucosa restante (85%) y degrada una menor concentración de DEHF. Una vez que ha terminado de consumir la glucosa y de que en el medio se encuentra únicamente MEHF, es que el hongo entra a la fase de crecimiento estacionaria. Es por esto que la X_{max} se ve incrementada significativamente en comparación con el medio con menor concentración de DEHF y el medio testigo, obteniendo los valores más altos para esta variable en este tratamiento. Presentando una relación directamente proporcional con la cantidad de glucosa consumida durante la fase exponencial.

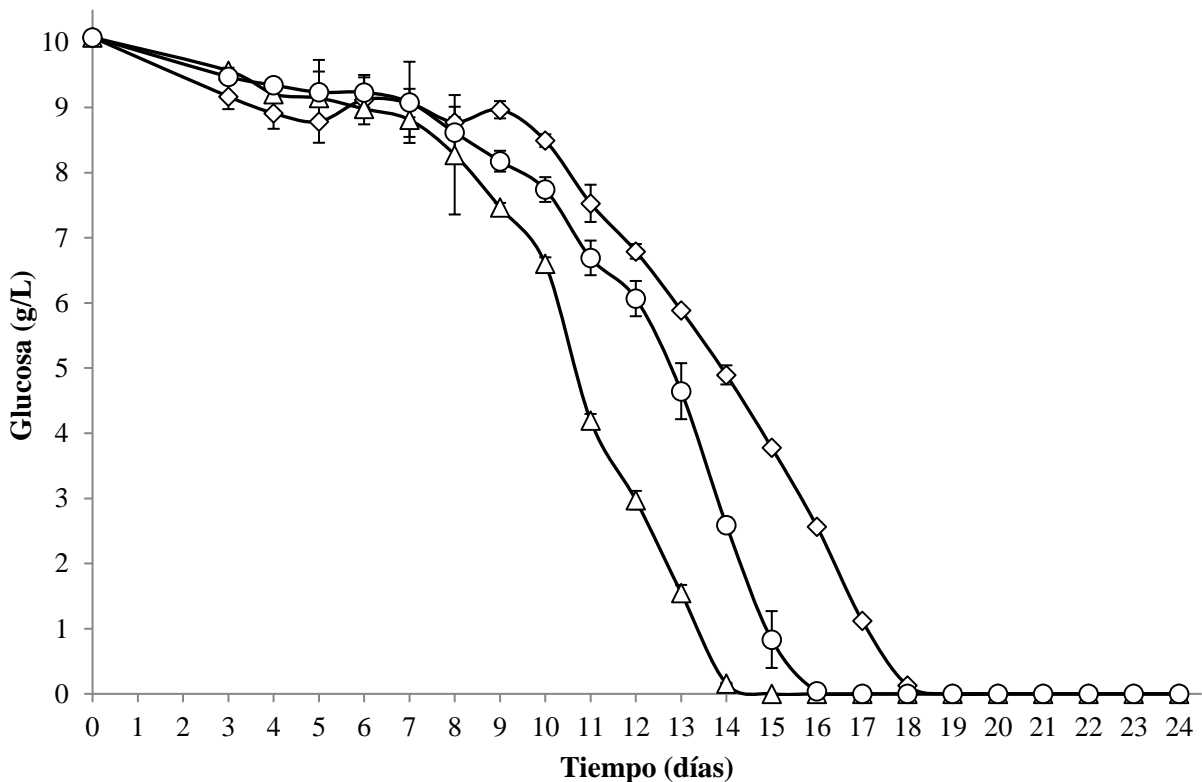


Figura 66. Perfil de concentración de glucosa de *Pleurotus ostreatus* ATCC32783 en medio SAF (◇), 1500 (△) y 2000 (○) mg de DEHF/L en fermentación sumergida.

6.7.3. *Pleurotus pulmonarius*

En la figura 67 (al igual que en la cepa anterior) se observa como en los tres tratamientos la cepa *P. pulmonarius* consumió toda la glucosa antes de entrar en a sus respectivas fases de crecimiento estacionarias.

En el medio SAF la cepa consumió cerca del 13 % de la cantidad inicial de glucosa durante los primeros 12 días de incubación (fase de crecimiento de adaptación), lo que explica el evidente lento crecimiento durante este lapso de tiempo. Durante la fase de crecimiento exponencial (día 13 a 21) de este hongo se presentó el mayor consumo de glucosa, el cual fue de aproximadamente 8.7 g/L. En este tratamiento *P. pulmonarius* tardó más tiempo en consumir el total de la glucosa presente como única fuente de carbono y energía, lo que dio como resultado la menor producción de X_{max} (7.206 g/L) obtenida en contraste con el resto de los tratamientos.

En el tratamiento con 1500 mg de DEHF/L se observó que durante los primeros 7 días de crecimiento (fase de adaptación) el hongo consume el 14% de la glucosa. Durante este período de tiempo esta cepa degradó el 70 % del DEHF a metabolitos de menor peso molecular (probablemente menos tóxicos para su desarrollo), lo que estimuló posteriormente el incremento en el consumo de glucosa, dando como resultado la fase crecimiento exponencial. Es durante este tiempo (día 7 a 16) que *P. pulmonarius* consume el 86% de la glucosa restante y una vez que la ha terminado de consumir es que entra a la fase de crecimiento estacionaria. Cabe destacar que al mismo tiempo se fue degradando el 30 % restante del DEHF a MEHF.

Es debido a este rápido consumo de la glucosa que la X_{max} se ve incrementada en comparación con el medio testigo.

En un medio con 2000 mg de DEHF/L se observó que este incremento en la concentración de ftalato tiene un efecto en el tiempo de consumo de glucosa, dado que se va haciendo más lento. Sin embargo, al igual que en el tratamiento anterior, en este medio se registró que es durante la fase de crecimiento de adaptación y de transición a la exponencial (día 1 a 8) que el hongo consume la menor cantidad de glucosa (cerca del 12%). Es el mismo lapso de tiempo en el que se observa la degradación de la mayor concentración de DEHF (cerca del 70 %) a metabolitos de menor peso molecular. Lo que estimula posteriormente el rápido consumo de glucosa, dando como resultado la fase crecimiento exponencial. Es durante esta fase (día 9 a 17) que el hongo consume la mayor cantidad de glucosa restante (87%) y degrada una menor concentración (casi el 30%) de DEHF. Una vez que ha terminado de consumir la glucosa y de que en el medio se encuentra únicamente MEHF, es que el hongo entra a la fase de crecimiento estacionaria.

Es por esto que la X_{max} se ve incrementada significativamente en comparación con el medio con menor concentración de DEHF y el medio testigo, obteniendo los valores más altos para esta variable en este tratamiento (8.928 g/L). Presentando una relación directamente proporcional con la cantidad de glucosa consumida durante la fase exponencial.

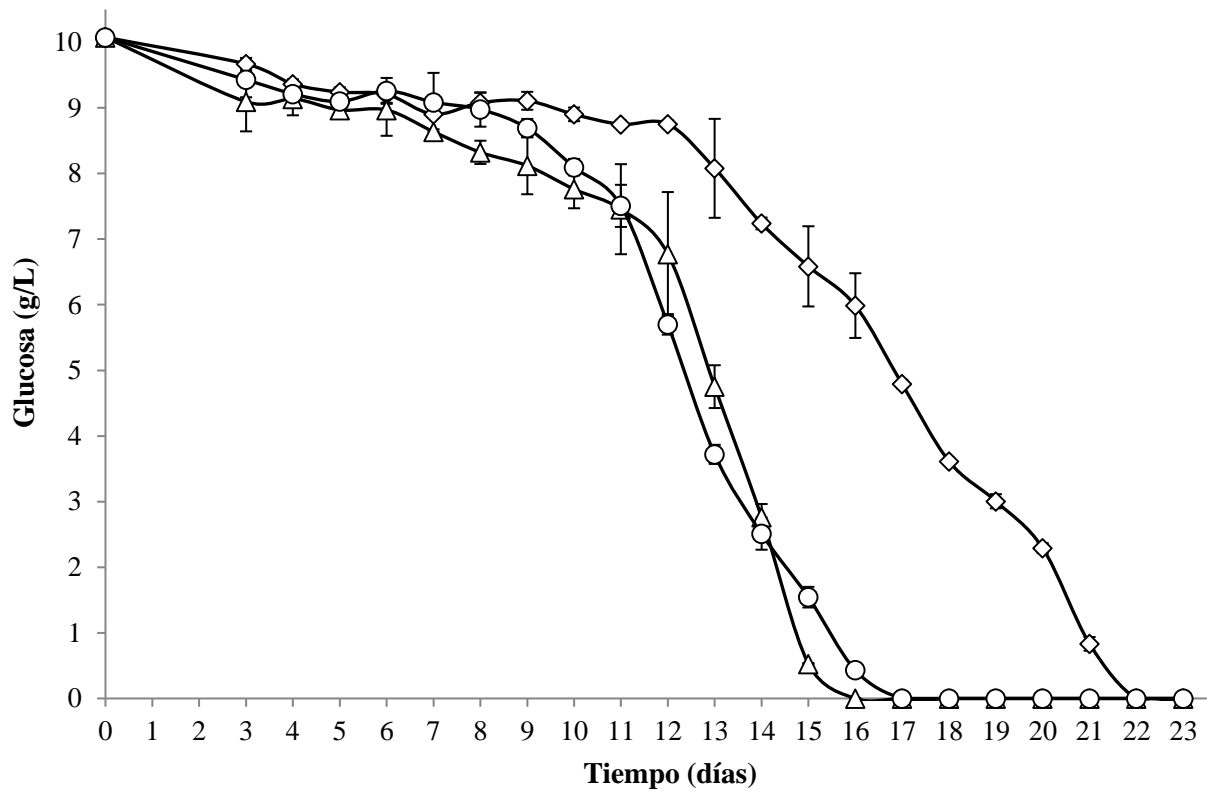


Figura 67. Perfil de concentración de glucosa de *Pleurotus pulmonarius* en medio SAF (◇), 1500 (△) y 2000 (○) mg de DEHF/L en fermentación sumergida.

7. DISCUSIÓN

El DEHF es uno de los polímeros más utilizados hoy en día que al liberarse en el ambiente provoca daños a la salud de diferentes organismos (Foster *et al.* 1980; Heindel *et al.* 1989; Lovekamp y Davis 2001; Akingbemi y Hardy, 2001; Dalsenter *et al.* 2006; Grande *et al.* 2007; Li *et al.* 2013), es por esto que es importante el desarrollo de nuevas tecnologías que contribuyan con su eliminación. Siendo así, la capacidad de adaptación de los microorganismos a los diversos ambientes estresantes una bendición para la humanidad. Tal es el caso de algunos hongos comestibles que son capaces de crecer en presencia de este compuesto (Hwang, *et al.* 2008; Kim y Song, 2009; Hwang, *et al.* 2012; Suárez-Segundo *et al.* 2013; Córdoba-Sosa *et al.* 2014).

Los hongos requieren al menos una fuente de carbono (C) y nitrógeno (N) para su crecimiento y reproducción (Gao *et al.* 2007; Walker y White, 2011). Varios tipos de fuentes de C y N pueden ser utilizadas específicamente por las cepas empleadas en este estudio, debido a su habilidad para secretar varias enzimas para la degradación de polímeros en moléculas más pequeñas (Sánchez 2009). Dado que algunos de los tratamientos de este trabajo contenían como fuente de carbono glucosa y DEHF se esperaba que mediante la secreción de enzimas estererasas y lacasas el DEHF se degradara hasta ácido ftálico como en trabajos reportados por Nalli *et al.* 2002; Kim *et al.* 2003; Lee *et al.* 2007; Liang *et al.* 2008; Hwang *et al.* 2012. Sin embargo, los perfiles de consumo de glucosa y los análisis por GC/MS demostraron que las tres cepas consumen la glucosa como fuente de carbono durante su fase de crecimiento de adaptación y exponencial. Sin embargo, a pesar de que las tres cepas degradan el DEHF únicamente hasta MEHF, sí son capaces de utilizar los diferentes alcoholes formados (McCullough *et al.* 1986) durante este proceso de degradación como fuente de C, lo que concuerda con lo mencionado por Wessels (2005). Esto explica el notorio incremento en la formación de biomasa en los tratamientos con DEHF respecto a los tratamientos testigo en los tres hongos utilizados.

Los datos obtenidos en este estudio corroboraron que *L. edodes* es el hongo de crecimiento más lento en comparación con las dos cepas utilizadas del género *Pleurotus*, tanto en un medio SAF como en un medio con DEHF. Dicho hongo inició su fase de crecimiento exponencial al día 18 de incubación en un medio SAF y al día 12 en los medios con DEHF. Por lo que, el modelo de crecimiento aplicado para esta cepa fue el más adecuado, ya que como menciona Peleg (2006), un modelo de este tipo es particularmente conveniente en la descripción de las curvas sigmoides de

crecimiento con una larga fase lag y como se observó en la figura 21, *L. edodes* presentó una considerable larga fase de adaptación (lag).

Se ha reportado que esta especie es de lento crecimiento aún en medios con condiciones que favorecen su desarrollo óptimo. Aminuddin *et al.* 2007 y Hermann *et al.* 2013, han encontrado que en especies diferentes del género *Lentinula*, el hongo entra a su fase de crecimiento después de los primeros 13 días de incubación en fermentación sumergida. En cambio, la cepa utilizada en este estudio tardó 1 día menos en entrar en esta fase de crecimiento y tuvo valores mayores de X_{max} en los tratamientos con DEHF. Esto nos indica que el DEHF actúa como inductor del crecimiento y la producción de biomasa a través de la producción de alcoholes liberados de las cadenas obtenidas de la formación de diheptil ftalato, ditridecil ftalato, MBF y MEHF, dichos alcoholes son los que utilizan como fuente de carbono dado que se sintetizan durante la trofofase (al inicio de la fase exponencial y su mayor presencia se detectó al entrar a la fase estacionaria). Y es durante esta fase que se sintetizan en abundancia los metabolitos esenciales para el crecimiento (Wessels, 2005) Estos resultados concuerdan con lo reportado por Lee *et al* (2004; 2007) con *P. chrysosporium*, *T. versicolor*, *D. concéntrica* y *P. brumalis*. Sin embargo, la presencia de alcoholes como metil 13-octadecanoato, n-propil 11 octadecanoato, 2-[2-[2-(2-butoxi)etoxi]etoxi]etanol, 6-heptano-2,4-diol, 9-octadecanal, hexano, trifluoroacetato 9-decan-1-ol, acetato 11,13-dimetil-12-tetradecen-1-ol y 12-Crown-4 durante la fase de crecimiento estacionaria se puede deber a que estos metabolitos también pueden ser metabolizados adicionalmente (Wessels, 2005).

La degradación parcial del compuesto inicial (DEHF) se puede deber a que como en la degradación bacteriana de ésteres de ftalato, algunos organismos pueden hidrolizar selectivamente un enlace éster para obtener mono alquil ésteres y es cuando el alcohol liberado se usa metabólicamente para el crecimiento (Gu *et al.* 2004; Gu *et al.* 2005; Li *et al.* 2005; Xu *et al.* 2006). Esta selectividad se atribuye a enzimas específicas, como las esterases, para la hidrólisis de uno u otro ftalato, ya sea el original compuesto dialquílico o su monoéster, para el cual también habrá una enzima específica para su hidrólisis, que sería diferente de la que se encargó de la hidrólisis del ftalato dialquílico (Zhu Hua *et al.* 2012). Otra posible razón, es la ausencia de genes que se encarguen de la transcripción de aquellos que sintetizan las esterases necesarias para la degradación del mono-éster, como en el trabajo reportado por Whangsuk *et al.* (2015).

Por otro lado, también se ha reportado que hay organismos que pueden convertir ocasionalmente las largas cadenas alquílicas en cadenas más cortas a través de la β -oxidación mediante la

eliminación de grupos etilo (Amir *et al.* 2005). Estudio en el que dos genes clonados de esterasa, *estB* y *estG*, en *Sphingobium* sp. SM42 participaban en el metabolismo de DBF, sin embargo la proteína sintetizada por cada gen cumplía un papel muy específico durante el proceso degradativo, e incluso otro gen (*estR*), que codificaba para la proteína EstR actuaba como regulador transcripcional positivo que mediaba la inducción de la expresión del gen de esterasas *estB*.

Dado que *L. edodes* es un hongo con un sistema metabólico que se caracteriza por la formación de metabolitos ácidos (Boyle 1998) se explica la formación en mayor abundancia de diferentes alcoholes y ácidos orgánicos durante la trofofase, tales como: 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4Hpirano-4-uno, ácido acético, ácido imidodicarbónico, el ácido 2-oxo-butanoico, ácido propanoico, ácido pentafluoropropionico, ácido metoxiacético, ácido 4,9-decadienoico, ácido cis-vaccénico, ácido 9-tetradecenoico, ácido nonanoico, ácido pentanoico, ácido oleico, ácido 2-hexanodioico, ácido dicloroacético y ácido 13-bromotetradecanoico, 2,2'-[oxibis(2,1-etanediiloxi)]di-etanol, 1,3-butanediol, 2-[2-[2-(2-butoxi)etoxi]etoxi]etanol, monoacetato de 1,2,3-propanetriol, 2,3-butanediol, hexagol, glicidol, etanodiol, 1,3-dihidroxi-2-propanona, 2,3-butanediol, propanol, 2-(viniloxi)etanol, 2-(metoxi metoxi), etoxietano, pentanal, heptanal, tridecadenal, 14-metil-8-hexadecanal, 1,4,7,10,13,16-hexaocaciclooctadecano, isopropanol, butanal, 2-amino,1-propanol, 1-hexadecanol, etanedial, octadecadienol y 2-bromo-etanol, acetonitrilo y 15-crown-5. La liberación en el medio de estos metabolitos explica que el perfil de pH de esta cepa se desarrollara principalmente en niveles ácidos conforme se degradaba el DEHF. Sin embargo, la presencia de compuestos aminados con abundancias menores, tales como aminoheptano, hidrazina, aziridina, propanamida, 1-metildodecilamina y dimetilamina fueron los que provocaron que al final de la fermentación el pH se hiciera ligeramente más básico. Estos patrones son similares a los reportados por Lee *et al.* (2004) con tres basidiomicetos de pudrición blanca.

Los metabolitos primarios fueron, probablemente, los responsables de la coloración amarillenta del medio conforme se degradó el DEHF, lo que también funcionó como indicativo indirecto de este proceso. Cabe resaltar que el medio testigo siempre presentó la coloración amarilla característica en esta cepa.

En el género *Lentinula* se ha reportado la presencia de lacasas extracelulares que catalizan la oxidación de *p*-difenoles y compuestos diaminoaromáticos, con preferencia por éstos últimos (Leatham y Stahmann, 1980), lo que explica la mayor actividad de estas enzimas durante los

últimos días de la fermentación, ya que fue en estos tiempo cuando hubo mayor presencia de compuestos aminados, revelando abundancias relativamente mayores en comparación con los primeros 31 días de cultivo.

El perfil enzimático de las lacasas presentó el mismo patrón en los tres tratamientos y U/l mayores a las reportadas en estudios previos (Kim y Song, 2009; Hwang *et al.* 2012; Córdoba-Sosa *et al.* 2014), lo que se debió por una parte a la presencia tanto de lacasas constitutivas como inducibles (isoenzimas u otro tipo de lacasas), ya que las formas de estas enzimas es diferente de acuerdo con los hongos que las producen al estar en contacto de compuestos aromáticos (Fahraeus *et al.* 1962; Bollag y Leonowicz, 1984; Platt *et al.* 1984).

Cabe resaltar que la mayor E_{max} de estas enzimas se obtuvo con esta cepa en los medios con DEHF, lo que se atribuye a que esta actividad en hongos puede ser incrementada por adición de diferentes compuestos aromáticos, principalmente aquellos con grupos amino (Fahraeus *et al.* 1958), como los resultantes del proceso de degradación de DEHF.

Con respecto a los rendimientos enzimáticos obtenidos para estas enzimas, el Y_{EX} , q_p y P presentaron una relación directa con la mayor E_{max} alcanzada en el medio con 1500 mg de DEHF/l, resultados similares a los obtenidos con tanasas de *A. niger* (Viniegra-González *et al.* 2003) y lacasas de *P. ostreatus* ATCC3526 (Córdoba-Sosa *et al.* 2014). Cabe resaltar que la mayor E_{max} obtenida por esta cepa fue la más alta de las tres cepas utilizadas en los tres medios de cultivo.

Con respecto a las enzimas esterases, su perfil enzimático nos indica que estas enzimas extracelulares son (al igual que en las lacasas) tanto constitutivas (por su presencia en el medio SAF) como inducibles (Quan *et al.* 2004), ya que la mayor actividad de éstas se presenta en los tratamientos con DEHF. Esto se puede deber a la presencia de isoformas de una misma enzima o a otro grupo de enzimas esterases, las cuales podrían ser lipasas como la cutinasa o carboxil esterases (Bornscheuer, 2002). Estudios realizados por Kim *et al.* (2003) sugieren que probablemente se deba a una lipasa muy similar a la cutinasa, puesto que esta es la enzima que se ha reportado como la responsable de la degradación inicial de DEHF a MEHF en otros grupos de hongos.

De acuerdo con los picos observados se puede pensar hasta el momento en 3 enzimas o isoformas presentes en el medio, una que presenta los picos más altos durante la fase lag de crecimiento, la cual podría ser la responsable de la degradación de DEHF a MEHF. Otra que presenta picos

estables a lo largo del resto de la fermentación, encargada de la degradación de otros metabolitos. Esta enzima podría ser la misma que se encuentre de manera constitutiva en el tratamiento testigo u otra, totalmente diferente inducida por la presencia de metabolitos específicos resultantes de la degradación de DEHF. Y otra enzima que se presenta durante el último de la fermentación con niveles superiores a las 60 U/l en los tres medios, probablemente constitutiva, ya que sigue el mismo patrón en los tres tratamientos.

Los resultados de este estudio sugieren que en *L. edodes* las enzimas estererasas tienen una participación importante durante la degradación de DEHF a MEHF dado que su mayor actividad se presentó en los días en que se llevó a cabo dicha transformación. También se deduce que esta enzima es específica únicamente para DEHF y no para MEHF y que probablemente este hongo no cuenta con la enzima específica para la degradación de MEHF, o en su caso, carezca de los genes que la codifican. Esto concuerda con lo reportado por Niazi, *et al.* (2001), Lee *et al.* (2004; 2007), Xu *et al.* (2006), Hwang *et al.* (2012) y Whangsuk *et al.* (2015). quienes mencionan que las estererasas son las posibles enzimas responsables de la degradación de los ftalatos a través de procesos de deesterificación, transesterificación e hidrólisis de los enlaces covalentes de las cadenas alquílicas y sus ramificaciones.

Para estas enzimas, el Y_{EX} , q_p y P no presentaron una relación directa con la mayor E_{max} alcanzada en el medio con mayor concentración de DEHF, ya que en este caso la concentración de DEHF si tuvo un efecto significativo sobre dichos rendimientos. Estos resultados tienen una relación directa con la cantidad de enzima formada y el incremento en la biomasa producida debido al uso de determinados alcoholes como fuente de carbono. Nuestros resultados fueron muy diferentes a los obtenidos por Córdoba-Sosa *et al.* (2014) con estererasas de *P. ostreatus* ATC3526. Lo que se debe a la variación en la producción de enzimas propias del metabolismo primario y secundario de cada especie.

En *L. edodes*, *P. ostreatus* ATCC32783 y *P. pulmonarius* la μ obtenida presentó una relación inversamente proporcional con la concentración de DEHF presente en el medio, es decir, conforme se incrementó la concentración de DEHF la μ disminuía. Sin embargo, en el tratamiento SAF la μ fue menor en comparación con el tratamiento con menor concentración de DEHF. Estos resultados mostraron el mismo patrón que los obtenidos por Córdoba-Sosa *et al.* (2014) trabajo en

el que reportan que *P. ostreatus* ATCC3526 presentó una μ mayor en el tratamiento con menor concentración de DEHF (750 mg/L) en comparación con el tratamiento testigo, pero dicha μ también fue mayor en comparación con la obtenida en los tratamientos con mayor concentración de DEHF (1200 y 1500 mg de DEHF/L).

P. ostreatus ATCC32783 inició su fase de crecimiento exponencial al día 6 de incubación en los tres tratamientos utilizados, resultados contrarios a los reportados por Córdoba-Sosa *et al.* (2014) con la cepa *P. ostreatus* ATCC3526, la cuál entró a su fase exponencial el día 7 en los tratamientos con DEHF pero en el medio testigo tardó mucho más en iniciar su fase exponencial (día 9). De acuerdo con Pelege (2006) se podría utilizar otro modelo de crecimiento que resulte más conveniente de acuerdo con las curvas sigmoides obtenidas y con una fase lag corta, como es el caso de esta cepa. Por lo que el uso del modelo de Gompertz o el de Baranyi y Roberts podría ser una opción fiable.

La cepa de *P. ostreatus* utilizada en este estudio alcanzó mayores valores X_{max} en los tratamientos con DEHF, siendo éstos los valores más altos también obtenidos en comparación con las otras dos cepas fúngicas utilizadas en este trabajo.

Esto nos indica (al igual que en *L. edodes*) que el DEHF actúa como inductor de la producción de biomasa a través de la formación de alcoholes liberados de las cadenas alquílicas de los metabolitos ciclohexil 2-pentil ftalato, di(2-metilbutil) ftalato y MEHF. Estos alcoholes son los que utiliza como fuente de carbono dado que se sintetizan durante la trofofase y es durante esta fase que se sintetizan en abundancia los metabolitos esenciales para el crecimiento (Wessels, 2005). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Lee *et al.* (2004; 2007) con *P. chrysosporium*, *T. versicolor*, *D. concéntrica* y *P. brumalis*. Sin embargo, la presencia de alcoholes en esta cepa, durante la fase de crecimiento estacionaria, tales como 2-(viniloxi)-etanol, 1,3,3-trimetoxibutano, pentaetilen glicol, 1-[2-[2-(1-metiletoxi)etoxi]etoxi]-etanol, aminopropanol, 2-cloro-4,6di(metiltio)-1,3,5-triacina, se pudo deber a que estos pocos metabolitos también pueden ser metabolizados adicionalmente (Wessels, 2005).

La degradación parcial del compuesto inicial se puede deber a lo reportado por Gu *et al.* (2004; 2005), Li *et al.* (2005) y Xu *et al.* (2006), en donde algunos organismos pueden hidrolizar selectivamente un enlace éster para obtener mono alquil ésteres y es cuando el alcohol liberado se usa metabólicamente para el crecimiento. Esta selectividad se atribuye a enzimas específicas, en el

caso de esta especie, las esterasas (Hwang *et al.* 2008; 2012; Córdoba-Sosa *et al.* 2014) que hidrólisisarían uno u otro ftalato, ya sea el original compuesto dialquílico o su monoéster, para el cual también habrá una enzima específica para su hidrólisis, que sería diferente de la que se encargó de la hidrólisis del ftalato dialquílico (Zhu Hua *et al.* 2012). Otra posible razón, es la ausencia de genes que se encarguen de la transcripción de aquellos que sintetizan las esterasas necesarias para la degradación del mono-éster, como lo reporta Whangsuk *et al.* (2015).

También se ha reportado que hay organismos que pueden convertir ocasionalmente las largas cadenas alquílicas en cadenas más cortas a través de la β -oxidación mediante la eliminación de grupos etilo (Amir *et al.* 2005), ruta que estaría siguiendo esta cepa en tres de los cuatro pasos propuestos en esta investigación.

Por otro lado, Hwang *et al.* (2008), reportan específicamente para *P. ostreatus* que el sobrenadante de este cultivo únicamente degrada el 14.9% de una concentración inicial de 100 mg/l de BBF, pero el micelio homogenizado logra remover el 100 % del compuesto en 2 días, incluso en agua destilada, indicando que la biodegradación total del BBF podría ser atribuida a enzimas asociadas al micelio en lugar de enzimas extracelulares. Esto explicaría que la cepa de esta especie utilizada en este trabajo degradara el DEHF únicamente a MEHF como metabolito final, ya que no se utilizó ningún extracto intracelular de los pellets para probar la presencia de enzimas capaces de degradar este compuesto hasta un metabolito de menor peso molecular como el ácido ftálico. Esto también nos indicaría que probablemente las enzimas asociadas con la degradación de MEHF son intracelulares, sin embargo, dado que este metabolito no resulta tóxico para el hongo, éste puede sobrevivir en el medio sin necesidad de excretar esas enzimas al medio.

Para la adquisición de nutrientes, las hifas a menudo tienen que crecer sobre o a través de interfaces entre entornos hidrófilos e hidrófobos. Un notable grupo de pequeñas proteínas secretadas, llamada hidrofobinas, puede desempeñar un papel importante en dichas interfaces, así como en otros procesos de gran importancia fisiológica. Después de su secreción y encontrándose con una interfaz entre un ambiente hidrofílico (agua) y uno hidrofóbico (DEHF), éstas se ensamblan para formar una membrana anfipática hidrofílica en la superficie, orientada hacia el lado acuoso, pero hidrofóbica en la superficie que da al entorno hidrofóbico (Wessels, 2000; 2005; Talbot, 2001). Esto permitiría al hongo continuar su crecimiento

Dado que en otros trabajos se reporta la presencia de alcoholes y ácidos orgánicos en mayor abundancia durante la degradación de ésteres de ftalato de bajo y elevado peso molecular (Kim *et al.*

2003; Quan *et al.* 2004; Xiang-Rong *et al.* 2006; Lee *et al.* 2004; 2007), esto explicaría la formación (durante la trofofase) en mayor abundancia de (3-metil-oxiran-2-il)metanol, 2,3-butanediol, 9,17-octadecadienal, ácido carbónico, ácido n-hexadecanoico, ácido cis-11,14-eicosadienoico, ácido tetradecanoico, hexano, 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-pirano-4-uno, 9,17-octadienal, etanol, glicidol, ácido tetradecenoico, ácido n-hexadecanoico, ácido oleico, ácido imidodicarbónico, glicidol, 2-[2-(2-butoxi)etoxi-etanol, etanol, 1,4,7,10,13,16-hexaoxaciclooctadecano, 1,3,3-trimetoxibutano, 3,-diisopropoxi-1,1,1,5,5,5-hexametiltrisiloxano, 1,4-dioxan-2-il hidropéroxido, hexametil-ciclotrisiloxano, hexametil-2-etilacridina ciclotrisiloxano, heptametiltrisiloxano, 15-crown-5, etano, 3-amino-6metil-tieno[2,3-b]piridina-2-carboxamida, ácido silícico, ácido hexanoico, ácido carbónico e isonitrosoacetofenona.

Como es notable, la cantidad de metabolitos ácidos es menor que la presentada por *L. edodes*, lo que explica que en *P. ostreatus* los cambios de pH no se inclinen radicalmente hacia niveles muy ácidos y se mantengan oscilando a lo largo de la fermentación entre 5.6 y 7.4.

Estos metabolitos primarios también fueron los responsables de la coloración amarillo-verdosa que adquirió el medio conforme se fue degradando el DEHF, lo que se asoció indirectamente con el transcurso positivo e este proceso. Cabe resaltar que el medio testigo siempre presentó la coloración amarillo-verdosa característica en esta cepa.

En *P. ostreatus* se ha reportado la presencia de lacasas extracelulares que catalizan la oxidación de una gran variedad de compuestos fenólicos y no fenólicos (Arora y Sharma, 2010), lo que explica la versátil actividad de estas enzimas a lo largo de los días de cultivo en los tratamientos con y sin DEHF.

El perfil enzimático de las lacasas presentó un patrón similar en los tratamientos con DEHF y valores superiores a las 100 U/l, resultando ser dicha actividad mayor que la ya reportada en esta especie en presencia de DEHF, BBF y DMF (Kim y Song, 2009; Hwang *et al.* 2012; Córdoba-Sosa *et al.* 2014). Cabe resaltar que la E_{max} más alta se presentó en el medio con 1500 mg de DEHF/l. Esto se debe probablemente a la presencia tanto de lacasas constitutivas como inducibles (isoenzimas u otro tipo), cuya actividad de estas últimas es promovida por la presencia de metabolitos principalmente aromáticos (Palmieri *et al.* 2000; Cohen *et al.* 2002) resultantes del proceso de degradación de DEHF.

Los niveles superiores de lacasas en este estudio en medios con y sin DEHF se pueden deber, por una parte a una gran variedad de tipos de lacasas o sus isoformas, ya que que como estas enzimas

no son específicas, consecuentemente oxidan una amplia variedad de sustratos estructuralmente diferentes (Palmieri *et al.* 2000), como los diferentes metabolitos aromáticos y no aromáticos obtenidos de la transformación del DEHF.

Esta especie fúngica produce varias isoenzimas de lacasas extracelulares, entre las que se encuentran POXA1b, POXA1w, POXA2 y POXC, debido a que estas son las más abundantes (Cohen *et al.* 2002), se espera que las lacasas que se encuentran presentes al menos en el tratamiento testigo pertenezcan a una de éstas. En caso de que se presentaran las mismas lacasas constitutivas en los tratamientos con DEHF que en el medio SAF, se espera que sean POXA1w y POXA1b, ya que son mucho más estables que POXA2 y POXC (Giardina *et al.* 1999).

Se ha reportado que estas enzimas son las responsables del ataque inicial al anillo aromático en compuestos fenólicos. La apertura de dicho anillo es un paso necesario para la mineralización de estos compuestos (Cohen *et al.* 2002), por lo que probablemente con la deesterificación del MEHF se podría proceder con la ruptura del anillo bencénico y llegar a mineralizarlo completamente.

Con respecto a los rendimientos enzimáticos obtenidos para estas enzimas, el Y_{EX} y q_p presentaron (al igual que *L. edodes*) una relación directa con la mayor E_{max} alcanzada en el medio con 1500 mg de DEHF/l, lo que resultó similar a los datos obtenidos por Viniestra-González *et al.* (2003) con tanasas de *A. niger* y Córdoba-Sosa *et al.* (2014) con lacasas de *P. ostreatus* ATC3526. Sin embargo, la productividad de estas enzimas fue mayor en el tratamiento testigo, lo que nos dice que se puede obtener mayor cantidad de enzima en menos tiempo en un tratamiento sin adición de ftalato. Por lo que el DEHF también podría estar actuando como inhibidor de algunas de estas enzimas constitutivas.

En el caso de las esterasas, los resultados de este estudio sugieren que en *P. ostreatus* ATCC32783 las enzimas esterasas tienen una participación significativa durante la degradación de DEHF a MEHF dado que su pico de mayor actividad en los medios con DEHF se presentó en los días en que se llevo a cabo este proceso degradativo. Lo que concuerda con lo reportado por Niazi, *et al.* (2001), Lee *et al.* (2007), Xu *et al.* (2006) y principalmente por Hwang *et al.* (2012) y Córdoba-Soa *et al.* (2014), quienes atribuyen el inicio de este proceso degradativo a las esterasas, específicamente a través de una ruta de deesterificación de las cadenas alquílicas y la hidrólisis de los enlaces covalentes de las mismas cadenas y sus ramificaciones. El paso inicial de

deesterificación efectivamente se dió mediante la ruptura del enlace éster que une a una de las cadenas alquílicas con el anillo bencénico, resultando al final en la formación del MEHF.

El perfil enzimático de las esterasas también nos indica que estas enzimas extracelulares son (al igual que en las lacasas) tanto constitutivas (por sus elevados niveles en el medio SAF) como inducibles, ya que sí hubo actividad de éstas en los tratamientos con DEHF. Esto se puede deber a la presencia de isoformas de una misma enzima o a otro grupo de enzimas esterasas, las cuales podrían ser lipasas como la cutinasa o carboxil esterasas (Bornscheuer, 2002). Sin embargo, las U/l reportadas para esta especie en presencia de BBF (Hwang *et al.* 2012) fueron mayores que en las obtenidas en este trabajo, lo que se puede deber a la mayor cantidad de uniones éster en el BBF en comparación con el DEHF.

Estudios realizados por Kim *et al.* (2003) sugieren que probablemente se deba a una lipasa muy similar a la cutinasa, puesto que esta es la enzima que se ha reportado como la responsable de la degradación inicial de DEHF a MEHF.

De acuerdo con los picos observados se puede pensar hasta el momento en 4 enzimas o isoformas presentes en el medio, una que representa los picos más altos durante el inicio de fase exponencial de crecimiento, la cual podría ser la responsable de la degradación de DEHF a MEHF. Otra que presenta picos estables a lo largo del resto de la fermentación, encargada de la degradación de otros metabolitos. Esta enzima podría ser la misma que se encuentre de manera constitutiva durante los primeros 15 días de cultivo en el tratamiento testigo u otra, totalmente diferente inducida por la presencia de metabolitos específicos resultantes de la degradación de DEHF. Una tercera enzima se presenta durante los últimos tres días de la fermentación con niveles superiores a las 70 U/l en los medios con DEHF. Y la última que vendría siendo constitutiva, ya que se presenta en el tratamiento SAF pero con la mayor actividad presentada para esta cepa.

Los resultados de este estudio sugieren que en *P. ostreatus* ATCC32783 las enzimas esterasas tienen una participación importante durante la degradación de DEHF a MEHF. También se deduce que esta enzima es específica únicamente para DEHF y no para MEHF y que probablemente este hongo no cuenta con la enzima específica para la degradación de MEHF, o en su caso, carezca de los genes que la codifican, como lo reportan Niazi, *et al.* (2001) y Whangsuk *et al.* (2015). quienes mencionan que las esterasas son las posibles enzimas responsables de la degradación de los ftalatos a través de procesos de deesterificación, transesterificación e hidrólisis de los enlaces covalentes de las cadenas alquílicas y sus ramificaciones.

Para estas enzimas, el Y_{EX} , q_p y P presentaron una relación directa con la mayor E_{max} alcanzada en el medio SAF, lo que fue muy diferentes a los resultados obtenidos por Córdoba-Sosa *et al.* (2014) con esterases de *P. ostreatus* ATC3526, quienes reportan los mayores valores de estos rendimientos en el medio con la mayor concentración de DEHF. Sin embargo estos valores fueron inferiores a los obtenidos en este trabajo, a excepción de los obtenidos en el medio con 2000 mg de DEHF/l.

Para la cepa de *P. pulmonarius* los datos obtenidos en este estudio indicaron que este el hongo que crece más rápidamente tanto en un medio SAF y en medios con DEHF al presentar valores de μ más altos en comparación con *P. ostreatus* ATCC32783 y *L. edodes*.

Este hongo inició su fase de crecimiento exponencial entre los días 6 y 7 de incubación en los tratamientos con DEHF, lo que se asemeja a lo reportado por Córdoba-Sosa *et al.* (2014), con una cepa del mismo género (*P. ostreatus* ATCC3526) en tratamientos con DEHF, sin embargo, a pesar de pertenecer al mismo género, esta especie entró a su fase estacionaria hasta el día 12 de fermentación en un tratamiento SAF. De acuerdo con Pelege (2006) se podría utilizar otro modelo de crecimiento que sea más conveniente con curvas sigmoides con una fase lag corta para ajustar el crecimiento de esta cepa en presencia de DEHF, tales como el de Gompertz o el de Baranyi y Roberts. Sin embargo, el modelo de la ecuación logística sería el más conveniente para esta especie en medios sin presencia de contaminantes como el DEHF.

P. pulmonarius alcanzó mayores valores X_{max} en los tratamientos con DEHF en comparación con *L. edodes*, pero valores menores en comparación con *P. ostreatus* ATCC32783. Esto nos indica que al igual que en las otras dos cepas utilizadas en este estudio, el DEHF actúa como inductor de la producción de biomasa a través de la formación de alcoholes liberados de las cadenas alquílicas de los metabolitos ciclohexil 2-pentil ftalato, 2-etilhexil hexil ftalato, di(2-metilbutil) ftalato y MEHF. Estos alcoholes son los que utilizó como fuente de carbono, dado que se sintetizan durante la trofofase y es durante esta fase que se sintetizan en abundancia los metabolitos esenciales para el crecimiento (Wessels, 2005) Estos resultados concuerdan con lo reportado por Lee *et al* (2004; 2007) con *P. chrysosporium*, *T. versicolor*, *D. concéntrica* y *P. brumalis*. Sin embargo, la presencia de alcoholes en esta cepa, durante la fase de crecimiento estacionaria, tales como etanol, hexanol, heptanal, propanal, 1,2,3-propanetriol, 1-propanol y 2-butanal, fue mucho menor y con

abundancias mucho menores, lo que se pudo deber a que estos metabolitos también pueden ser metabolizados adicionalmente (Wessels, 2005).

La degradación parcial del compuesto inicial se pudo deber a lo reportado por Gu *et al.* (2004; 2005), Li *et al.* (2005) y Xu *et al.* (2006), en donde algunos organismos pueden hidrolizar selectivamente un enlace éster para obtener mono alquil ésteres y es cuando el alcohol liberado se utiliza metabólicamente para el crecimiento. Esta selectividad se atribuye a enzimas específicas, que en el caso de esta especie y por lo reportado en especies de su mismo género (Hwang *et al.* 2008; 2012; Córdoba-Sosa *et al.* 2014) se trataría de las esterasas, que hidrolizarían uno u otro ftalato, ya sea el original compuesto dialquílico o su monoéster, para el cual también habrá una enzima específica para su hidrólisis, que sería diferente de la que se encargó de la hidrólisis del ftalato dialquílico (Zhu Hua *et al.* 2012). Otra posible razón, es la ausencia de genes que se encarguen de la transcripción de aquellos que sintetizan las esterasas necesarias para la degradación del mono-éster, como lo reporta Whangsuk *et al.* (2015).

También se ha reportado que hay organismos que pueden convertir ocasionalmente las largas cadenas alquílicas en cadenas más cortas a través de la β -oxidación mediante la eliminación de grupos etilo (Amir *et al.* 2005), ruta que (al igual que la cepa de *P. ostreatus*) estaría siguiendo esta cepa en tres de los cuatro pasos propuestos en este estudio.

Hwang *et al.* (2008), reportan para *P. ostreatus* que el sobrenadante de este cultivo únicamente degrada el 14.9% de una concentración inicial de 100 mg/l de BBF, pero el micelio homogenizado logra remover el 100 % del compuesto en 2 días, incluso en agua destilada, indicando que la biodegradación total del BBF podría ser atribuida a enzimas asociadas al micelio en lugar de enzimas extracelulares. Esto explicaría que *P. pulmonarius* degradara el DEHF únicamente a MEHF como metabolito final sin poder llegar a mineralizarlo. Esto también nos indicaría que probablemente las enzimas asociadas con la degradación de MEHF son intracelulares, sin embargo, dado que este metabolito no resulta tóxico para el hongo, éste puede sobrevivir en el medio sin necesidad de excretar esas enzimas al medio.

Al igual que en *P. ostreatus*, para la adquisición de nutrientes, las hifas a menudo tienen que crecer sobre o a través de interfaces entre entornos hidrófilos e hidrófobos, secretando pequeñas proteínas llamadas hidrofobinas, las cuales se ensamblan para formar una membrana anfipática hidrofílica en la superficie, orientada hacia el lado acuoso, pero hidrofóbica en la superficie que da al entorno hidrófobo (Wessels, 2000; 2005; Talbot, 2001). Esto permitiría al hongo continuar su crecimiento

Se ha reportado la presencia de alcoholes y ácidos orgánicos como sub-metabolitos de mayor abundancia durante la degradación de ésteres de ftato de bajo y elevado peso molecular (Kim *et al.* 2003; Quan *et al.* 2004; Xiang-Rong *et al.* 2006; Lee *et al.* 2004; 2007), lo que explicaría la presencia (durante la trofofase) de alcoholes y ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido tiocianico, ácido 4-metil-2-oxovalérico, ácido 4-nitro-3-oxobutírico, etanol, hexanol, heptanal, dimetilhidrazona propanal, 5-(hidroximetil)2-furancarboxaldehído, 5-isopropilideno-3,3-dimetil-dihidrofurano-2-uno, monoacetato de 1,2,3-propanetriol, 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-pirano-4-uno, 3,5-dihidroxi-2-metil-4H-pirano-4-uno, dihidro-4-hidroxi-2(3H)-furanona, dihidro-3,5-dimetil-2(3H)-furanona, 1-propanol, 2-butanal, 12-crown-4, pentaetilenglicol, 1,2-bencenodiol, ciclobutanol, 2,4-dihidro-2,4,5-trimetil-3H-pirazol-3-uno, 1,3-hidroxy-2-propanona, 1,4,7,10,13,16-hexaoxaciclooctadecano, 2,3-dimetil-,cis-oxirano, 2-metoxi-2-octano, metil silano y hexano. Sin embargo, en las fermentaciones con DEHF de esta especie también se presentaron compuestos aminados con abundancias importantes a lo largo de toda la fermentación, tales como tris(dimetilamino)metano, dimetilhidrazona, triacetina, N-hidroxi-N-metil-metamina, 5-metil-quinolina, adenina, 5-metil-pirimidin-4,6-diol, 4,5-diamino-6-hidroxipirimidina, 1,3,5-triazina-2,4,6-triamina, 1,4-dimetil-piperazina, N,N-dimetil-propanamida, N-metil-1,3-propanediamina, 4-aminopirazol(3,4-d)pirinamida, o-metilisourea hidrógeno sulfato, 2-metil-azetidina, 2,3-2H-4-metil-imidazol-2-uno, isonitrosoacetofenona y 5-amino-1H-imidazo-4-carbozamida. Como es notable, la cantidad de metabolitos ácidos es menor que la presentada tanto por *P. ostreatus* como por *L. edodes* y la de los cuemplos aminados es mucho mayor, lo que explica que en *P. pulmonarius* estos metabolitos mantuvieran probablemente los niveles de pH neutros (entre 6.0 y 7.0 principalmente) en el medio durante los 23 días de cultivo.

Estos metabolitos primarios también fueron los responsables de la coloración verdosa que adquirió el medio conforme se fue degradando el DEHF, lo que se asoció indirectamente con el transcurso positivo e este proceso. Cabe resaltar que el medio testigo siempre presentó esta coloración característica en esta cepa.

En *P. pulmonarius* también se ha reportado la presencia de lacasas extracelulares que catalizan la oxidación de algunos compuestos fenólicos (Bazalel *et al.* 1997), lo que explica la actividad de estas enzimas a lo largo de los días de cultivo en los tratamientos con y sin DEHF.

El perfil enzimático de las lacasas presentó un patrón similar en los tratamientos con DEHF y valores superiores a las 100 U/l, resultando ser dicha actividad mayor que la reportada en otras especies de este mismo género en presencia de DEHF, BBF y DMF (Kim y Song, 2009; Hwang *et al.* 2012; Córdoba-Sosa *et al.* 2014). Cabe resaltar que la E_{max} más alta de los medios con DEHF se presentó en el medio con 2000 mg de DEHF/l, actividad contrastante con la obtenida por las otras dos cepas. Esto se debe, al igual que en *P. ostreatus* y *L. edodes*, probablemente a la presencia tanto de lacasas constitutivas como inducibles (isoenzimas u otro tipo). La mayor actividad de lacasas constitutivas (en medio SAF) podría deberse a isoformas totalmente diferentes a las inducibles, ya que los niveles de actividad fueron superiores casi en un 50% en comparación con los obtenidos en tratamientos con DEHF. La presencia de enzimas inducibles se puede atribuir como en otra especie del género *Pleurotus*, a la presencia de metabolitos principalmente aromáticos (Palmieri *et al.* 2000; Cohen *et al.* 2002) resultantes del proceso de degradación de DEHF. Por otro lado, las lacasas presentes en el tratamiento testigo, podrían ser propias de ese género, pero las presentadas en los medios con DEHF podrían ser específicas para cada especie y que en presencia de contaminantes que induzcan otras enzimas o isoformas.

Los niveles superiores de lacasas en este estudio en medios con y principalmente sin DEHF se pueden deber, por una parte a los diferentes tipos de lacasas o sus isoformas, ya que como estas enzimas no son específicas, consecuentemente oxidan una amplia variedad de sustratos estructuralmente diferentes (Palmieri *et al.* 2000), ya sea como los diferentes metabolitos aromáticos obtenidos de la transformación del DEHF o aquellos presentes en el medio testigo.

Se ha reportado que estas enzimas son las responsables del ataque inicial al anillo aromático en compuestos fenólicos. La apertura de dicho anillo es un paso necesario para la mineralización de estos compuestos (Cohen *et al.* 2002), por lo que probablemente con la desterificación del MEHF se podría proceder con la ruptura del anillo bencénico y llegar a mineralizarlo completamente.

Con respecto a los rendimientos enzimáticos obtenidos para estas enzimas, el Y_{EX} y q_p presentaron (al igual que *L. edodes*) una relación directa con la mayor E_{max} alcanzada en el medio testigo, seguida del medio con mayor concentración de DEHF. Lo que resultó similar a los datos obtenidos Córdoba-Sosa *et al.* (2014) con lacasas de *P. ostreatus* ATC3526. Sin embargo, la productividad de estas enzimas fue mayor en el tratamiento con menor concentración de DEHF, lo que nos

indica que se puede obtener mayor cantidad de enzima en menos tiempo en un tratamiento con DEHF pero en una concentración igual o menor a 1500 mg/l.

En el caso de las esterasas, los resultados de este estudio sugieren que en *P. pulmonarius* las enzimas esterasas tienen una participación significativa durante la degradación de DEHF a MEHF dado que su pico de mayor actividad en los medios con DEHF se presentó en los días en que se llevo a cabo este proceso degradativo. Lo que concuerda con lo reportado por Niazi, *et al.* (2001), Lee *et al.* (2007), Xu *et al.* (2006) y principalmente por Hwang *et al.* (2012) y Córdoba-Soa *et al.* (2014), quienes atribuyen el inicio de este proceso degradativo a las esterasas, específicamente a través de una ruta de deesterificación de las cadenas alquílicas y la hidrólisis de los enlaces covalentes de las mismas cadenas y sus ramificaciones. Sin embargo este pico se ve inhibido en concentraciones mayores del compuesto, ya que a 2000 mg de DEHF/l la actividad no pasa de las 80 U/l durante el tiempo en que tuvo lugar la degradación a MEHF.

El perfil enzimático de las esterasas también nos indica que estas enzimas extracelulares son (al igual que en las lacasas) tanto constitutivas (por sus elevados niveles en el medio SAF como en el caso de *P. ostreatus* ATCC32783) como inducibles (Gandolfi *et al.* 2001), ya que sí hubo actividad de éstas en los tratamientos con DEHF. Esto se puede deber también a la presencia de isoformas de una misma enzima o a otro grupo de enzimas esterasas, las cuales podrían ser lipasas como la cutinasa o carboxil esterasas (Bornscheuer, 2002). Sin embargo, las U/l reportadas para *P. ostreatus* en presencia de BBF (Hwang *et al.* 2012) fueron semejantes a las obtenidas en este trabajo en la menor concentración de DEHF, pero menores en 2000 mg de DEHF/l. Esto se puede deber a que el BBF presenta mayor número de uniones éster en comparación con el DEHF.

Estudios realizados por Kim *et al.* (2003) sugieren que las esterasas encargadas de la degradación de DEHF pertenezcan a la familia de las lipasa, puesto que la cutinasa fúngica se ha reportado como la responsable de la degradación inicial de DEHF a MEHF en otros hongos.

De acuerdo con los picos observados se puede pensar hasta el momento en 2 enzimas o isoformas constitutivas (presentes en el medio testigo), una que representa la actividad constante en el medio SAF durante los días 3 a 17 de cultivo y otra que describa los picos más altos obtenidos durante los últimos 3 días de la fermentación.

Por otra parte se pensaría en la presencia de 3 enzimas o isoformas en los tratamientos con DEHF, la primera que podría ser responsable de la degradación de DEHF a MEHF. Otra que presenta

picos estables a lo largo del resto de la fermentación, la cual podría ser constitutiva y estaría encargada de la degradación de otros metabolitos. Y una tercera enzima se presenta durante los últimos tres días de la fermentación, con niveles superiores a las 350 U/l. Probablemente esta última también vendría siendo constitutiva, ya que presenta el mismo patrón de actividad que en el medio testigo.

Los resultados de este estudio sugieren que en *P. pulmonarius* las enzimas esterasas también tienen una participación significativa durante la degradación de DEHF a MEHF. También se deduce que esta enzima es específica únicamente para DEHF y no para MEHF y que probablemente este hongo no cuenta con la enzima específica para la degradación de MEHF, o en su caso, carece de los genes que la codifican, como lo reportan Niazi, *et al.* (2001) y Whangsuk *et al.* (2015).

Para estas enzimas, la *P* presentó una relación directa con la mayor E_{max} alcanzada en el medio SAF, seguida de la obtenida en el medio con mayor concentración de DEHF, lo que fue diferente a los resultados obtenidos por Córdoba-Sosa *et al.* (2014) con esterasas de *P. ostreatus* ATC3526, quienes reportan los mayores valores de estos rendimientos en el medio con la mayor concentración de DEHF. Sin embargo estos valores fueron muy inferiores con respecto a los obtenidos en este trabajo, con más de 430 U/L obtenidas en los tres tratamientos. En el caso de los datos obtenidos para Y_{EX} y q_p , ambos siguieron un patrón como el obtenido con *P. ostreatus* ATCC32783, con los mayores valores obtenidos en el medio SAF, seguidos de los presentados en el medio con 1500 mg de DEHF/L

Nuestros resultados confirman que el DEHF es empleado parcialmente como fuente de carbono y energía por las tres cepas fúngicas, principalmente mediante el metabolismo de los alcoholes formados y que no hay represión catabólica de la glucosa ya que ésta es la principal fuente de carbono que utiliza para su crecimiento, lo que concuerda con lo reportado por Córdoba-Sosa *et al.* (2014) en *P. ostreatus* ATCC3526.

Las rutas de degradación en las tres cepas fúngicas se llevan a cabo por procesos de deestirificación e hidrólisis como lo habían reportado Niazi, *et al.* (2001), Lee *et al.* (2007), Xu *et al.* (2006) y Hwang *et al.* (2012).

8. CONCLUSIONES

- Las cepas de hongos comestibles *L. edodes*, *P. ostreatus* ATCC32783 y *P. pulmonarius* son capaces de degradar el DEHF a MEHF, utilizando parcialmente algunos productos de degradación como fuente de carbono y energía.
- Estos hongos degradan tanto 1500 como 2000 mg de DEHF/L a otros metabolitos durante su fase de adaptación y el inicio de su fase estacionaria de crecimiento. Dichos metabolitos no afectan negativamente el desarrollo de las cepas, ya que su crecimiento no se ve inhibido.
- Estas cepas únicamente utilizan El DEHF como fuente de carbono a través de los metabolitos formados de la transformación de DEHF a MEHF, sin llegar a usar metabólicamente el MEHF, ya que éste se sigue encontrando presente en el medio hasta el final de la fermentación.
- En *L. edodes* el DEHF se degrada hasta MEHF pasando en un primer paso por la formación de dodecil octil ftalato, en una segunda reacción se diheptil ftalato, ditridecil ftalato y MEHF. La última reacción que se presentó dio como resultado la formación de MBF, metabolito que se formó a partir del MEHF.
- En *P. ostreatus* ATCC32783 el DEHF se degrada hasta MEHF pasando por una primera reacción que cataliza la formación de ciclohexil 2-pentil ftalato y diisooctil ftalato. Durante una segunda reacción se estaría formando MEHF y al mismo tiempo a partir de otra reacción se conforma di(2metilbutil) ftalato.
- En *P. pulmonarius* el DEHF se degrada hasta MEHF con una primera que daría lugar a la formación de 2-etilhexil hexil ftalato. Proceso seguido de la formación de ciclohexil 2-pentil ftalato. Otro paso importante que se estaría llevando a cabo es la conformación de di(2metilbutil) ftalato. Para finalizar con la obtención de MEHF.
- Las tres cepas son capaces de hidrolizar selectivamente un enlace del DEHF para formar MEHF y también de convertir las largas cadenas de DEHF en cadenas más cortas o eliminar su ramificación quitando grupos etilo.

- Durante el proceso de degradación con *L. edodes* se forman ácidos orgánicos y alcoholes en mayor cantidad y abundancia durante la fase lag, exponencial e inicios de la estacionaria, lo que provoca que el pH se mantenga en niveles ácidos. Y durante los últimos días de la fermentación se forman compuestos aminados en mayor abundancia, resultando en niveles de pH más básicos.
- Durante el proceso de degradación con *P. ostreatus* ACTT32783 se forman ácidos orgánicos y alcoholes en mayor cantidad y abundancia durante la fase lag, exponencial y al inicio de la estacionaria, pero también se forman compuestos aminados en abundancias considerables, lo que probablemente lleva a un equilibrio iónico entre los numerosos compuestos ácidos y las mayores abundancias de compuestos básicos, lo que se refleja en un perfil de pH con niveles neutros.
- Durante el proceso de degradación con *P. pulmonarius* se forman ácidos orgánicos y alcoholes en cantidades y abundancias similares a las de los compuestos aminados formados durante la fase lag, exponencial e inicios de la estacionaria, lo que provoca que el pH se mantenga en niveles neutros entre 6.0 y 7.0.
- *L. edodes* se caracterizó por presentar los niveles de pH más ácidos en comparación con los de *P. ostreatus* ATCC32783 y *P. pulmonarius*, cepas que presentaron niveles más neutros respectivamente.
- El DEHF tiene un efecto directo sobre la producción de biomasa de *L. edodes*, *P. ostreatus* ATCC32783 y *P. pulmonarius*, teniendo que conforme se incrementa la concentración de este compuesto en el medio, la X_{max} alcanzada es mayor.
- El DEHF tiene un efecto directo sobre la μ de *P. ostreatus* ATCC32783 y *P. pulmonarius*, dicho efecto es significativamente diferente dependiendo de la concentración de DEHF en la que se desarrollen ambas cepas. A mayor concentración de DEHF la μ se va viendo disminuída.

- Al determinar estas variables los resultados nos indican que el DEHF presente en el medio sí afecta el crecimiento de las tres cepas fúngicas.
- El modelo de la ecuación logística se ajusta perfectamente al crecimiento de las tres cepas fúngicas en medio SAF. Sin embargo, en los tratamientos con DEHF el efecto de este compuesto sobre las variables de crecimiento en los hongos se ve reflejado en la separación de valores reales y los obtenidos con la ecuación logística durante el inicio de la fase estacionaria.
- Las tres cepas utiliza la glucosa como principal fuente de carbono y energía para su crecimiento y desarrollo metabólico incluso en los tratamientos con DEHF. Esto se ve reflejado en la producción de alcoholes y ácidos orgánicos (obtenidos por GC/MS) típicos del metabolismo de la glucosa al pasar por la ruta de la glucólisis y ciclo de Krebs.
- En las tres cepas utilizadas en este estudio, la glucosa consumida durante la fase lag de crecimiento la emplearon para la síntesis de las enzimas necesarias para la degradación de DEHF a MEHF.
- En las tres cepas en los tratamientos con DEHF, durante la fase de crecimiento estacionaria se mantienen vivas gracias las reservas formadas durante su crecimiento exponencial a partir de la glucosa y los alcoholes metabolizados.
- En las tres cepas empleadas, las esterasas extracelulares son probablemente las enzimas responsables de la degradación de DEHF a MEHF, siendo estas enzimas específicas para este compuesto. Sin embargo, no se descarta la participación de enzimas deshidrogenasas, ya que estas enzimas son características de la degradación de compuestos aromáticos en otros grupos fúngicos.
- Las esterasas presentes en los tres hongos comestibles estudiados en este estudio son tanto constitutivas como inducibles, pues se expresaron en el medio SAF y en los medio con DEHF, encontrándose en este medio con actividades superiores.

- *L. edodes* y *P. ostreatus* ATCC32783 son organismos potenciales para la producción de esterasas degradadoras de DEHF, pues en presencia de este compuesto se presentaron mayores niveles de actividad.
- Las lacasas presentes en los tres hongos comestibles estudiados en este estudio son tanto constitutivas como inducibles, pues se expresan en el medio SAF y en los medios con DEHF, encontrándose en ocasiones en este medio con actividades superiores.
- Las lacasas constitutivas en *P. ostreatus* ATCC32783 probablemente sean POXA1b y POXA1w, ya que estudios previos han indicado que presentan mayor estabilidad que otras isoenzimas.
- Las lacasas extracelulares de *L. edodes* presentan niveles de actividad muy bajos durante los tiempos en los que se llevó a cabo la degradación de DEHF a MEHF, por lo que probablemente su participación en este proceso sea mínima.
- Los resultados de esta investigación demuestran que microorganismos no patógenos como los comestibles *L. edodes*, *P. ostreatus* ATCC32783 y *P. pulmonarius* pueden degradar parcialmente compuestos aromáticos como el DEHF y utilizar metabolitos como los alcoholes y ácidos orgánicos como fuente de carbono y energía.
- *L. edodes* y *P. ostreatus* ATCC32783 tienen mayor E_{max} de lacasas al final de la fase estacionaria en el medio con 1500 mg de DEHF/L, concentración que tiene un efecto significativo en comparación con la de 2000 y 0 mg/L sobre éste y el resto de los rendimientos evaluados.
- En *L. edodes* la concentración de DEHF presente en el medio no tiene un efecto directo sobre la determinación de la E_{max} de esterasas, sin embargo, un tratamiento SAF sí afecta significativamente la actividad de estas enzimas. Este patrón se sigue en los tres rendimientos restantes.

- La actividad de esterasas en *L. edodes* presenta una relación proporcional con la concentración de DEHF empleada (considerando el medio SAF como una concentración de 0 mg/L).
- En *P. ostreatus* ATCC32783 y *P. pulmonarius* cada tratamiento tiene un efecto significativamente diferente sobre todos los rendimientos enzimáticos evaluados en esterasas.
- En *P. ostreatus* ATCC32783 y *P. pulmonarius* la mayor actividad de esterasas se obtiene en un medio SAF, la E_{max} que le sigue se obtiene en el medio con menor concentración de DEHF, seguida de la obtenida en el tratamiento con 2000 mg/L, siguiendo el mismo patrón en Y_{EX} y q_p . Esto nos indica que el DEHF es un represor de la producción enzimática de algunas esterasas.
- *P. pulmonarius* tiene mayor actividad de estas enzimas en los tratamientos con DEHF de acuerdo con la concentración empleada, es decir, a mayor concentración de DEHF, mayor E_{max} de esterasas. En este caso el DEHF funge como inductor de la actividad de estas enzimas.
- En *P. pulmonarius* el efecto de cada tratamiento es significativamente diferente y de acuerdo con el patrón obtenido con la mayor E_{max} en los tratamientos empleados, se presenta una relación directamente proporcional con los tres rendimientos cinéticos restantes (Y_{EX} y q_p).

9. RECOMENDACIONES

- Evaluar el consumo de N durante la fase lag de crecimiento y la cantidad de proteínas extracelulares sintetizadas a la par en las tres cepas fúngicas y con ello confirmar el uso de la glucosa en este mismo tiempo para la formación de enzimas responsables de la degradación de DEHF.
- Para la cepa *P. ostreatus* ATCC32783 en los tres tratamientos y *P. pulmonarius* en los tratamientos con DEHF se propone el uso del modelo de Gompertz o de Baranyi y Roberts para un ajuste más conveniente con el crecimiento de esta cepa, debido a su fase lag más corta.
- Evaluar el uso de un modelo cinético que se ajuste con la tasa de degradación de DEHF seguida por cada cepa fúngica.
- Determinar la concentración de MEHF presente en los tratamientos con concentraciones 1500 y 2000 mg de DEHF/L iniciales para *L. edodes*, *P. ostreatus* ATCC32783 y *P. pulmonarius*.
- Realizar análisis enzimáticos de esterasas y lacasas intracelulares para corroborar o descartar que enzimas intracelulares de estas familias podrían ser las responsables de la degradación de MEHF hasta AF o su posible mineralización.
- Determinar el tipo de enzima o isoenzima presente tanto de esterasas como de lacasas encargadas de la degradación de DEHF a MEHF por medio de análisis zimográficos.
- Determinar mediante análisis moleculares el nombre de los genes responsable de la síntesis de enzimas esterasas y lacasas implicados en la degradación inicial de DEHF a MEHF.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2002. Toxicological profile for di (2-ethyl hexyl) phthalate. Public Health Service. U.S. Department of Health and Human Services. Atlanta, GE, USA.
- Ahn, J. Y., Kim, Y. H., Min, J., Lee, J. 2006. Accelerated degradation of dipentyl phthalate by *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi cutinase and toxicity evaluation of its degradation products using bioluminescent bacteria. *Curr. Microbiol.* 52:340–344.
- Ahuactzin-Pérez, M. Torres, J. L. Rodríguez-Pastrana, B. R., Díaz-Godínez, R., Díaz, R., Tlecuitl-Beristain, S., *et al.* 2014. Fungal biodegradation of dibutyl phthalate and toxicity of its breakdown products on the basis of fungal and bacterial growth. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30(11):2811 – 2819.
- Akar, T. y Divriklioglu, M. 2010. Biosorption applications of modified fungal biomass for decolorization of Reactive Red 2 contaminated solutions: Batch and dynamic flow mode studies. *Bioresource Technol.* 101(19):7271–7277.
- Akingbemi, B. T., Hardy, M.P. 2001. Oestrogenic and antiandrogenic chemicals in the environment: effects on male reproductive health. *Ann. Med.* 33:391–403.
- Akita, K., Naitou, C., Maruyama, K. 2001. Purification and characterization of an esterase from *Micrococcus* sp. YGJ1 hydrolyzing phthalate esters. *Biosci Biotechnol Biochem.* 65:1680–1683.
- Albro, P. W., Thomas, R., Fishbein, L. 1973. Metabolism of diethylhexyl phthalate by rats. Isolation and characterization of the urinary metabolites. *J. Chromatogr.* 76 (2):321—330.
- Alexopoulos, C. J., Mims, C. W., Blackwell, M. 1996. Introductory Mycology, 4ta edición. New York: John Wiley.
- Alvarez, D. A. 2010. Guidelines for the use of the semipermeable membrane device (SPMD) and the polar organic chemical integrative sampler (POCIS) in environmental monitoring studies. U.S. Geological Survey, Techniques and Methods 1-D4, p. 28.
- Alvarez, D. A., Cranor, W. L., Perkins, S. D., Clark, R. C., Smith, S. B., 2008. Chemical and toxicologic assessment of organic contaminants in surface water using passive samplers. *J. Environ. Qual.* 37:1024–1033.
- Alvarez, D. A., Maruya, K. A., Dodder, N. G., Lao, W., Furlong, E. T., Smalling, K. L. 2014.

- Alzaga, R., Pena, A., Bayona, J. M. 2003. Determination of phthalic monoesters in aqueous and urine samples by solid-phase microextraction-diazomethane on-fibre derivatization–gas chromatography–mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* 26:87–96.
- Aminuddin, H., Mohd Khan, A. Abidin, H., Madzlan, K., Suri, R., Kamal, M. K. 2007. Optimization Of submerged culture for the production of *Lentinula edodes* mycelia biomass and amino acid composition by different temperatures. *J. Trop. Agric. and FD. Sc.* 35(1):131–138.
- Andrade, G. 2002. Determinación de la eficacia en laboratorio de una pintura en mezcla con preservante antimancha, para madera aserrada de *Pinus radiata*. Tesis de Licenciatura. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Forestales. Valdivia, Chile.
- Arora, D. S. y Sharma, R. K. 2010. Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160:1760–1788.
- Babich, M. A., Osterhout, C. 2010. Toxicity review of diisononyl phthalate (DINP). U.S. Consumer Product Safety Commission, Bethesda, MD 20814.
- Baldrian, P. 2004. Purification and characterization of laccase from the white rot fungus *Daedalea quercina* and decolorization of synthetic dyes by the enzyme. *Appl. Microbiol. Biot.* 63:560–563.
- Bannerman, E. N., Nicolet, J. 1976. Isolation and characterization of an enzyme with esterase activity from *Micropolyspora faeni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 32(1):138–144.
- Benjamin, S., Pradeep, S., Sarath, J. M. y Kumar, S. 2015. A monograph on the remediation of hazardous phthalates. *J. Hazard Mater.* 298:58–72.
- Bergé, A. 2012. Identification des sources d'alkylphénols et de phtalates en milieu urbain— Comparaison des rejets à dominante urbaine (domestique) par rapport à des rejets purement industriels. (Thèse).
- Bergh, C., Torgrip, R., Emenius, G., Ostman, C. 2011. Organophosphate and phthalate esters in air and settled dust—a multi location indoor study. *Indoor Air.* 21(1):67–76.
- Berset, J. D., Etter-Holzer, R. 2001. Determination of phthalates in crude extracts of sewage sludges by high-resolution capillary gas chromatography with mass spectrometric detection. *J. AOAC Int.* 84(2):383–391.
- Bhardwaj, H., Gupta, R., Tiwari, A. 2012 Microbial population associated with plastic degradation. *Scientific reports.* 1(5).

- Blair, J. D., Ikonomidou, M. G., Kelly, B. C., SurrIDGE, B., Gobas, F. A. P. C. 2009. Ultra trace determination of phthalate ester metabolites in seawater, sediments, and biota from an urbanized marine inlet by LC/ESI-MS/MS. *Environ. Sci. Technol.* 43(16):6262–6268.
- Blanchette, R. A., Abad, A. R., Farrell, R. L. y Leathers, T. D. 1989. Detection of lignin peroxidase and xylanase by immunocytochemical labeling in wood decayed by basidiomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(6):1457–1465.
- Block, S. S., Tsao, G. and Han, L. 1959. Experiments in the cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Mushroom Science.* 9: 309-325.
- Bohn, J. A, Be Miller, J. N. 1995. 1,3-beta-D-glucans as biological response modifiers: a review of structure – functional activity relationships. *Carbohydr Polyme.* 28:3–14.
- Boisnard, S., Ruprich-Robert, G., Picard, M. Berteaux-Lecellier, V. 2004. Peroxisomes. En: Bramble, R., Marzluf, G. A. (eds) *The Mycota. Vol. III, eda edición. Biochemistry and Molecular Biology*, pp. 61–80. Berlin: Springer.
- Bold, H. C., Alexopoulos, C. J. y Delevoryas, T. 1987. *Morphology of Plants and Fungi.* 5ta Edition. Harper Collins Publishers, Inc. New York.
- Bornscheuer, U. T. 2002. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 26:73–81.
- Bornscheuer, U. T., Kazlauskas, R. J. 1999. Hydrolases in organic synthesis—regio and stereoselective biotransformations. Wiley-VCH, Weinheim. pp. 336.
- Bourbonnais, R. y Paice, M. G. 1990. Oxidation of non-phenolic substrates: An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett.* 267(1):99–102.
- Bourne, Y., Hasper, A. A., Chahinian, H., Juin, M. De Graaff, L. H. y Marchot Pascale. 2004. *Aspergillus niger* protein EstA defines a new class of fungal esterases within the α/β hydrolase fold superfamily of proteins. *Structure* 12(4): 677–687.
- Brenner, S. 1988. The molecular evolution of genes and proteins: a tale of two serines. *Nature* 334:528–530.
- Brossa, L., Marcé, R. M., Borrull, F., Pocurull, E. 2003. Determination of endocrine disrupting.
- Cai, Q.-Y., Mo, C. H., Wu, Q. T., Zeng, Q. Y., Katsoyiannis, A. 2007. Occurrence of organic contaminants in sewage sludges from eleven wastewater treatment plants, China. *Chemosphere.* 68:1751–1762.
- Carbone, S., Samaniego, Y. A., Cutrera, R., Reynoso, R., Cardoso, N., Scacchi, P., *et al.* 2012. Different effects by sex on hypothalamic-pituitary axis of prepubertal offspring rats produced

- by in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). *Neurotoxicology*. 33:78–84.
- Carbone, S., Szwarcfarb, B., Ponzo, O., Reynoso, R., Cardoso, N., Dieguiz, L. 2010. Impact of gestational and lactational phthalate exposure on hypothalamic content of amino acid neurotransmitters and FSH secretion in peripubertal male rats. *Neurotoxicology*. 31:747–751.
- Caroli, S., Cescon, P., Valton Walton, D. W. H. 2001. Environmental contamination in Antarctica: a challenge to analytical chemistry. Kindle. 420p.
- Castillo, M., Barcelo, D. 2001. Characterization of organic pollutants in textile wastewaters and landfill leachate by using toxicity-based fractionation methods followed by liquid and gas chromatography coupled to mass spectrometric detection. *Anal. Chim. Acta*. 426:253–264.
- Chahinian, H., Nini, L., Boitard, E., Dubès, J.-P., Cormeau, L.-C., Sarda, L. 2002. Distinction between esterases and lipases: A Kinetic study with vinyl esters and TAG. *Lipids*. 37(7):653–662.
- Chai, W., Suzuki, M., Handa, Y., Murakami, M., Utsukihara, T., Honma, Y., Nakajima, K., Saito, M. y Akira, A. H. 2008. Biodegradation of Di-(2-ethylhexyl) phthalate by fungi. *Rep Nat'l Food Res Inst* 72:83–87.
- Chang, H.-K., Zylstra, G. J. 1998. Novel organization of the genes for phthalate degradation from *Burkholderia cepacia* DBO1. *J. Bacteriol.* 180:6529–6537.
- Chang, M. S., Shen, J. Y., Yang, S.-H., Wu, G. J. 2011. Subcritical water extraction for the remediation of phthalate ester contaminated soil. *J. Hazard. Mater.* 192:1203–1209.
- Chemical Sources International (2010). Chem SourcesOnline, Clemson, SC. Available at: <http://www.chemsources.com/index.html>
- Chen, J.-A., Li, X., Li, J., Cao, J., Qiu, Z., Zhao, Q., *et al.* 2007. Degradation of environmental endocrine disruptor di-2-ethylhexyl phthalate by a newly discovered bacterium, *Microbacterium* sp. strain CQ0110Y. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74:676–682.
- Choi, K. Y., Kim, D., Sul, W. J., Chae, J. C., Zylstra, G. J., Kim, Y. M., Kim, E. 2005. Molecular and biochemical analysis of phthalate and terephthalate degradation by *Rhodococcus* sp. strain DK17. *FEMS Microbiol. Lett.* 252:207–213.
- Cincinelli, A., Stortini, A. M., Perugini, M., Checchini, L., Lepri, L. 2001. Organic pollutants in sea-surface microlayer and aerosol in the coastal environment of Leghorn (Tyrrhenian Sea). *Mar. Chem.* 76:77–98.
- Cisterna, C. 2003. Cultivo del champiñón ostra en Chile. 1ª Edición. Editorial Mycotec, LTDA. Chile. 118p.

- Cohen, R., Persky, L. y Hadar, Y. 2002. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Appl. Microbiol. Biot.* 58:582–594.
- Córdoba-Sosa, G., Torres, J. L., Ahuactzin-Pérez, M., Díaz-Godínez, G., Díaz, R., Sánchez, C. 2014. Growth of *Pleurotus ostreatus* ATCC 3526 in different concentrations of di (2-ethylhexyl) phthalate in submerged fermentation. *JCBPS.* 30(4):96–103.
- Crueger, W. y Crueger, A. 1993. *Biotecnología. Manual de Microbiología Industrial.*, Ed. Acribia.
- Cudris, G. N. M. 2011. Caracterización de la microbiota contaminante del cultivo de *Lentinula edodes* (Shiitake) en diferentes residuos agroforestales. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Postgrado de Microbiología. Bogotá, Colombia.
- Cygler, M., Schrag, J. D., Sussman, J. L., Harel, M., Silman, I., Gentry, M. K., y Doctor, B. P. 1993. Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases and related proteins. *Prot. Sci.* 2(3):366–382.
- Cygler, M. y Schrag, J. D. 1997. Structure as a basis for understanding the interfacial properties of lipases. *Methods Enzymol.* 284:3–27.
- Dalsenter, P. R., Santana, G. M., Grande, S. W., Andrade, A. J., Araújo, S. L. 2006. Phthalate affect the reproductive function and sexual behavior of male Wistar rats. *Hum. Exp. Toxicol.* 25:297–303.
- Davies, K., Lorono, I., Foster, S., Li, D., Johnstone, K. y Ashby, A. 2000. Evidence for a role of cutinase in pathogenicity of *Pyrenopeziza brassicae* on brassicas. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 57:63–75.
- De Souza, C. G. M. y Peralta, R. M. 2003. Purification and characterization of the main laccase produced by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium. *J. Basic Microb.* 43:278–286.
- Deacon, J. W. 2006. *Fungal biology*, 4ta ed. Blackwell Publishing, Malden, E.U.A.
- Degrassi, G., Okeke, B. C., Bruschi, C. V., Venturi, V. 1998. Purification and characterization of an acetyl xylan esterase from *Bacillus pumilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(2):789-792.
- Domínguez de María, P., Sánchez-Montero, J. M., Sinisterra, J. y Alcántara, A. R. 2006. Understanding *Candida rugosa* lipases: an overview. *Biotechnol. Adv.* 24(2):180–196.
- Dutton, J. R., Venables, W., Saint, C. P. 1995. *Comamonas acidovorans* UCC61 catabolizes *o*-phthalate via a 4, 5-oxygenation pathway that is encoded on a 70 kbp section of plasmid pOPH1 bounded by directly repeated sequences. *Microbiology.* 141:1673–1682.
- Environmental Protection Agency (EPA). 1998. Technical Factsheet on: Di(2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP), Washington DC, Office of Ground Water and Drinking Water.

- Ertugay, N. y Bayhan, Y. K. 2010. The removal of copper (II) ion by using mushroom biomass (*Agaricus bisporus*) and kinetic modeling. *Desalination* 255(1–3):137–142.
- Faiz, Ö., Colak, A., Saglam, N., Çanakçı, S., Beldüz, A. O. 2007. Determination and characterization of thermostable esterolytic activity from a novel thermophilic bacterium *Anoxybacillus gonensis* A4. *J. Biochem. Mol. Biol.* 40(4):588-594.
- Farkaš, V. 1990. Fungal cell walls: their structure, biosynthesis and biotechnological aspects. *Acta Biotechnol.* 10(3):225–238.
- Fazenda, M. L. y Seviour, R. 2008. Submerged Culture Fermentation of "Higher Fungi": The Macrofungi. *Adv. Appl. Microbiol.* 63:33–103.
- Feige, J. N., Gelman, L., Rossi, D., Zoete, V., Metivier, R., Tudor, C., *et al.* 2007. The endocrine disruptor monoethyl-hexyl-phthalate is a selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulator that promotes adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 282 (26):19152–19166.
- Fermor, T. R. y Wood, D. A. 1981. Degradation of bacteria by *Agaricus bisporus* and other fungi. *J. Gen. Microbiol.* 126:377–387.
- Fernández, J., Henao, L. 2007. Evaluación de tres hongos basidiomicetos inmovilizados en *Luffa cylindrica* y fotocatalisis con TiO₂ para la remoción de Negro reactivo 5. Microbiólogo industrial. Pontifica Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Depto. Microbiología. Bogotá. 154p.
- Flegler, S. 2011. Basidiomycete fungus clamp connection. Visual Unlimited, Inc. Recuperado de <http://visualsunlimited.photoshelter.com/image/I0000UMb136lpdOg>
- Fojan, P., Jonson, P. H., Petersen, M. T. N., Petersen, S. B. 2000. What distinguishes an esterase from a lipase: a novel structural approach. *Biochimie.* 82:1033–1041.
- Foster, P. M., Thomas, L. V., Cook, M. W., Gangolli, S. D., 1980. Study of the testicular effects and changes in zinc excretion produced by some *n*-alkyl phthalates in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 54:392–398.
- Ganji, S. H., Karigar, C. S., Pujar, B. G. 1995. Metabolism of dimethyl terephthalate by *Aspergillus niger*. *Biodegradation.* 6:61–66.
- Gao, X., Shim, W.-B., Göbel, C., Kunze, S., Feussner, I., Meeley, R. *et al.* 2007. Disruption of a maize 9-lipoxygenase results in increased resistance to fungal pathogens and reduced levels of contamination with *Mycotoxin fumonisin*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20(8):922–933.
- Gianfreda, L., Xu, F. y Bollag, J. M. 1999. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediat. J.* 3 (1):1–26.

- Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C. Piscitelli, A., Vamhulle, S., Sannia, G. 2010. Laccases: a never-ending story. *Cell Mol. Life Sci.* 67(3):369–385.
- Giardina, P., Palmieri, G., Scaloni, A., Fontanella, B., Faraco, V., Cennamo, S., Sannia, G. 1999. Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochem J.* 341:655–663.
- Godinho, L. F., Reis, C. R., Tepper, P. G., Poelarends, G. J., Quax, W. J. 2011, Discovery of an *Escherichia coli* esterase with high activity and enantioselectivity toward 1,2-O-isopropylidenglycerol esters, *Appl Environ Microbiol.* 77(17):6094-6099.
- Goyal, M., Soni, G. 2011. Production and characterization of cellulolytic enzymes by *Pleurotus florida*. *Afr. J. Microbiol. Res.* 5:1131–1136.
- Grande, S. W., Andrade, J. M., Talsness, C. E., Grote, K., Golombiewski, A., Sterner-Kock, A. 2007. A dose–response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): reproductive effects on adult female offspring rats. *Toxicology.* 229:114–122.
- Grimm, L., Kelly, S., Krull, R. y Hempel, D. 2005. Morphology and productivity of filamentous fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69:375–384.
- Gu, J.-G., Han, B., Duan, S., Zhao, Z., Wang, Y. 2009. Degradation of the endocrine-disrupting dimethyl phthalate carboxylic ester by *Sphingomonas yanoikuyae* DOS01 isolated from the South China Sea and the biochemical pathway. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 63:450–455.
- Gutiérrez, M. C., Droguet, M. 2002. Identificación de compuestos volátiles por GC/MS. *Boletín intexter (U.P.C.)*. 122: 35–41.
- Guzmán, G., Mata, G., Salmones, D., Soto-Velazco, C. y Guzmán-Dávalos, L., 1993. El Cultivo de los Hongos Comestibles. Con especial atención a especies tropicales y subtropicales en esquilmos agrícolas y residuos agroindustriales. Instituto Politécnico Nacional, México, D. F. ISBN 968-29-4492-9.
- Hadar, Y., Cohen-Arazi, E. 1986. Chemical composition of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* produced by fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 51(6):1352–1354.
- Halit, U. M. 2000. Speaking of fixation. Recuperado de <http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/indexmag.html?http://www.microscopy-k.org.uk/mag/artdec00/fixation2.html>
- Harel, M., Schalk, I., Ehret-Sabatier, L., Bouet, F., Goeldner, M., Hirth, C., *et al.* 1993. Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 90(19):9031–9035.

- Hasegawa, R. H., Megumi, K. M. C., Dantas, V. M. C. 2005. Growth and antibacterial activity of *Lentinula edodes* in liquid media supplemented with agricultura wastes. *Electron. J. Biotechn.* 8(2):212–217.
- Hauser, R., Calafat, A. 2005. Phthalates and human health, *Occup. Environ. Med.* 62:806–818.
- Heikinheimo, P., Goldman, A., Jeffries, C. y Ollis, D. L. 1999. Of barn owls and bankers: a lush variety of α/β hydrolases. *Structure.* 7:141–146.
- Heindel, J. J., Gulati, D. K., Mounce, R. C., Russell, S. R., Lamb 4to., J. C., 1989. Reproductive toxicity of three phthalic acid esters in a continuous breeding protocol. *Fundam. Appl. Toxicol.* 12:508–518.
- Herbert, D., Elsworth, R. y Telling, R. C. 1956. The continuous culture of bacteria: a theoretical and experimental study. *J. Gen. Microbiol.* 14:601–622.
- Hermann, K. L., Costa, A., Helm, C. V. De Lima, E.Tavares, L. B. B. 2013. Expression of manganese peroxidase by *Lentinula edodes* and *Lentinula boryana* in solid state and submerged system fermentation. *Annals of the Brazilian Academy of Science.* 85(3): 965–973.
- Heudorf, U., Mersch-Sundermann, V., Angerer, J. 2007. Phthalates: toxicology and exposure. *Int. Hyg. Environ. Health.* 210:623–634.
- Higuchi, T. 1990. Lignin biochemistry: Biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci. Technol.* 24:23–63.
- Hilber, O. 1997. The genus *Pleurotus* (Fr) Kummer (2):1 -64.
- Hol, W. G. J., Van Duijnen, P. T. y Berendsen, H. J. C. 1978. Dipoles of the alpha-helix and beta-sheet: their role in protein folding. *Nature.* 273:443–446.
- Holmquist, M. 2000. Alpha/Beta-hidrolases fold enzymes: structures, functions and mechanisms. *Curr. Prot. Pep. Sci.* 1(2):209–235.
- Hubert, A., Wenzel, K. D., Engewald, W., Schüürmann, G. 2001. Accelerated solvent extraction more efficient extraction of POPs and PAHs from real contaminated plant and soil samples. *Rev. Anal. Chem.* 20(2):101–144.
- Hublik, G., Schinner, F. 2000. Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. *Enzyme Microb. Technol.* 27:330–336.
- Hwang, S. S., Choi, H. T. y Song, H. G. 2008. Biodegradation of endocrine-disrupting phthalates. by *Pleurotus ostreatus*. *J. Microbiol. Biotechn.* 18(4):767–772.

- Hwang, S. S., Kim, H. Y., Ja, K. O. y Song, H. G. 2012. Changes in the activities of enzymes involved in the degradation of butylbenzyl phthalate by *Pleurotus ostreatus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 22(2):239–243.
- Institute of Health and Consumer Protection (IHCP). 2008. Bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP). European Union Risk Assessment Report (CAS No: 117-81-7). Luxembourg. European Chemicals Bureau.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). 2000. Di (2-ethylhexyl) phthalate. *International Agency for Research on Cancer*, 77, 41– 148.
- Ito, Y., Yamanoshita, O., Asaeda, N., Tagawa, Y., Lee, C. H., Aoyama, T., *et al.* 2007. Di(2-ethylhexyl)phthalate induces hepatic tumorigenesis through a peroxisome proliferator-activated receptor alpha-independent pathway. *J. Occup. Health.* 49:172–182.
- Jaeger, K. E. y Reetz, M. T. 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 16: 396–403.
- Jaeger, K. E., Dijkstra, B. W. y Reetz, M. T. 1999. Bacterial Biocatalysts: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* 53:315–351.
- Kalač, P., Svoboda, L. 2000. A review of trace element concentrations in edible mushrooms. *Food Chem.* 69:273–281.
- Karpagam, S., Lalithakumari, D. 1999. Plasmid-mediated degradation of *o*- and *p*-phthalate by *Pseudomonas fluorescens*. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 15:565–569.
- Kashangura, C., Hallsworth, J.E., Mswaka A.Y. 2006. Phenotic diversity amongst strains of *Pleurotus sajor-caju*: Implications for cultivation in arid environments. *Mycological Research.* 110:312–317.
- Kersten, P. J., Kalyanaraman, B., Hammel, K. E., Reinhammer, B. y Kirk, T. K. 1990. Comparison of lignin peroxidase, horseradish peroxidase and laccase in the oxidation of methoxybenzene. *Biochem. J.* 268:475–480.
- Kim, Y. H. y Lee, J., 2005. Enzymatic degradation of dibutyl phthalate and toxicity of its degradation products. *Biotechnol. Lett.* 27:635–639.
- Kim, Y. H., Lee, J. y Moon, S. H. 2003. Degradation of an endocrine disrupting chemical, DEHP [di-(2-ethylhexyl)-phthalate], by *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* cutinase. *Appl. Microbiol. Biot.* 63(1):75–80.

- Kim, Y. H., Lee, J., Ahn, J. Y., Gu, M. B., Moon, S.-H. 2002. Enhanced degradation of an endocrine-disrupting chemical butyl benzyl phthalate, by *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi cutinase. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4684–4688.
- Kim, Y. H., Lee, J., Moon, S. H. 2003. Degradation of an endocrine disrupting chemical DEHP [di-(2-ethylhexyl)-phthalate], by *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi cutinase, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63:75–80.
- Kim, Y. H., Min, J., Bae, K. D., Gu, M. B., Lee, J. 2005. Biodegradation of dipropyl phthalate and toxicity of its degradation products: a comparison of *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi cutinase and *Candida cylindracea* esterase. *Arch. Microbiol.* 184:25–31.
- Kim, Y-M. y Song, H-G. 2009. Effect of fungal pellet morphology on enzyme activities involved in phthalate degradation. *J. Microbiol.* 47(4):420–424.
- Kimber, I. y Dearman, R. J., 2010. An assessment of the ability of phthalates to influence immune and allergic responses. *Toxicology.* 271:73–82.
- Kirk, P. M., Cannon, F., Minter, D. W. y Stalpers, J. A. 2008. Dictionary of the Fungi. Décima edición. CABI. Europa, UK. ISBN 978-0-85199-826-8.
- Kirk, T. K., Schultz, E., Connors, W. J., Lorenz, L. F. y Zeikus, J. G. 1978. Influence of culture parameters on lignin metabolism on *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* 117:277–285.
- Kofujita, H., Asada, Y., Kuwahara, M. 1991. Alkyl–aryl cleavage of phenolic beta-O-4 lignin substructure model-compound by Mn-peroxidase isolated from *Pleurotus ostreatus*. *Mokuzai Gakkaishi* 37:555–561.
- Kraut, J. 1977. Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. *Annu. Rev. Biochem.* 46:331–358.
- Kulkarni, S., Sadicha, P., Surekha, S. 2013. Microbial esterases: An overview. *Int. Curr. Microbiol. App. Sci.* 2(7):135–146.
- Kuo, M. 2009. *Pleurotus pulmonarius*: The Summer Oyster. Recuperado de http://www.mushroomexpert.com/pleurotus_pulmonarius.html
- Kurane, R. 1997. Microbial degradation and treatment of polycyclic aromatic hydrocarbons and plasticizers. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 829:118–134.
- Lee, S. M., Jae-Won, L., Bon-Wook, K., Myung-Kil, K., Don-Ha, C. y In-Gyu, C. 2007. Dibutyl phthalate biodegradation by the white rot fungus, *Polyporus brumalis*. *Biotechnol. Bioeng.* 97(6):1516–1522.

- Lee, S. M., Koo, B. W., Lee, S. S., Kim, M. K., Choi, D. H., Hong, E. J., *et al.* 2004. Biodegradation of dibutyl phthalate by white rot fungi and evaluation on its estrogenic activity. *Enzyme Microb. Technol.* 35:417–423.
- Li, M., Qiu, L., Zhang, Y., Hua, Y., Tu, S., He, Y., *et al.* 2013. Dose-related effect by maternal exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate plasticizer on inducing hypospadiac male rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 35: 55–60.
- Liang, D.W., Zhang, T., Fang, H.H.P., He, J. 2008. Phthalates biodegradation in the environment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80:183–198.
- López-Carrillo, L., Hernández-Ramírez, R. U., Calafat, A. M., Torres-Sánchez, L., Galván-Portillo, M., Needham, L., *et al.* 2010. Exposure to phthalates and breast cancer risk in northern Mexico. *Environ. Health Perspect.* 118(4) 539–544.
- Lorz, P. M., Towae, F.K., Enke, W., Jäckh, R. y Bhargava, N. 2002. Phthalic acid and derivatives. In: *Ulmans Encyclopedia of Industrial Chemistry* (release 2003). Séptima edición Online (Wiley-VCH, ed). Weinheim, Germany.
- Lovekamp, T. N. y Davis, B. J. 2001. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses aromatase transcript levels and estradiol production in cultured rat granulosa cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 172:217–224.
- Lovekamp-Swan, T., Davis, B. J. 2003. Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system. *Environ. Health Perspect.* 111:139–145.
- Luo, Z. H., Pang, K. L., Gu, J. D., Chow, R., Vrijmoed, L. 2009. Degradability of the three dimethyl phthalate isomer esters (DMPEs) by a *Fusarium* species isolated from mangrove sediment, *Mar. Pollut. Bull.* 58:765–768.
- Luo, Z.-H., Wu, Y.-R., Chow, R. Luo, J.-J., Gu, J.-D., Vrijmoed, L. 2012. Purification and characterization of an intracellular esterase from a *Fusarium* species capable of degrading dimethyl terephthalate, *Process Biochem.* 47:687–693.
- Madhosingh, C. y Orr, W. 1981. Sterol ester hydrolase in *Fusarium oxysporum*. *Lipids.* 16(2):125–132.
- Mansur, M., Suárez, T., Fernández-Larrea, J. B., Brizuela, M. A., González, A. E. 1997. Identification of a laccase gene family in the new lignin-degrading basidiomycete CECT 20197. *Appl Environ. Microbiol.* 63:2637–2646.
- Maruyama, K., Akita, K., Naitou, C., Yoshida, M., Kitamura, T. 2005. Purification and characterization of an esterase hydrolyzing monoalkyl phthalates from *Micrococcus* sp. YGJ1. *J. Biochem.* 137:27–32.

- Matthews, B. W. 1972. The γ turn. Evidence for a new folded conformation in proteins. *Macromolecules*. 5:818–819.
- McCullough, W., Roberts, C. F., Osmani, S. A., Scrutton, M C. 1986. Regulacion of carbone metabolism in filamentous fungi. En M. J. Morgan (Ed.), *Carbohydrate metabolism in cultured cells* (pp. 287–355). Nueva York. Plenum Press.
- McKellar, R., Lu, X. (Eds.). 2004. Modeling microbial responses in foods. Boca Ratón, FL: CRC Press.
- Menéndez, V. J. y Oliveros, P. 2004. Hongos Basidiomycetes. Características generales. Recuperado de <http://www.asturnatura.com/articulos/hongos/basidiomycetes.php>
- Midori, S. 2005. Shiitake mushroom on Konara (*Quercus serrata*). Recuperado de https://upload.commons/c/ce/Lentinula_edodes_shiitake.JPG
- Milla, A. 2007. Introducción al cultivo del hongo *Pleurotus ostreatus*. Publicaciones INEVA. Valladolid. España. 120p.
- Milstein, O., Huttermann, A., Frund, R. y Lüdemann, H. D. 1994. Enzymatic copolymerization of lignin with low-molecular mass compounds. *Appl. Microbiol. Biot.* 40:760–767.
- Mohorčič, M., Friedrich, J., Pavko, A. 2004. Decolourization of the diazo dye reactive black 5 by immobilised *Bjerkundera adusta* in a stirred tank bioreactor. *Acta Chimica Slovenica*. 51(4): 619–628.
- Moreno, S. N. y Ospina, V. X. A. 2008. Evaluación de inductores metálicos y co-sustratos para la remoción de leandro *Pleurotus ostreatus*. Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana. Carrera de Microbiología Industrial. Bogotá, DC.
- Morozova, O. V., Shumakovich, G. P., Gorbacheva, M. A., Shleev, S. V. y Yaropolov, A. I. 2007. Blue. Laccases. *Biochemistry (Moscow)* 72:1136–1150.
- Murugesan, K., Arulmani, M., Nam, I-H., Kim, Y-M., Chang, Y-S. y Kalaichelvan, P. T. 2006. Purification and characterization of laccase produced by a white rot fungus *Pleurotus sajorcaju* under submerged culture condition and its potential in decolorization of azo dyes. *Appl. Microbiol. Biot.* 72:939–946.
- Nagai, M., Kawata, M., Watanabe, H., Ogawa, M., Saito, K., Takesawa, T., *et al.* 2003. Important role of fungal intracellular laccase for melanin synthesis: Purification and characterization of an intracellular laccase from *Lentinula edodes* fruit bodies. *Microbiology* 149:2455–2462.
- Nalli, S., Cooper, D. G., Nicell. J. A. 2002. Biodegradation of plasticizers by *Rhodococcus rhodochrous*. *Biodegradation*. 13:343–352.

- Nardini, M. y Dijkstra, B. W. 1999. α/β hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9:723–737.
- National Toxicology Program. 2006. *NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and developmental effects of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)*. NTP-CERHR-DEHP-06-4476.
- Net, S., Dumoulin, D., El-Osmani, R., Rabodonirina, S., Ouddane, B. 2014. Case study of PAHs, Me-PAHs, PCBs, phthalates and pesticides contamination in the Somme River water, France. *Int. J. Environ. Res.* 8(4):1159–1170.
- Niazi, J. H., Prasad, D. T., Karegoudar, T. B. 2001. Initial degradation of dimethyl phthalate by esterases from *Bacillus* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 196:201–205.
- Nishioka, T., Iwata, M., Imaoka, T., Mutoh, M., Egashira, Y., Nishiyama, T., *et al.* 2006. A mono-2-ethylhexyl phthalate hydrolase from a *Gordonia* sp. that is able to dissimilate di-2-ethylhexyl phthalate. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:2394–2399.
- Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) In consultation with the IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). 1992. Enzyme Nomenclature. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they Catalyze. Recuperado de <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>
- Nomura, Y., Harashima, S., Oshima, Y. 1990. PHT, a transmissible plasmid responsible for phthalate utilization in *Pseudomonas putida*. *J. Ferment. Bioeng.* 70:295–300.
- Nomura, Y., Nakagawa, M., Ogawa, N., Harashima, S., Oshima, Y. 1992. Genes in PHT plasmid encoding the initial degradation pathway of phthalate in *Pseudomonas putida*. *J. Ferment. Bioeng.* 74:333–344.
- Nora, H. 2001. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. *Int. J. Antimicrob. Ag.* 17(1):71–74.
- Occurrence of contaminants of emerging concern along the California coast (2009–10) using passive sampling devices. *Mar. Pollut. Bull.* 81(2):347–354.
- Oie, L., Hersoug, L. G. y Madsen, J. O. 1997. Residential exposure to plasticizer and its possible role in the pathogenesis of asthma. *Environ. Health Perspect.* 105:972–978.
- Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., *et al.* 1992. The α/β hydrolase fold. *Protein Eng.* 5(3):197–211.

- Palmieri, G., Cennamo, G., Faraco, V., Amoresano, A., Sannia, G., Giardina, P. 2003. Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enzyme Microb. Tech.* 33: 220–230.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B., Sannia, G. 2000 Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol.* 66:920–924.
- Palmieri, G., Giardina, P., Blanco, C., Scaloni, A., Capasso, A. y Sannia, G. 1997. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *J. Biol. Chem.* 272:31301–31307.
- Palmieri, G., Giardina, P., Marzullo, L., Desiderio, B., Nitti, G., Cannio, R., Sannia, G. 1993. Stability and activity of phenol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39:632–636.
- Pandey, A., Benjamen, S., Soccol, C. R., Nigam, P., Krieger, N. y Soccol, V. T. 1999. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 29:119–131.
- Paszczynski, A., Huynh, V.-B., Crawford, R. L. 1985. Enzymatic activities of an extracellular manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 29:37–41.
- Patel, R. N. 2000. Stereoselective Biocatalysis. Marcel Dekker, New York.
- Patil, N. K., Kundapur, R., Shouche, Y. S., Karegoudar, T. B. 2006. Degradation of plasticizer di-n-butylphthalate by *Delftia* sp. TBKNP-05. *Curr. Microbiol.* 52:369–374.
- Pegler, M. 1976. En Kavaka 3:20.
- Peleg, M. 2006. Advanced quantitative microbiology for food and biosystems: Models for predicting growth and inactivation. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Peleg, M., Corradini, M. G., Normand, M. D. 2004. Kinetic models of complex biochemical reactions and biological processes. *Chem. Ing. Tech.* 76:413–423.
- Pernas, M. A., López, C., Rua, M. L. y Hermoso, J. A. 2001. Influence of the conformational flexibility on the kinetics and dimerisation process of two *Candida rugosa* lipase isoenzymes. *FEBS Lett.* 501:87–91.
- Pio, T. F. y Macedo, G. A. 2009. Cutinases: properties and industrial applications. *Adv. Appl. Microbiol.* 66:77–95.
- Piontek, K., Antorini, M. y Choinowski, T. 2002. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *J. Biol. Chem.* 277(40):37663–37669.

- Pleiss, J., Fischer, M., Peiker, M., Thiele, C. y Schmid, R. D. 2000. Lipase engineering database: understanding and exploiting sequence-structure-function relationship. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 10:491–508.
- Pointing, S. B. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl Microbiol Biotechnol.* 57: 20–33
- Pradeep, S. y Benjamin, S. 2012. Mycelial fungi completely remediate di(2-ethylhexyl) phthalate, the hazardous plasticizer in PVC blood storage bag. *J. Hazard. Mater.* 235–236:69–77.
- Pradeepkumar, S. y Karegoudar, T. 2000. Metabolism of dimethyl phthalate by *Aspergillus niger*, *J. Microbiol. Biotechnol.* 10:518–521.
- Pukahuta C., Limtong S., Suwanarit P. y Nutalaya S. 2000. Species diversity of *Trichoderma* contaminating Shiitake production. houses in Thailand. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 34(4):478–485.
- Rani, M., Prakash, D., Sobti, R. C., Jain, R. K. 1996. Plasmid-mediated degradation of *o*-phthalate and salicylate by a *Moraxella* sp. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220:377–381.
- Riva, S. 2006. Laccases: Blue enzymes for green chemistry. *Trends Biotechnol.* 5:219–225.
- Sampson, J., de Korte, D. 2011. DEHP-plasticised PVC: relevance to blood services. *Transfus. Med.* 21:73–83
- Sánchez, C. 1998. Ultrastructural physiological and histological study of *Pleurotus ostreatus* species. Ph. D. Dissertation. Manchester U. K.; University of Manchester.
- Sánchez, C. 2009. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol Adv.* 27:185–194.
- Sánchez, C. 2010. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. *Appl. Microbiol. Biot.* 85:1321–1337.
- Saparrat, M. C. N., Guillen, F., Arambarri, A. M., Martínez, A. T. y Martínez, M. J. 2002. Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white-rot basidiomycete *Coriolopsis rigida*. *Appl. Environ. Microb.* 68:1534–1540.
- Sarath-Josh, M. K., Pradeep, S., Balachandran, S., Sudha Devi, R., Vijayalakshmi-Amma, K. S., Benjamin, S. 2012. Temperature-and solvent-dependent migrations of di(2-ethylhexyl) phthalate, the hazardous, plasticizer from commercial PVC blood storage bag. *J. Polym. Res.* 19. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1007/s10965-012-9915-4>
- Schrag, J. D. y Cygler, M. 1997. Lipases and alpha/beta hydrolase fold. *Methods. Enzymol.* 284: 85–107.

- Schrag, J. D., Li, Y. G., Wu, S. y Cygler, M. 1991. Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. *Nature*.27; 351(6329):761–764.
- Schüren, F. H. J. 2002 Heterologous protein production in mycelial fungi. En: Osiewacz H. D. (ed.). *The Mycota Vol. X. Industrial Applications*, pp.389–403. Berlin: Springer.
- Selenskas, S., Teta, M. J., Vitale, J. N. 1995. Pancreatic cancer among workers processing synthetic resins. *Am. J. Ind. Med.* 28:385–398.
- Shleev, S. V., Khan-Ir, G., Morozova, O. V., Mazhugo, Y. M., Khalunina, A. S. y Yaropolov, A. I. 2004. Phenylpyrazolones, novel oxidoreductase redox mediators for degradation of xenobiotics. *Appl. Biochem. Microbiol.* 40:140–145.
- Sirim, D., Wagner, F., Wang, L., Schmid, R. D. y Pleiss, J. 2011. The laccase engineering database: a classification and analysis system for laccases and related multicopper oxidases. *Database*, ID bar006, doi:10.1093/database/bar006.
- Sivamurthy, K., Swamy, B. M., Pujar, B. G. 1991. Transformation of dimethyl terephthalate by the fungus *Sclerotium rolfsii*, *FEMS Microbiol. Lett.*79:37–40.
- Solomon, W. 2005. “Shiitake (*Lentinus edodes*). Encyclopedia of Dietary Supplements”. Israel and National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine.
- Sopheak, N., Delmont, A., Richard, S., Paluselli, A.; Ouddane, B. 2015. Reliable quantification of phthalates in environmental matrices (air, water, sludge, sediment and soil): A review. *Sci. Total Environ.* 515-516:162–180.
- Stales, C. A., Peterson, D. R., Parkerton, T. F., Adams, W. J. 1997. The environmental fate of phthalate esters: a literature review, *Chemosphere.* 35: 667–749.
- Stamets, P. 2000. *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms Tercera edición*. Berkeley, California: Ten Speed Press. ISBN 1-58008-175-4.
- Suárez-Segundo, J. L., Vázquez-López, D., Torres-García, J. L., Ahuactzin-Pérez, M., Montiel-Martínez, N., Tlecuitl-Beristain, S., *et al.* 2013. Growth of colonies and hyphal ultrastructure of filamentous fungi grown on dibutyl phthalate and di(2-ethylhexyl)phthalate. *Rev. Mex. Ing. Quím.* 12(3):499–504.
- Subramaniyam, R. y Vimala, R. 2012. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. *IJSN.* 3(3):480–486
- Tari, C., Göğüs, N. y Tokatli, F. 2007. Optimization of biomass, pellet size and polygalacturonase production by *Aspergillus sojae* ATCC 20235 using response surface methodology. *Enzyme Microb. Technol.* 40:1108–1116.

- Taub, I. A., Feeherry, F. E., Ross, E. W., Kustin, K., Doona, C. J. 2003. A quasi-chemical kinetics model for the growth and death of *Staphylococcus aureus* in intermediate moisture bread. *J. Food Sci.* 68:2530–2537.
- Thurston, C. F. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140:19–26.
- Tomita, I., Nakamura, Y., Yagi, Y., Tutikawa, K. 1986. Fetotoxic effects of mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP) in mice. *Environ. Health. Perspect.* 65:249–254.
- Tserovska, L., Dimkov, R., Rasheva, T., Yordanova, T. 2006. Extra- and intra-cellular esterases involved in dimethylterephthalate catabolism by *Pseudomonas* sp, *J. Cult. Collect.* 5:35–37.
- Turner, W. B., Aldridge, D. C. 1983. *Fungal Metabolites II*. London: Academic Press.
- U.S. EPA, Toxicity and Exposure Assessment for Children's Health. 2007. *Phthalates*. Recuperado de http://www.epa.gov/teach/chem_summ/phthalates_summary.pdf
- Universidad de Maine. 2014. Chromatography. Recuperado de <http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY251/Chroma.html>
- Walker, G. M., White, N. A. 2011. Introduction to fungal physiology. En K. Kavanagh (Ed.), *Fungi Biology and Applications* (pp. 1–34). Nueva Delhi, India. Wiley-Blackwell.
- Wei, Y., Schottel, J. L., Derewenda, U., Swenson, L., Patkar, S., Derewenda, Z. S. 1995. A novel variant of the catalytic triad in the *Streptomyces scabies* esterase. *Nat. Struct. Biol.* 2:218–223.
- Wensing, M., Uhde, E. y Salthammer, T. 2005. Plastics additives in the indoor environment—flame retardants and plasticizers. *Sci. Total Environ.* 339:19–40.
- Wesenberg, D., Kyriakides, I. y Agathos, S. N. 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnol. Adv.* 22:161–187.
- Wessels, J. G. H. 2000. Hydrophobins, unique fungal proteins. *Mycologist.* 14: 153–159.
- Wessels, J. G. H. 2005. Fungal physiology. *Encyclopedia of life sciences*. John Wiley and sons, Ltd. doi: 10.1038/npg.els.0004305
- Whangsuk, W., Sungkeeree, P., Nakasiri, M., Thiengmag, S., Mongkolsuk, S., Loprasert, S. 2015. Two endocrine disrupting dibutyl phthalate degrading esterases and their compensatory gene expression in *Sphingobium* sp. SM42. *Int. Biodeterior. Biodegradation.* 99:45–54.
- Wittassek, M., Angerer, J. 2008. Phthalates: metabolism and exposure. *Int. J. Androl.* 31 (2):131–138.
- Xavier-Santos, S., Carvalho, C. C., Bonfá, M., Silva, R., Capelari, M. y Gomes, E. 2004. Screening for pectinolytic activity of wood-rotting basidiomycetes and characterization of the enzymes. *Folia. Microbiol.* 49(1):46–52.

- Xu, S., Komatsu, C., Takahashi, I., Suye, S.-I. 2006. Purification and properties of diethyl p-phthalate esterase from *Ochrobactrum anthoropi* 6-2b. *Sen'iGakkaishi*. 62:226–231.
- Yaropolov, A. I., Skorobogatko, O. V., Vartanov, S.S. y Varfolomeyev, S. D. 1994. Laccase: properties, catalytic mechanism, applicability. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 49:257–279.
- Yeo, S., Kim, M. y Choi, H. 2007. Increased expression of laccase by the addition of phthalates in *Plebia tremellosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 278:72–77.
- Yeung, K. S. y Gubui, J. 2008. Shiitake Mushroom (*Lentinula edodes*). *J. Soc. Integr. Oncol.* 6(3):134–134.
- Zanon, J., Armengol, J. y Vilaseca, C. 2005 Estudio del síndrome de decaimiento en el cultivo de *Pleurotus ostreatus*. *Biol. San. Ven. Plagas* 31:431–441.
- Zhu-Hua, L. Yi-Rui, W. Chow, R. K. K., Jing-Jing, L. Ji-Dong, G. Vrijmoed, L. P. P. 2012. Purification and characterization of an intracellular esterase from a *Fusarium* species capable of degrading dimethyl terephthalate. *Process Biochem.* 47:68:–693.

Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences



An International Peer Review E-3 Journal of Sciences

Available online at www.jcbpsc.org

Section B: Environmental Biotechnology

CODEN (USA): JCBPAT

Research Article

Growth of *Pleurotus ostreatus* ATCC 3526 in different concentrations of di (2-ethylhexyl) phthalate in submerged fermentation

Córdoba-Sosa Gabriela², Torres José Luis², Ahuactzin-Pérez Miriam³, Díaz-Godínez Gerardo¹, Díaz Rubén¹, Sánchez Carmen¹

¹Laboratory of Biotechnology, Research Centre for Biological Sciences. Universidad Autónoma de Tlaxcala, Ixtacuixtla, Tlax., C.P. 90120, México.

²Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, Tlax., C.P. 90000, México.

³Facultad de Agrobiología, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Ixtacuixtla, Tlax., C.P. 90120, México.

Abstract: (Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) is a plasticizer used in the manufacture of plastics which impart flexibility to polyvinyl chloride resins. This is an endocrine disrupting compound that could lead to cancer. It has been reported that *Pleurotus ostreatus* is a fungus capable of growing using DEHP as energy source. Specific growth rate (μ), maximum biomass (X_{max}), laccase and esterase activities, pH profiles and enzymatic kinetic parameters were evaluated in *Pleurotus ostreatus* grown in DEHP in submerged fermentation. Flasks of 125 ml containing 0, 750, 1200 and 1500 mg of DEHP/l were used. All media were added with 10 g of glucose/l. Flasks containing 50 ml culture medium were inoculated and incubated at 25 °C for 16 days on a rotary shaker (120 rpm). X_{max} and μ were evaluated using the logistic equation. Biomass (X) was determined by dry weight method. Laccase and esterase activities were evaluated using 2, 6-dimethoxyphenol and *p*-nitrophenyl butyrate as substrates, respectively. Enzymatic kinetic parameters were evaluated based on maximal enzymatic activity (E_{max}). Results showed that the highest X_{max} was observed in media containing 1500 mg of DEHP/l and the esterase activity was much higher than the laccase activity at the beginning of the stationary phase in medium containing 1500 mg of DEHP/l. These results suggest that

there was no catabolite repression (glucose effect) and that DEHP was used as carbon and energy source by this fungus.

Key words: Di (2-ethylhexyl) phthalate, *Pleurotus ostreatus*, esterase activity, laccase activity, submerged fermentation.

INTRODUCTION

Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) belongs to the family of the phthalates or acid phthalic esters. More than 60 kinds of phthalates are produced nowadays¹. These compounds are used each year as plasticizers in flexible polyvinyl chloride (PVC) products, resins, cellulosic, polyvinyl acetate and polyurethanes³. The annual worldwide production of phthalates exceeds 5 million tons². DEHP is a high production volume chemical used in the manufacture of a wide variety of consumer food packaging, some children's products, and some polyvinyl chloride (PVC) medical devices. The European government banned the use of DEHP in toys and children's products that might be placed in the mouth (<http://www.marchem.com/materials/plastisols/phthalatefree.html>). It has been reported that phthalates are mutagenic, teratogenic and carcinogenic^{4,5}.

Phthalates are important environmental contaminants and are difficult to degrade easily. Elimination of DEHP by microorganisms is considered to be one of the major routes of environmental degradation. Hwang *et al.*⁶ studied the degradation of 100 mg/l of butylbenzyl phthalate (BBP) by *P. ostreatus*. They found that the degradation of this compound was higher when the BBP was dispersed in an optimum liquid medium (yeast-malt extract-glucose) than in a minimal medium. They also reported that the esterases are more important than laccases in the degradation of this compound. On the other hand, *P. ostreatus* is the second most cultivated edible mushroom worldwide. This mushroom has a very important enzymatic machinery that is able to produce laccases and manganese peroxidases^{7,8}.

In this research, specific growth rate (μ), laccase and esterase activities, pH profiles and enzymatic kinetic parameters were evaluated in *P. ostreatus* grown in media containing 0, 750, 1200 and 1500 mg of DEHP/l in submerged fermentation.

METHODS

Microorganism: A strain of *P. ostreatus* from the American Type Culture Collection (ATCC 3526) (Manassas, Virginia, U.S.A.) was used. The strain was grown on malt extract agar (MEA) at 25 °C and stored at 4 °C until used.

Culture media: Four liquid media were used, these media had; 1) 50 ml of glucose-yeast extract medium (GY) + 0 g of DEHP/l, 2) 50 ml of GY + 750 g of DEHP/l, 3) 50 ml of GY + 1200 g of DEHP/l and 4) 50 ml of GY + 1500 g of DEHP/l. The GY medium had (in g/L): glucose, 10; yeast extract, 5; NH_4Cl , 0.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5; K_2HPO_4 , 0.4; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.25; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05; MnSO_4 , 0.05 and $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001. The pH was adjusted at 6.5 using either 0.1 M HCl or 0.1 M NaOH. DEHP was added to the autoclaved media.

Specific growth rate: Flasks of 125 ml containing 50 ml of the different culture media were inoculated with three mycelial plugs of 10 mm of diameter and incubated at 25°C for 23 days on a rotary shaker at 120 rpm. The biomass (X) was obtained by filtration of the samples using filter paper (Whatman No. 4),

and it was determined as difference of dry weight (g/l) [$X = X(t)$] using the Velhurst-Pearl or logistic equation (Equation 1). The X was measured daily until that the stationary phase of growth of the fungus started (16 days of incubation).

$$dX/dt = \mu [1 - X/X_{max}]X \text{ or } X[X_{max}/1 + Ce^{-\mu t}] \text{ Equation 1}$$

Where, $X = X_0$ (the initial biomass value), $C = (X_{max} - X_0)/X_0$, μ is the maximal specific growth rate and X_{max} is the maximal (or equilibrium) biomass level achieved when $dX/dt = 0$ for $X > 0$. Thus, in logistic growth, the growth rate decreases as biomass increases.

Evaluations of kinetic parameters of the logistic equation were carried out using a non-linear least square-fitting program (Solver; Excel, Microsoft)⁹⁻¹¹. The value of μ was evaluated from the third to the 16 d of growth in order to avoid the variation adjustment problem.

Laccase and esterase activities: The supernatant obtained from the filtration of the samples corresponded to the enzymatic extract (EE). Laccase activity was determined in each EE by changes in the absorbance at 468 nm (using a Jenway 6405UV/Vis spectrophotometer), using 2, 6-dimethoxyphenol (DMP, SIGMA) as substrate.

The assay mixture contained 900 μ L of 2 mM DMP in 0.1 M acetate buffer pH 4.5 and 100 μ l EE, which were incubated at 40 °C for 1 min. Esterases activity was determined by changes in the absorbance at 405 nm (using a Jenway 6405UV/Vis spectrophotometer), using *p*-nitrophenyl butyrate (*p*NPB) as substrate. The reaction mixture contained 10 μ l of a *p*NPB solution [1.76 % (v/v) of *p*NPB in acetonitrile], 790 μ l of 50 mM acetates buffer pH 7.0, 0.04% Tritón X-100 and 100 μ l of the EE, which were incubated^{12,13} at 37 °C for 5 min^{12,13}. One enzymatic unit of laccase activity or esterase activity (U) is defined as the amount of enzyme which gives an increase of 1 unit of absorbance per min in the reaction mixture.

The enzymatic activities were expressed in U/l of EE.

Enzymatic kinetic parameters: The enzymatic kinetic parameters were evaluated in those cultures grown in liquid medium. Yield of laccases per unit of biomass produced (Y_{EX}) was estimated as the relation between maximal enzymatic activity (E_{max}) and X_{max} (see specific growth rate in the methodology section). Enzymatic productivity ($P = U/l \text{ h}$) was evaluated using the time of E_{max} . The specific rate of enzymatic production was calculated^{9,10,14} by the equation; $qP = (\mu) (Y_{EX})$

STATISTICAL ANALYSIS

All the experiments were carried out by triplicated. Data were evaluated using one-way ANOVA and Tukey post-test using The Graph Pad Prism® program.

RESULTS

P. ostreatus reached the stationary growth phase in medium without DEHP after 15 days in the media containing 750, 1200 and 1500 mg of DEHP/l at day 12 (Fig. 1).

The highest μ was obtained in medium containing 750 mg of DEHP/l, followed by the media containing 1200 mg of DEHP/l, 1500 mg of DEHP/l and the medium lacking DEHP (Equation 1, Fig. 1, and Table 1). The highest X_{max} was obtained in the culture media with addition of 1500 and 1200 mg of DEHP/l, and the lowest X_{max} was showed in the medium containing 750 mg of DEHP/l (equation 1, Table 1).

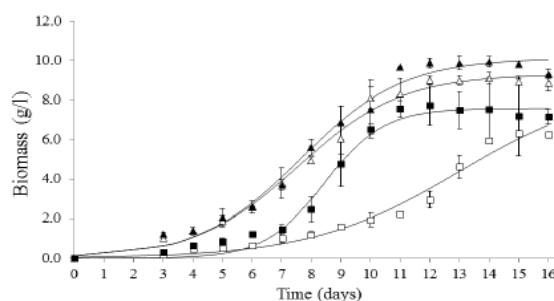


Figure 1: Specific growth rate of *P. ostreatus* grown in 0 (\square), 750 (\blacksquare), 1200 (\triangle) and 1500 (\blacktriangle) mg of DEHP/l in submerged fermentation. The experimental data of μ were adjusted using the equation 1.

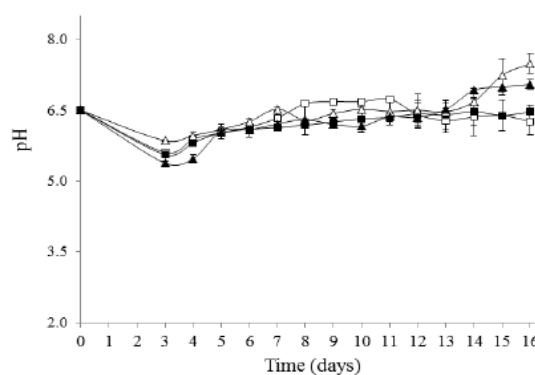


Figure 2: Profile of pH of *P. ostreatus* grown in 0 (\square), 750 (\blacksquare), 1200 (\triangle) and 1500 (\blacktriangle) mg of DEHP/l in submerged fermentation.

Table 1: Parameters of growth of *P. ostreatus* grown in different concentrations of DEHP in submerged fermentation.

| Parameter | Culture media | | | |
|-----------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| | Without DEHP | DEHP (mg/l) | | |
| | | 750 | 1200 | 1500 |
| μ (1/h) | 0.016 ^b (0.001) | 0.041 ^a (0.007) | 0.024 ^b (0.003) | 0.024 ^b (0.003) |
| X_{max} (g/l) | 8.78 ^{bc} (0.27) | 7.59 ^c (0.64) | 9.31 ^{abc} (0.017) | 10.12 ^{ab} (0.17) |

Means with the same letter within a row are not significantly different. Numbers in parenthesis correspond to standard deviation of three separate experiments.

From all the culture media, the medium containing 1500 mg of DEHP/l had the lowest pH value (after 3 d of growth) (5.4 approx.). The media containing 1200 and 1500 g of DEHP/l showed a similar pH profile.

The pH profiles of the medium added with 750 mg of DEHP/l and medium lacking DEHP were similar (Fig. 2). The pH of the media containing 1200 and 1500 mg of DEHP/l showed higher pH than the rest of the culture media at the end of the fermentation.

The highest activity of laccase was showed during the stationary phase of growth (13 d of fermentation) in the media containing 1500 mg of DEHP/l (Fig. 3a). The highest activity of esterase also was observed at the end of stationary phase (15 d of fermentation) in media containing 1500 mg of DEHP/l (Fig. 3b). In general, the lowest activities of laccase and esterase were observed in the medium lacking DEHP and in the medium containing 750 mg of DEHP/l (Figs. 3a, b). In general, the activity of esterase was observed in all the media containing DEHP, however, the activity of laccase was mostly observed in media containing 1500 and 1200 mg of DEHP/l (Figs. 3a, b). In general, the medium lacking DEHP showed the lowest activities of laccase and esterase (Figs. 3a, b). The production of esterase at the beginning of the stationary phase of growth was similar in the media containing 0, 750 and 1200 g of DEHP/l (Fig. 3a). The highest laccase and esterase kinetic parameters were observed in 1500 mg of DEHP/l, followed by the rest of the culture media DEHP/l (Tables 2, 3).

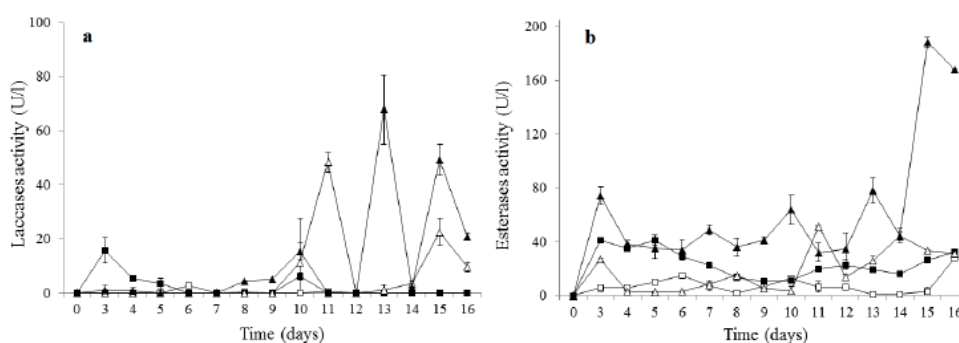


Figure 3: Laccases (a) and esterases (b) activities of *P. ostreatus* grown in 0 (□), 750 (■), 1200 (△) and 1500 (▲) mg of DEHP/l in submerged fermentation.

Table 2: Laccase kinetic parameters of *P. ostreatus* grown in different concentrations of DEHP in submerged fermentation.

| Parameter | Culture media | | | |
|-----------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| | DEHP (mg/l) | | | |
| | 0 | 750 | 1200 | 1500 |
| E_{max} (U/l) | 2.8 ^c (0.346) | 15.8 ^c (0.95) | 48.35 ^b (3.522) | 67.85 ^a (12.896) |
| $Y_{E/X}$ (U/g) | 0.318 ^b (0.032) | 2.003 ^b (0.052) | 5.181 ^a (0.384) | 6.69 ^a (1.299) |
| qP (U/g/h) | 0.005 ^d (0.0002) | 0.084 ^c (0.015) | 0.124 ^b (0.005) | 0.160 ^a (0.016) |
| P (U/l/h) | 0.02 ^b (0.002) | 0.022 ^a (0.013) | 0.183 ^a (0.013) | 0.218 ^a (0.041) |

Means with the same letter within a row are not significantly different. Numbers in parenthesis correspond to standard deviation of three separate experiments.

Table 3: Esterase kinetic parameters of *P. ostreatus* grown in different concentrations of DEHP in submerged fermentation.

| Parameter | Culture media | | | |
|-----------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| | DEHP (mg/l) | | | |
| | 0 | 750 | 1200 | 1500 |
| E_{max} (U/l) | 27.845 ^d (0.622) | 41.293 ^c (3.342) | 51.402 ^b (0.641) | 188.414 ^a (3.313) |
| $Y_{E/X}$ (U/g) | 3.169 ^c (0.157) | 5.243 ^b (0.690) | 5.508 ^b (0.077) | 18.569 ^a (0.435) |
| qP (U/g/h) | 0.053 ^c (0.006) | 0.2228 ^b (0.066) | 0.133 ^{cb} (0.012) | 0.451 ^a (0.039) |
| P (U/l/h) | 0.073 ^d (0.002) | 0.344 ^c (0.028) | 0.195 ^b (0.002) | 0.523 ^a (0.009) |

Means with the same letter within a row are not significantly different. Numbers in parenthesis correspond to standard deviation of three separate experiments.

CONCLUSIONS

These results showed that the DEHP is used by this fungus to grow, since the media containing high amount of DEHP showed the lowest μ and the highest X_{max} (Fig. 1, Table 1). It is known that from that 100% of carbon source added to a culture media, 50% is used by microorganisms for biomass production and 50% for structure formation. In this study 10 g glucose/l were added to all the cultures (see materials and methods), since a diauxic growth might occurs in some microorganism that grow on complex compounds⁶. The X_{max} produced in medium lacking DEHP was approx. 5 g/l (amount that corresponded to 50% of 10 g/l of glucose that was added to all the media (Table 1). These results showed that the DEHP was used as carbon and energy sources, since the biomass production was enhanced as the concentration of DEHP increased (Fig. 1, Table 1).

The pH increased during the fermentation in the media containing 1200 and 1500 mg of DEHP/l. This could be due to the degradation of this compound, releasing basic breakdown products of DEHP (<http://umbdd.ethz.ch/index.html>).

Hwang *et al.*⁶ studied the addition of 100 mg/l of BBP to yeast-malt extract-glucose culture medium and reported that the esterases activity was induced by BBP itself and that these enzymes were more important than the laccases in the BBP degradation by *P. ostreatus* in submerged fermentation. Similarly, we found that *P. ostreatus* had higher activity of esterase than activity of laccase in submerged fermentation containing different concentrations of DEHP. However, Van der Vlugt-Bergmans *et al.*¹⁵ studied the growth of the white rot fungus *Phlebia tremellosa*, in submerged fermentation containing benzylbutyl phthalate and diethyl phthalate in concentration of 30% and 80%, respectively, and found that the fungus increased the laccase production after 9 days of growth. On the other hand, the maximal enzymatic activity, enzymatic productivity and rate of the enzymatic production depend on the amount of phthalate added to the liquid medium (Tables 2 and 3). The kinetic parameters were higher in the medium containing 1500 mg of DEHP/l than in the rest of the media. It shows that high concentrations of DEHP increased the yield of enzyme and enhanced the metabolism of the strain.

These results show that the type of enzyme produced during the DEHP degradation depends, at least in part, on the DEHP concentration. The production of laccase and esterase, and the results of the growth of *P. ostreatus* in the medium containing 1500 mg of DEHP/l suggest that there was no catabolite repression (glucose effect) and that DEHP was used as carbon and energy source.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank to the Universidad Autónoma de Tlaxcala for supporting this research throughout the project CACyPI-UATx-2013 and for the scholarship provided to GCS to carry out her BSc thesis.

REFERENCES

1. Y. Lu, F. Tang, Y. Wang, J. Zhao, X. Zeng, Q. Luo, L. Wang. Biodegradation of dimethyl phthalate, diethyl phthalate and di-n-butyl phthalate by *Rhodococcus* sp. L4 isolated from activated sludge. *J Hazard Mater*, 2009, 168 (2-3): 938-943.
2. C. Mackintosh, J. Maidonado, M.G. Ikonou, F.A. Gobas. Sorption of phthalate esters and PCBs in a marine ecosystem. *Environ Sci Technol*, 2006, 40 (11): 3481-3488.
3. S. Vats, R.K. Singh, P. Tyagi. Phthalates- A priority pollutant. *Int J Adv Biol Res*, 2013, 3 (1): 1-8.
4. M.M. Dobrzyńska, E.J. Tyrkiel, E. Derezińska, K.A. Pachocki, J.K. Ludwicki. Two generation reproductive and developmental toxicity following subchronic exposure of pubescent male mice to di(2-ethylhexyl)phthalate. *Ann Agric Environ Med.*, 2012, 19 (1): 31-37.
5. M. Manikkam, R. Tracey, C. Guerrero-Bosagna, M.K. Skinner. Plastics derived endocrine disruptors (BPA, DEHP and DBP) induce epigenetic transgenerational inheritance of obesity, reproductive disease and sperm epimutations. *PLoS ONE* 8 (1): e55387. DOI: 10.1371/journal.pone., 2013,0055387.
6. S.S. Hwang, H.Y. Kim, J.O., H.G. Song. Changes in the activities of enzymes involved in the degradation of butylbenzyl phthalate by *Pleurotus ostreatus*. *J Microbiol Biotechnol*, 2012, 22 (2): 239-243.
7. C. Sánchez, G. Viniegra-González. Detection of highly productive strains of *Pleurotus ostreatus* by their tolerance to 2-deoxy-D-glucose in starch-based media. *Mycol Res*, 1996, 100 (4): 455-461.
8. C. Sánchez. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol Adv.*, 2009, 27 (2): 185-194.
9. R. Díaz, S. Alonso, C. Sánchez, A. Tomasini, M. Bibbins-Martínez, G. Díaz-Godínez. Characterization of the growth and laccase activity of strains of *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation. *BioResources*, 2011, 6 (1): 282-290.
10. R. Díaz, M. Téllez-Téllez, M.D. Bibbins-Martínez, C. Sánchez, G. Díaz-Godínez, J. Soriano-Santos. Influence of initial pH of the growing medium on the activity, production and expression profiles of laccases produced by *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation. *Electron J Biotechnol*, 2013,16 (4): 1-13.
11. G. Viniegra-González, E. Favela-Torres, C.N. Aguilar, S.J. Romero-Gómez, G. Díaz Godínez, C. Augur. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochem Eng J*, 2003, 13: 157-167.
12. G. Alves-Macedo, T. Fontes-Pio. A rapid screening method for cutinase producing microorganisms. *Braz J Microbiol.*, 2005, 36 (4): 388-394.
13. A.Kasturi, B. Shampa, V. Venkata. Production, characterization and applications of microbial cutinases. *Process Biochem*, 2009, 44 (2): 127-134.

14. G. Viniestra-González, E. Favela-Torres, C.N. Aguilar, S.J. Romero-Gómez, G. Díaz-Godínez, C. Augur. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochem Eng J*, 2003, 13 (2-3): 157-167.
15. C.J. Van der Vlugt-Bergmans, C.A. Wagemakers, J.A. Van Kan. Cloning and expression of the cutinase a gene of *Botrytis cinerea*. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1997, 10 (1): 21-29.

*** Corresponding author: Dr.Sánchez Carmen**

¹Laboratory of Biotechnology, Research Centre for Biological Sciences. Universidad Autónoma de Tlaxcala, Ixtacuixtla, Tlax., C.P. 90120, México.
sanher6@hotmail.com