

Universidad Nacional de Misiones. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Doctorado en Ciencias Aplicadas

Doctoranda
Lic. Laura Ester ORTELLADO

Aplicación de lipasas de *Penicillium* sp. en la biodegradación de aguas residuales ricas en lípidos

Tesis de Doctorado presentada para obtener el título de “Doctor en Ciencias Aplicadas”

“Este documento es resultado del financiamiento otorgado por el Estado Nacional, por lo tanto, queda sujeto al cumplimiento de la Ley N°26.899”.

Directora
Dra. María Isabel FONSECA

Co-Director
Dr. Pedro Darío ZAPATA

Posadas, 2022



Esta obra está licenciada bajo Licencia Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial-Compartir Igual 4.0 Internacional <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>



Universidad Nacional de Misiones
Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y
Naturales



Aplicación de lipasas de *Penicillium* sp. en la biodegradación de aguas residuales ricas en lípidos

Por Lic. Laura Ester ORTELLADO

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la
Universidad Nacional de Misiones para optar al grado académico de

DOCTOR EN CIENCIAS APLICADAS

Posadas, República Argentina

2022

Directora

Dra. María Isabel FONSECA

Co-director

Dr. Pedro Dario ZAPATA

TRIBUNAL EXAMINADOR

(Disposición N° 533-22)

Dra. Cintia Mariana ROMERO (UNT)

Dra. Graciela Beatriz GAVAZZO (IMAM-FCEQyN-UNaM)

Dr. Luis Alberto BRUMOVSKY (FCEQyN-UNaM)

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA (Disposición)

Disposición N° 962/22

Aplicación de lipasas de *Penicillium* sp. en la biodegradación de aguas residuales ricas en lípidos

Por Lic. Laura Ester ORTELLADO

Lugar de desarrollo del trabajo de tesis

Laboratorio de Biotecnología Molecular, Instituto de Biotecnología Misiones
“María Ebe Reca” (InBioMis), Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y
Naturales, Universidad Nacional de Misiones

COMISIÓN DE SUPERVISIÓN (Resolución Consejo Directivo N° 444-17)

Dra. Romero Cintia Mariana - Universidad Nacional de Tucumán

Dra. Aguilera Patricia Mabel- Universidad Nacional de Misiones

Dr. Ferri Cristian Alberto- Universidad Nacional de Misiones

CARRERA DE DOCTORADO EN CIENCIAS APLICADAS

Proyecto de Carrera N° 10933/11

Con reconocimiento de la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación

Universitaria (CONEAU) N° 344/11.

Esta tesis está dedicada a mi madre por todo su esfuerzo para ayudarme a llegar hasta aquí.

Agradecimientos

No es fácil llegar al final de una etapa, se necesita perseverancia y esfuerzo. Pero sobre todas las cosas, la fuerza que me ha ayudado a conseguirlo ha sido el apoyo recibido de muchas personas. Para ellas van estas palabras de agradecimiento.

Quiero agradecer principalmente a mi directora, la Dra. María Fonseca y mi co-director el Dr. Pedro Zapata y la Dra. Laura Villalba por abrirme las puertas del laboratorio 204 para mi tesis de grado primero y del InBioMis más tarde, permitiéndome ser parte de este hermoso equipo desde ya hace más de ocho años. Es gracias a ellos que conocí aun más la biotecnología y el maravilloso mundo de los hongos. Muchas gracias por guiarme con sabiduría, paciencia e humildad.

A los miembros de la comisión de supervisión, Dra. Romero Cintia, Dra. Aguilera Patricia y el Dr. Ferri Cristian por acompañarme y aconsejarme a lo largo de todo este proceso y desde ya a los miembros del jurado por su buena predisposición a la revisión de la presente tesis.

A quienes me han ayudado en diferentes etapas de esta tesis a Adri con quien compartimos gran parte de los ensayos y puestas a puntos mil gracias!. A Marcela, Gabi D, Adri y Florencia por tan generosamente enseñarme y ayudarme en este trabajo. A Leandro mi tesista por todo su trabajo y acompañarme en este proceso mutuo de enseñanza y aprendizaje.

Por todo el apoyo y buena onda a mis compañera/os: Marilyn, Silvana, Karina, Lucrecia, Adriana, Loli, Ana, Gaby A, Anto, Manu, March, Naty, Seba, Gustavo, Juan, Martín, Andrea. Y en realidad, a toda la gente hermosa que forman parte o fueron parte de la que considero mi segunda casa el InBioMis, muchas gracias a todos! Porque muchas veces aunque sea una palabra de aliento es un motor para seguir adelante.

A mi familia que son mi fuerza!

A todos simplemente muchas muchas gracias !!

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
aas	Aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNr	ADN ribosómico
ANOVA	del inglés, <i>Analysis of variance</i> ; análisis de la varianza
ARNm	ARN mensajero
BLAST	del inglés, <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> ; Herramienta de alineamiento local básico
Bt	β -tubulina
CAZy	del inglés, <i>Carbohydrate Active Enzymes</i> ; enzimas activas sobre carbohidratos
CBS	del holandés, <i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i> ; Instituto de Biodiversidad Fúngica Westerdijk
CEQUIBIEM	Centro de Estudios químicos y biológicos de Espectrometría de Masa
CMD	Calmodulina
dNTPs:	Desoxirribonucleótidos trifosfatos
DTT	Ditiotreitol
E	Enzima
E.C	Del inglés, <i>Enzyme Commission Numbers</i> , Números de la Comisión de enzimas
g	Gramos
HCD	del inglés, <i>High Collision Dissociation</i> ; disociación de alta colisión
His	Histidina
HPLC	del inglés, <i>High Performance Liquid Chromatography</i> ; Cromatografía líquida de alta eficiencia
InBioMis	Instituto de Biotecnología Misiones
ITS	del inglés, <i>Internal Transcribed Spacer</i> ; región espaciadora transcrita interna
IUBMB	Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular
IUPAC:	del inglés, <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> ; Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
L	Litros
LBM	Laboratorio de Biotecnología Molecular
LSD	del inglés, <i>Least Significant Difference</i> ; diferencia mínima significativa
Lys	del inglés, <i>Lysine</i> ; lisina
MEA	Medio agar extracto de malta
mg	Miligramo
min	Minutos
mL	Mili litro
mM	Mili Molar

MS	del inglés, <i>Mass Spectrometry</i> ; espectrometría de masas
NCBI	del inglés, <i>National Center for Biotechnology Information</i> ; Centro Nacional para Información Biotecnológica
NJ	del inglés, <i>Neighbor Joining</i> ; vecino más cercano
p	Valor “p” de probabilidad estadística
Pb	Pares de bases
PCR	del inglés, <i>Polymerase Chain Reaction</i> ; reacción en cadena de la polimerasa
Pfam	del inglés, <i>Protein FAMilies</i> ; Familia de proteínas
pH	Potencial de hidrógeno
PM/MM	Marcador de peso molecular
pNPP	p-nitrofenol palmitato
PYE	Medio peptona, extracto de levadura, extracto de carne
rpb2	Segunda subunidad más grande de la ARN polimerasa II
S	Sustrato
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	del inglés, <i>Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i> ; electroforesis desnaturalizante con sulfato dodecílico de sodio
SmF	Fermentación aeróbica sumergida
sp	Especie
SSF	Fermentación en estado sólido
TBE	Tris-Borato-EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético)
TCA	del inglés, <i>Trichloroacetic acid</i> ; ácido tricloroacético
Tm	del inglés, <i>Temperature melting</i> ; Temperatura de hibridación
U	Unidad de actividad enzimática
U.V	Ultra Violeta
UNaM	Universidad Nacional de Misiones
UNIPROT	del inglés, <i>universal protein resource</i> ; Base de Datos de proteínas
YES	del inglés <i>Yeast Extract Sucrose</i> , Extracto de levadura sacarosa
μM	Micro Molar
EDTA	Etilendiaminotetraacético
3D	Tridimensional

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS:

	Pág.
Figura 1. Representación esquemática de una reacción enzimática (tomando de Blanco & Blanco, 2017).	4
Figura 2. Estructura de las proteínas (tomando de Silva <i>et al.</i> , 2014).	6
Figura 3. Hidrolisis de un triglicérido catalizada por la enzima lipasa (tomando de Steven. Cotten, 2020).	10
Figura 4 . Clasificación de lipasas de levaduras y hongos (tomando de Gupta <i>et al.</i> , 2015 con modificaciones).	11
Figura 5. Estructura de α/β hidrolasa. Flechas: cadenas β ; Rectángulos: hélices α ; Líneas curvas: lazos; GxSxG: Residuo nucleófilo con la S serina; D: ácido aspártico o ácido glutámico; H: Residuo de histidina (tomando de Borrelli & Trono, 2015).	12
Figura 6. Cambio estructural de la lipasa: (a) La cubierta se encuentra cerrada y (b) la cubierta se encuentra abierta (tomado de Ugo <i>et al.</i> , 2017).	13
Figura 7. Mecanismo catalítico de las lipasas (tomado de Ugo <i>et al.</i> , 2017).	15
Figura 8. Reacciones catalizadas por lipasas (tomado de Casas-Godoy <i>et al.</i> , 2018).	17
Figura 9. Patrones de ramificación de los conidióforos observados en <i>Penicillium</i> : A. Conidióforos con fiálides solitarias. B. Monoverticilado. C. Divaricado. D, E. Biverticilado. F. Terverticilado. G. Cuatriverticilados. Barra de escala = 10 μm (tomado de Visagie <i>et al.</i> , 2014).	21
Figura 10. Aplicaciones de las lipasas fúngicas (tomado de Nimkande <i>et al.</i> , 2022).	26
Figura 11. Aislamientos de <i>Penicillium</i> sp. con los mejores I_{AL} . A- LBM 081. B- LBM 070. C- LBM 068. D- LBM 069. E- LBM 079. F- LBM 088. G- LBM 073. Se observa a la izquierda vista del hongo crecido en medio de cultivos en MEA luego de 6 días; en el centro microfotografías tomadas en microscopio óptico con 100 X de aumento; a la derecha placas con actividad lipasa del hongo en presencia de Rodamina B 0,001%- Aceite de oliva 1%.	52

- Figura 12.** Árbol de las secuencias concatenadas de **ITS, Bt y CMD** obtenido por el método NJ. El alineamiento múltiple se realizó entre las secuencias de *Penicillium* sp. LBM 068 (señalado con un punto rojo) y secuencias obtenidas de *GenBank* (NCBI). **56**
- Figura 13.** Árbol de las secuencias concatenadas de **ITS, Bt y CMD** obtenido por el método NJ. El alineamiento múltiple se realizó entre las secuencias de *Penicillium* sp. LBM 069 (señalado con un punto rojo) y secuencias obtenidas de *GenBank* (NCBI). **57**
- Figura 14.** Árbol de las secuencias concatenadas de **ITS, Bt y CMD** obtenido por el método NJ. El alineamiento múltiple se realizó entre las secuencias de *Penicillium* sp. LBM 070 (señalado con un punto rojo) y secuencias obtenidas de *GenBank* (NCBI). **58**
- Figura 15.** Árbol de las secuencias concatenadas de **ITS, Bt y CMD** obtenido por el método NJ. El alineamiento múltiple se realizó entre las secuencias de *Penicillium* sp. LBM 073 (señalado con un punto rojo) y secuencias obtenidas de *GenBank* (NCBI). **59**
- Figura 16.** Árbol de las secuencias concatenadas de **ITS, Bt y CMD** obtenido por el método NJ. El alineamiento múltiple se realizó entre las secuencias de *Penicillium* sp. LBM 079 (señalado con un punto rojo) y secuencias obtenidas de *GenBank* (NCBI). **60**
- Figura 17.** Árbol de las secuencias concatenadas de **ITS, Bt y Rpb2** obtenido por el método NJ. El alineamiento múltiple se realizó entre las secuencias de *Penicillium* sp. LBM 081 (señalado con un punto rojo) y secuencias obtenidas de *GenBank* (NCBI). **61**
- Figura 18.** Árbol de las secuencias concatenadas de **ITS, Bt y Rpb2** obtenido por el método NJ. El alineamiento múltiple se realizó entre las secuencias de *Penicillium* sp. LBM 088 (señalado con un punto rojo) y secuencias obtenidas de *GenBank* (NCBI). **62**
- Figura 19.** Actividad lipasa correspondiente a los siete hongos seleccionados con el mejor I_{AL} a los 4, 6 y 8 días de incubación. Cada ensayo se realizó en medio líquido PYE con y sin la adición de aceite de oliva 2%. **64**
- Figura 20.** Detección de lipasa por zimogramas en geles SDS-PAGE. Las bandas de lipasas se detectaron por fluorescencia con MUF-butirato. Se observan las bandas correspondientes a los días 6 y 8. Los signos - y + indican la ausencia o presencia de aceite de oliva al 2% en el medio de cultivo; PM: marcador de peso molecular (Amersham ECL rainbow Marker, GE Healthcare). **66**
- Figura 21.** Actividad lipasa relativa a diferentes valores de pH y a 30°C. Los datos son la media ± desviación estándar de duplicados. El 100 % correspondió a *P. crustosum* LBM 068: 607 U/mL, *P. crustosum* LBM 069: 644 U/mL, *P. crustosum* LBM 070: 730 U/mL, *P. crustosum* LBM 073: 1105 U/mL, *P. discolor* LBM 079: 941 U/mL, *P. rubens* LBM 081: 1224 U/mL, *P. chrysogenum* LBM 088: 500 U/mL. **68**

- Figura 22.** Actividad lipasa relativa a diferentes valores de temperatura y a pH óptimo. Los datos son la media \pm desviación estándar de duplicados. El 100 % correspondió a *P. crustosum* LBM068 607 U/mL, *P. crustosum* LBM 069 644 U/mL, *P. crustosum* LBM 070 730 U/mL, *P. crustosum* LBM 073 1105 U/mL, *P. discolor* LBM 079 941 U/mL, *P. rubens* LBM 081 1224 U/mL, *P. chrysogenum* LBM 088 500 U/mL. **69**
- Figura 23.** Estabilidad enzimática en el tiempo cuando el sobrenadante se incubó a 30°C y 40°C de los siete hongos seleccionados. **71**
- Figura 24.** Estabilidad enzimática en el tiempo cuando el sobrenadante se incubó a pH 7; 7,5 y 8 de los siete hongos seleccionados. **73**
- Figura 25.** Evaluación de la influencia de diferentes aceites sobre la actividad lipasa en *P. rubens* LBM 081. **75**
- Figura 26.** Evaluación de la influencia de diferentes concentraciones de aceite de oliva sobre la actividad lipasa en *P. rubens* LBM 081. **76**
- Figura 27.** Evaluación de la influencia de diferentes fuentes de nitrógeno sobre la actividad lipasa en *P. rubens* LBM 081. **77**
- Figura 28.** Evaluación de la influencia de la concentración de esporas y agitación sobre la actividad lipasa en *P. rubens* LBM 081. **78**
- Figura 29.** Actividad lipasa relativa a diferentes valores de pH y a 30°C. Los datos son la media \pm desviación estándar de duplicados. **79**
- Figura 30.** Actividad lipasa relativa a diferentes valores de temperatura y a pH óptimo. Los datos son la media \pm desviación estándar de duplicados. **80**
- Figura 31.** Estabilidad enzimática en el tiempo cuando el sobrenadante se incubó a 4, 25, 30 y 40°C. Los datos son la media \pm desviación estándar de duplicados. **81**
- Figura 32.** Estabilidad enzimática en el tiempo cuando el sobrenadante se incubó a pH 7; 7,5; 8 y 8,5. Los datos son la media \pm desviación estándar de duplicados. **82**
- Figura 33.** Detección de lipasa por zimogramas en geles SDS-PAGE. Las bandas de lipasas se detectaron por fluorescencia con MUF-butirato. Se observan las bandas correspondientes a los días 6 y 8 de cultivo del medio optimizado de *P. rubens* LBM 081. **83**
- Figura 34.** Diagrama de Venn de los dos secretomas de *P. rubens* LBM 081 crecido en los diferentes medios de cultivo. Distribución de las 74 proteínas identificadas en los dos secretomas del hongo crecido en los diferentes medios. **87**

Figura 35. Dispersión de las proteínas identificadas en los dos secretomas según su masa molecular (MM) y punto isoeléctrico (pI). Los puntos azules corresponden a todas las proteínas presentes en los dos sobrenadantes analizados. **88**

Figura 36. Cantidad de proteínas diferentes según su acción biológica identificadas en los dos secretomas de *P. rubens* LBM 081. Diferentes proteínas identificadas con actividad enzimática sobre los carbohidratos (CAZy), lípidos (lipasas), proteínas (proteolíticas) y lignina (ligninolíticas) del hongo crecido en los diferentes medios **A**) en medio no optimizado (crecido en medio PYE); **B**) en medio optimizado (peptona al 2% y aceite de oliva 4%). **89**

Figura 37. Cantidad de proteínas diferentes según su modo de acción enzimático, identificadas en los secretomas de *P. rubens* LBM 081. **A**) Crecido en medio control (no optimizado) y **B**) crecido en medio optimizado. **90**

Figura 38. Gráfico de porcentaje de remoción DQO en efluente de aceite de oliva y domiciliario con sobrenadante obtenido de *P. rubens* LBM 081. **93**

Figura 39. Gráfico de porcentaje de remoción aceites y grasas totales en efluente con aceite de oliva y domiciliario tratado con el sobrenadante obtenido de *P. rubens* LBM 081. **94**

Figura 40. Índices de crecimiento relativo (ICR) de *L. sativa* obtenidos en los ensayos de toxicidad de los tratamientos en los efluentes de aceite de oliva y domiciliario y sus respectivos controles. La línea de puntos vertical indica el límite de 0,8 valores superiores a este indican un desarrollo sin efectos negativos de la elongación radicular. **95**

TABLAS:

	Pág.
Tabla 1. Clasificación de las enzimas tomando de (Tao et al., 2020 con modificaciones).	7
Tabla 2. Cebadores utilizados en la amplificación de diferentes regiones para la identificación de los aislamientos seleccionados.	35
Tabla 3. Lista de especies y números de acceso del <i>GenBank</i> utilizados para la construcción de los árboles con las secuencias concatenadas de ITS-Bt-CMD.	36
Tabla 4. Lista de especies y números de acceso del <i>GenBank</i> utilizados para la construcción de los árboles con las secuencias concatenadas de ITS-Bt-Rpb2.	37
Tabla 5. <i>Screening</i> semicuantitativo de actividad lipasa en placas de agar rodamina-aceite de oliva.	50

- Tabla 6.** Números de acceso del *GenBank NCBI* correspondientes a los siete aislamientos con el marcador molecular de las regiones ITS. **54**
- Tabla 7.** Números de acceso del *GenBank NCBI* correspondientes a los siete aislamientos con los marcadores moleculares adicionales Bt, CMD, Rpb2. **55**
- Tabla 8.** Proteínas identificadas en los secretomas de *P. rubens* LBM 081 crecido en medio optimizado con peptona al 2% y aceite de oliva 4% y de su sobrenadante control crecido en medio (PYE) con peptona 0,5%, extracto de levadura 0,3%, extracto de carne 0,3 % suplementados con 2 % de aceite de oliva. Las proteínas indicadas con (**x-negro**) son compartidas en ambos secretomas, las indicadas con (**x-celeste**) son exclusivas del secretoma control y las indicadas con (**x-rojo**) son exclusivas del secretoma del medio optimizado. **84**
- Tabla 9.** Caracterización de los efluentes originales. **91**
- Tabla 10.** Caracterización del efluente con aceite de oliva tratado con sobrenadante de *P. rubens* LBM 081 en diferentes intervalos de tiempo. **91**
- Tabla 11.** Caracterización del efluente domiciliario tratado con sobrenadante de *P. rubens* LBM 081 en diferentes intervalos de tiempo. **92**
- Tabla 12.** Índices de crecimiento relativo (ICR) e índice de germinación (IG) de *L. sativa* obtenidos con los tratamientos seleccionados con el sobrenadante de *P. rubens* LBM 081 sobre los efluentes de A. de oliva y domiciliario. **94**

RESUMEN

El desarrollo industrial y el desmesurado crecimiento demográfico han aumentado la necesidad de desarrollar una gestión integrada de los recursos hídricos, como requisito para la preservación del medio ambiente y el desarrollo económico.

Grandes cantidades de aguas residuales (industriales, agrícolas y domésticas) son vertidas a las cuencas sin un tratamiento previo generando un exceso de contaminantes en las mismas. Es conocido que un exceso en lípidos causa serios problemas ambientales como la obstrucción de la línea de alcantarillado y la generación de una capa aceitosa en la superficie del agua que evita que la penetración del oxígeno y la luz solar afectando la vida acuática. Los métodos de tratamiento físico-químico existentes para las aguas residuales ricas en lípidos son costosos, no son ecológicos y plantean un problema secundario de contaminación. La biorremediación mediada por lipasa (E.C. 3.1.1.3) microbiana presenta un enfoque alternativo atractivo para superar estos problemas. Teniendo en cuenta este contexto esta tesis doctoral se centró en la caracterización de lipasas producidas por aislamientos del género *Penicillium* y en la evaluación de su potencial aplicación en el proceso de biodegradación de aguas residuales ricas en lípidos. Para ello en primera instancia, se realizó un *screening* semicuantitativo utilizando métodos fluorométricos el cual permitió la selección de siete aislamientos del género *Penicillium* con capacidad lipolítica de manera rápida y eficiente. Estos fueron identificados a nivel de especie empleando herramientas moleculares. Posteriormente se evaluó la actividad lipasa en presencia de aceite de oliva eligiéndose a *Penicillium rubens* LBM 081 por presentar los mayores niveles de actividad lipasa.

La actividad lipasa de *P. rubens* LBM 081, al igual que otras lipasas fúngicas, dependió en gran medida de las fuentes de carbono y de nitrógeno presentes en el medio. La máxima actividad enzimática (2780 U/mL) se logró cuando el hongo creció en el medio de cultivo optimizado suplementado con peptona 2%, aceite de oliva 4% y se inoculó con una concentración de esporas 1×10^6 e incubó a 30 °C 140 rpm. *P. rubens* LBM 081 presentó una enzima de 42 kDa en el medio optimizado. La actividad óptima de la lipasa estuvo dentro del rango encontrado para la mayoría de las lipasas fúngicas 30°C, su termoestabilidad fue mayor a 30 °C disminuyendo a temperaturas más elevadas probablemente por desnaturalización de la estructura enzimática. El pH óptimo de la lipasa de *P. rubens* LBM 081 también estuvo dentro del rango encontrado para las lipasas fúngicas de 7. El secretoma del medio optimizado de *P. rubens* LBM 081 presentó una expresión diferencial de las enzimas implicadas en degradar los compuestos lipídicos presentes en el medio y demostró un incremento en la cantidad de enzimas lipolíticas secretadas. El sobrenadante enzimático optimizado con altos títulos de actividad lipasa de *P. rubens* LBM 081 disminuyó la concentración de DQO, de aceites y grasas totales y toxicidad demostrando un potencial en la remediación de los efluentes utilizados.

ABSTRACT

Industrial development and disproportionate population growth have increased the need to develop an integrated management of water resources, as a requirement for the preservation of the environment and economic development.

Large amounts of wastewater (industrial, agricultural and domestic) are discharged into the basins without prior treatment, generating an excess of pollutants in them. It is known that an excess in lipids causes serious environmental problems such as the obstruction of the sewage line and the generation of an oily layer on the surface of the water that prevents the penetration of oxygen and sunlight, affecting aquatic life. Existing physical-chemical treatment methods for lipid-rich wastewater are costly, not environmentally friendly, and pose a secondary pollution problem. Microbial lipase (EC 3.1.1.3) mediated bioremediation presents an attractive alternative approach to overcome these problems. Considering this context, this doctoral thesis was focused on the characterization of lipases produced by isolates of the genus *Penicillium* and on the evaluation of their potential application in the biodegradation process of lipid-rich wastewater.

For this, in the first instance, a semi-quantitative *screening* was made using fluorometric methods which allowed a quick and efficient selection of seven isolates of the genus *Penicillium* with lipolytic capacity. These were identified to the species level using molecular tools. Subsequently, lipase activity was evaluated in the presence of olive oil, choosing *Penicillium rubens* LBM 081 for presenting the highest levels of lipase activity.

Like other fungal lipases, the lipase activity of *P. rubens* LBM 081 depended largely on the carbon and nitrogen sources present in the medium. The maximum enzymatic activity (2780 U/mL) was achieved when the fungus grew in the optimized culture medium supplemented with 2% peptone, 4% olive oil, inoculated with a concentration of 1×10^6 spores, and incubated at 30 °C 140 rpm. *P. rubens* LBM 081 presented an enzyme lipase of 42 kDa in the optimized medium. The optimal activity of the lipase was within the range found for most fungal lipases at 30°C, its thermostability was greater at 30°C, decreasing at higher temperatures, probably due to denaturation of the enzymatic structure. The optimal pH of the lipase from *P. rubens* LBM 081 was also within the range found for fungal lipases of 7. The secretome of *P. rubens* LBM 081 on the optimized medium presented a differential expression of the enzymes involved in degrading the lipid compounds present in the medium and showed an increase in the amount of lipolytic enzymes secreted. The optimized enzymatic supernatant with high titles of lipase activity from *P. rubens* LBM 081 decreased the concentration of COD, total oils and fats, and toxicity showing a potential in the remediation of the effluents used.

ÍNDICE

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1. Enzimas	4
2.1.1. Conceptos claves.....	4
2.1.2. Estructura de las enzimas.....	5
2.1.3. Nomenclatura y clasificación.....	6
2.1.4. Usos y aplicaciones de las enzimas.....	7
2.2. Lipasas	9
2.2.1. Definición.....	9
2.2.2. Clasificación de las lipasas.....	10
2.2.3. Estructura de las lipasas.....	11
2.2.4. Mecanismo catalítico	14
2.2.5. Reacciones catalizadas por lipasas.....	15
2.2.6. Fuentes de lipasas.....	17
2.3. Género <i>Penicillium</i> sp	19
2.3.1 Características del género.....	19
2.3.2 Ubicación sistemática.....	22
2.4. Lipasas producidas por <i>Penicillium</i>	23
2.4.1 Producción de lipasas.....	23
2.5. Aplicaciones de las lipasas fúngicas	26
2.5.1 Industria alimentaria.....	26
2.5.2 Industria textil.....	27
2.5.3 Industria de detergentes.....	27
2.5.4 Aplicaciones médicas.....	28
2.5.5 Productos cosméticos	28
2.5.6 Producción de biodiesel.....	28
2.5.7 Biorremediación.....	29
2.5.8 Otros Usos.....	29
2.6. Micorremediación de aguas residuales	30

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	32
3.1. Hipótesis.....	32
3.2. Objetivo general.....	32
3.3. Objetivos específicos.....	32
4. MATERIALES Y MÉTODOS	33
4.1. Selección de hongos aislados de Misiones productores de lipasas	33
4.1.1. Organismos utilizados.....	33
4.1.2. <i>Screening</i> semicuantitativo de aislamientos productores de lipasas en medios sólidos.....	33
4.2. Identificación molecular de los aislamientos seleccionados por su actividad lipolítica	34
4.2.1. Extracción de ADN.....	34
4.2.2. Obtención de las secuencias de interés.....	34
4.2.3. Electroforesis en geles de agarosa.....	35
4.2.4. Árboles de secuencias concatenadas.....	35
4.3. <i>Screening</i> cuantitativo de los hongos seleccionados productores de la lipasas en medio líquido	38
4.3.1. Determinación de actividad lipasa en los hongos seleccionados.....	39
4.3.2. Análisis estadístico.....	39
4.3.3. Caracterización bioquímica de la actividad lipolítica presente en los sobrenadantes de los aislamientos seleccionados.....	39
4.3.3.1. Determinación del perfil de isoenzimas y peso molecular.....	39
4.3.3.1.1. Zimograma.....	39
4.3.3.2. pH óptimo.....	40
4.3.3.3. Temperatura óptima.....	40
4.3.3.4. Termoestabilidad.....	40
4.3.3.5. Estabilidad en pH.....	40
4.3.3.6. Análisis estadístico.....	40
4.4. Evaluación del efecto de diferentes variables nutricionales y físicas sobre la actividad lipasa producida por <i>Penicillium rubens</i> LBM 081	41
4.4.1. Evaluación del efecto de diferentes aceites sobre la actividad lipasa producido por <i>Penicillium rubens</i> LBM 081.....	41

4.4.2. Evaluación del efecto de diferentes concentraciones del aceite cuyo efecto potenció la actividad lipasa de <i>Penicillium rubens</i> LBM 081.....	41
4.4.3. Evaluación del efecto de diferentes fuentes de nitrógeno sobre la actividad lipasa de <i>Penicillium rubens</i> LBM 081.....	42
4.4.4. Evaluación del efecto de diferente concentración de inóculo y agitación sobre la actividad lipasa de <i>Penicillium rubens</i> LBM 081.....	42
4.4.5. Análisis estadístico.....	42
4.5. Caracterización bioquímica de la actividad lipolítica presente en el sobrenadante optimizado de <i>Penicillium rubens</i> LBM 081	43
4.5.1. pH óptimo	43
4.5.2. Temperatura óptima.....	43
4.5.3. Termoestabilidad.....	43
4.5.4 Estabilidad en pH.....	43
4.5.5 Análisis estadísticos.....	44
4.6. Preparación de las muestras para el análisis secretómico	44
4.6.1. Espectrometría de masas.....	44
4.6.2. Análisis de los datos.....	45
4.7. Aplicación del sobrenadante optimizado de <i>Penicillium rubens</i> LBM 081 en la hidrólisis de efluente domiciliario	46
4.7.1. Ensayo de toxicidad con semillas de <i>Lactuca sativa</i>	48
5. RESULTADOS.....	50
5.1. Evaluación de la habilidad lipolítica de aislamientos del género <i>Penicillium</i> nativos de la Provincia de Misiones	50
5.1.1. <i>Screening</i> de aislamientos productores de lipasa en medios sólidos.....	50
5.2. Identificación molecular de los aislamientos seleccionados por su actividad lipolítica.....	53
5.3. <i>Screening</i> cuantitativo de los hongos seleccionados productores de lipasas en medio líquido	63
5.3.1. Caracterización bioquímica de la actividad lipolítica presente en los sobrenadantes de los hongos seleccionados.....	64
5.3.3.1. Determinación del perfil de isoenzimas y peso molecular.....	65
5.3.3.2. pH óptimo.....	67

5.3.3.3. Temperatura óptima.....	69
5.3.3.4. Termoestabilidad.....	70
5.3.3.5. Estabilidad en pH.....	71
5.4. Evaluación del efecto de diferentes variables nutricionales y físicas sobre la actividad lipasa del hongo seleccionado <i>Penicillium rubens</i> LBM 081.....	74
5.4.1. Evaluación del efecto de diferentes aceites sobre la actividad lipasa producida por <i>Penicillium rubens</i> LBM 081.....	74
5.4.2. Evaluación del efecto de diferentes concentraciones del aceite de oliva sobre la actividad lipasa producida por <i>Penicillium rubens</i> LBM 081.....	76
5.4.3. Evaluación del efecto de diferentes fuentes de nitrógeno sobre la actividad lipasa producida por <i>Penicillium rubens</i> LBM 081.....	76
5.4.4. Evaluación del efecto de diferente concentración de inóculo y agitación sobre la actividad lipasa de <i>Penicillium rubens</i> LBM 081.....	78
5.5. Caracterización bioquímica de la actividad lipolítica presente el sobrenadante optimizado de <i>Penicillium rubens</i> LBM 081.....	78
5.5.1. pH óptimo.....	79
5.5.2. Temperatura óptima.....	79
5.5.3. Termoestabilidad.....	80
5.5.4. Estabilidad en pH.....	81
5.5.5. Determinación del perfil de isoenzimas y peso molecular.....	82
5.6. Secreción de enzimas de <i>Penicillium rubens</i> LBM 081 antes y después de la optimización del medio de cultivo.....	83
5.7. Aplicación del sobrenadante optimizado de <i>Penicillium rubens</i> LBM 081 en la hidrólisis de efluente domiciliario.....	90
5.7.1. Ensayo de toxicidad con semillas de <i>Lactuca sativa</i>	94
6. DISCUSIÓN	96
6.1. Evaluación de la habilidad lipolítica de aislamientos del género <i>Penicillium</i> aislados de la Provincia de Misiones.....	96
6.2. Identificación molecular de los aislamientos seleccionados por su actividad lipolítica.....	97
6.3. <i>Screening</i> cuantitativo de los hongos seleccionados productores de lipasas en medio líquido.....	99

6.4. Caracterización bioquímica de la actividad lipolítica presente en los sobrenadantes de los hongos seleccionados.....	101
6.5. Evaluación del efecto de diferentes variables nutricionales y físicas sobre la actividad lipasa del hongo seleccionado <i>Penicillium rubens</i> LBM 081.....	102
6.6. Caracterización bioquímica de la actividad lipolítica presente el sobrenadante optimizado de <i>Penicillium rubens</i> LBM 081.....	104
6.7. Secreción de enzimas de <i>Penicillium rubens</i> LBM 081 antes y después de la optimización del medio de cultivo.....	105
6.8. Aplicación del sobrenadante optimizado de <i>Penicillium rubens</i> LBM 081 en la hidrólisis de efluente domiciliario.....	107
7. CONCLUSIONES	109
8. BIBLIOGRAFÍA	111

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad debido al crecimiento exponencial de las ciudades modernas y las industrias, una gestión adecuada de las aguas residuales es una necesidad primordial. Las grasas y aceites son uno de los principales residuos generados por las industrias de procesamiento de alimentos, lácteas, cocina, panaderías, industrias de bebidas, así como también de los hogares. Todos estos por lo general son liberados a los cauces naturales sin tratamiento previo, ocasionando la destrucción no sólo del medio ambiente sino también de la flora y fauna (Kumar *et al.*, 2016). Los procesos primarios, previos al tratamiento biológico tradicional, para reducir las concentraciones de aceite y grasa incluyen el tratamiento con polielectrólitos, seguido de flotación por aire disuelto, trampas de grasas, filtración con membranas, coagulación, adsorción en carbón activado y tratamientos fisicoquímicos. Sin embargo, los costos de los productos químicos pueden ser elevados y algunos sistemas de pretratamiento no son capaces de reducir la concentración de aceites y grasas a los niveles requeridos (Geoffry & Achur, 2018). La grasa y las proteínas presentes en las aguas residuales ricas en lípidos generalmente poseen baja biodegradabilidad, causando la generación de olores desagradables, espuma, solidificación a bajas temperaturas, pobre floculación y sedimentación, entre otros inconvenientes que dañan la operación y eficiencia de los procesos biológicos. Los aceites y las grasas son inmiscibles con el agua y al mezclarse forman una película superficial impermeable sobre los cuerpos de agua donde son vertidos, generando condiciones anaeróbicas que evitan el ingreso y disolución del oxígeno (Geoffry & Achur 2018, Ortellado *et al.*, 2020). Desde el Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI), de Argentina, se ha reportado que en los hogares se vierten por los desagües domiciliarios hasta 4 L de restos de aceite vegetal por persona al año (INTI, 2014) y que solo un 1 litro de aceite domestico contamina 1.000 litros de agua.

El uso de enzimas hidrolíticas puede ser de gran interés para resolver los problemas en los procesos de tratamiento biológico de aguas residuales causadas por un alto contenido de grasa y sólidos en suspensión.

En este sentido las lipasas (E.C. 3.1.1.3) son parte de la familia de las hidrolasas, catalizan la hidrólisis de triacilglicéridos en la interfase lípido-agua. Esta hidrólisis tiene lugar a través de los pasos intermedios de formación de diacilglicéridos y monoacilglicéridos (Kumar *et al.*, 2016).

Estas reacciones normalmente proceden con elevada especificidad estereoquímica, convirtiendo a las lipasas en un importante grupo de biocatalizadores en química orgánica. Las razones para su enorme potencial biotecnológico residen en sus principales características como

su estabilidad en solventes orgánicos, no requieren cofactores y poseen una amplia especificidad de sustrato, ya que catalizan tanto la acilación como la deacilación de grasas y además, actúan sobre otros sustratos no naturales, son altamente selectivas respecto a enantiómeros y otros isómeros (Yang *et al.*, 2010). Además de su rol fisiológico en la hidrólisis de grasas neutras, las lipasas catalizan la hidrólisis o síntesis de enantiómeros y regiones selectiva de una amplia variedad de sustratos naturales tales como soja, aceite de pescado, ricino y frutas cítricas (Gurung *et al.*, 2013), asimismo pueden llevar a cabo la esterificación, interesterificación y transesterificación en medios no acuosos.

Las lipasas microbianas presentan una serie de ventajas comparadas a las de origen animal y vegetal, una de estas es que las enzimas son extracelulares en su gran mayoría, por lo que son fácilmente separadas del microorganismo por filtración o centrifugación. En este sentido los hongos presentan una amplia capacidad degradativa produciendo lipasas como parte de su metabolismo. Las lipasas de origen fúngicas son preferidas para su uso en las diversas aplicaciones biotecnológicas debido a que sus enzimas, generalmente, son altamente versátiles, estables y de fácil acceso (Vishnoi *et al.*, 2020) y pueden actuar en ambientes no convencionales (no acuosos) como los usualmente requeridos para llevar a cabo reacciones de síntesis. Los principales géneros de hongos productores de lipasa son *Rhizopus*, *Mucor*, *Penicillium* y *Aspergillus* (Yang *et al.*, 2010, Geoffry & Achur, 2018).

En la naturaleza, el género *Penicillium*, está constituido por hongos oportunistas y versátiles, en su mayoría son saprófitos. Se caracterizan por ser patógenos pos cosecha, y una de las causas más comunes del deterioro por hongos en frutas y verduras. Por otra parte, muchas especies son de utilidad para el ser humano. Por ejemplo, *P. roqueforti* y *P. camembertii* se ha utilizado para hacer quesos a lo largo de la historia (Vishnoi *et al.*, 2020). En particular, *Penicillium* es famoso por ser el productor del primer antibiótico, la penicilina. El productor original de este antibiótico fue *P. notatum*, el cual fue descubierto por Fleming en 1928 pero fue reemplazado más tarde con *P. chrysogenum*, una de las especies más productivas de este antibiótico (Kumar *et al.*, 2012).

Los hongos del género *Penicillium* son buenos productores de enzimas extracelulares tales como, proteasas, celulasas, xilanasas y lipasas. Las condiciones de cultivo tales como la disponibilidad de fuentes de carbono y nitrógeno, la presencia de activadores, estimuladores, inhibidores, agentes tensioactivos, la temperatura de incubación, pH y la tensión de oxígeno puede influir en la síntesis de lipasa (Yang *et al.*, 2010, Ortellado *et al.*, 2020). Estos parámetros son de gran importancia para la obtención de grandes cantidades de las enzimas lipasas. Un gran número de estas lipasas se han proyectado para la aplicación de los aditivos alimentarios

(enzimas modificadores del sabor), reactivos industriales (enzimas que hidrolizan glicéridos) y productos de limpieza (detergentes), biorremediación de aguas y suelos contaminados, así como para aplicaciones médicas (fármacos, enzimas digestivas de diagnóstico) (Geoffry & Achur, 2018; Stollar & Smith, 2020). El aislamiento de lipasas de diferentes fuentes (principalmente microorganismos y mamíferos) han sido ampliamente reportados y son de gran importancia para diversas aplicaciones biotecnológicas.

En el presente trabajo se pretende indagar en la diversidad existente en hongos del Género *Penicillium* aislados de la Provincia de Misiones que presenten una producción de lipasas promisorias para su aplicación en la biorremediación de aguas residuales para lo cual es imprescindible su determinación en busca de características que puedan ser de utilidad para la aplicación en estos procesos y dando una respuesta alternativa de bajo impacto ecológico.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Enzimas.

2.1.1 Conceptos claves.

Las enzimas son proteínas complejas producidas por organismos vivos y actúan como catalizadores biológicos acelerando la velocidad de las reacciones bioquímicas al reducir la energía de activación. Estas reacciones son específicas y necesarias para desarrollar y mantener la vida (Gurung *et al.*, 2013; Borrelli & Trono, 2015; Robinson, 2015). La palabra enzima fue utilizada por primera vez en 1878 por el fisiólogo alemán Wilhelm Friedrich Kühne, cuando describía el proceso de producción de alcohol a partir de azúcares en levaduras, de allí su etimología; del griego “en” dentro y “zume” levadura (Robinson, 2015).

A finales del siglo pasado se comenzaron a tener importantes avances en la extracción, caracterización y uso comercial de muchas enzimas, pero no fue hasta 1920 que las enzimas se pudieron cristalizar revelando que la actividad catalítica estaba asociada a proteínas. (Gurung *et al.*, 2013; Roy Choudhury, 2020). Durante la década del 60 se creía que todas las enzimas eran proteínas hasta que el 1982 Thomas Robert Cech descubrió las ribozimas, moléculas de ácido ribonucleico que tienen propiedades catalíticas (Krueger *et al.*, 1982). En la misma década, los bioquímicos pudieron generar anticuerpos con las mismas propiedades (Pollack *et al.*, 1986). Estas llamadas “abzimas” tienen importancia no solo como catalizadores industriales sino también por sus usos en terapéutica. A pesar de estos grandes descubrimientos, la enzimología clásica se centra en las proteínas que poseen actividad catalítica (Robinson, 2015). Las enzimas como catalizadores solo se requieren en concentraciones muy bajas y pueden acelerar las reacciones bioquímicas sin que se consuman durante el proceso. El proceso de catálisis es la conversión de moléculas de sustrato en moléculas de producto (**Figura 1**).

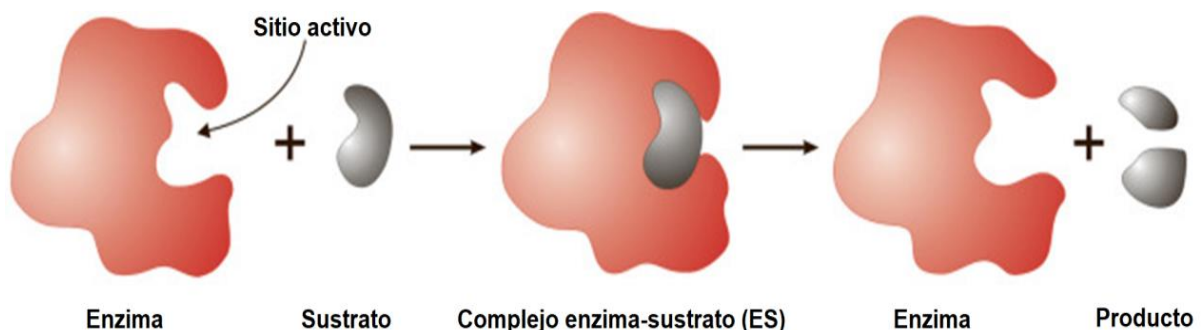


Figura 1. Representación esquemática de una reacción enzimática (tomando de Blanco & Blanco, 2017).

Para formar el complejo enzima-sustrato, el sustrato se une a un lugar definido de la enzima. Esta región de la molécula se denomina sitio activo, centro activo o sitio catalítico. La unión del sustrato a la enzima se produce por enlaces no covalentes, como enlaces de hidrógeno, atracciones iónicas, enlaces hidrofóbicos y/o interacciones de van der Waals. Un vez formado el complejo E-S, la enzima sufre un cambio conformacional adquiriendo un estado tenso y luego pasa a liberar el o los productos resultantes de la reacción (Blanco & Blanco, 2017).

Las propiedades catalíticas de las enzimas vienen determinadas en gran parte por su estructura. Se pueden distinguir cuatro niveles de organización: primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria (**Figura 2**).

2.1.2 Estructura de las enzimas

La estructura primaria consiste en la unión secuencial de aminoácidos, por medio de enlaces peptídicos. La estructura común que presenta cada aminoácido es un átomo de carbono α central ($C\alpha$) que está unido a un grupo amino ($-NH_2$) y un grupo de ácido carboxílico ($-COOH$), los cuales se utilizan para formar enlaces peptídico. El enlace se establece entre el grupo carboxilo de un aminoácido y grupo amino del aminoácido contiguo (Dietzen, 2018). El $C\alpha$ también está unido a un grupo R diferente, lo que le da a cada aminoácido su cadena lateral única. La secuencia de aminoácidos y la composición de las cadenas laterales definen las propiedades y comportamiento de las enzimas (Roy Choudhury, 2020; Stollar & Smith, 2020). La estructura secundaria de la proteína se refiere a la forma en que la estructura primaria se organiza como resultado de la formación de enlaces puentes de hidrógeno entre los grupos $C=O$ y NH de cada enlace peptídico (Blanco & Blanco, 2017). De esta manera se generan plegamientos de segmentos cortos de entre 3 a 30 residuos dando como resultado dos tipos de conformaciones espaciales: α hélices y/o láminas β (**Figura 2**). Estas dos conformaciones son las que evitan el impedimento estérico y maximizan los puentes de hidrógenos en la columna vertebral de la proteína (Stollar & Smith, 2020).

La apariencia tridimensional (3D) de una proteína se conoce como su estructura terciaria y es impulsada por las interacciones entre los grupos R. Dentro de estas interacciones podemos encontrar puentes disulfuro entre aminoácidos cisteínas, interacciones iónicas, fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógenos, interacciones hidrofóbicos, entre otras. Los arreglos resultantes del plegamiento de la estructura se conocen como dominios. La estructura globular es muy característica de las hormonas y las enzimas mientras que la estructura fibrosa de las proteínas de sostén como el colágeno. (Dietzen, 2018; Peyravi, 2019; Stollar & Smith, 2020).

La estructura cuaternaria es el arreglo de múltiples cadenas de proteínas plegadas (subunidades) que interactúan y se organizan para formar un complejo de subunidades mayor (Peyravi *et al.*, 2019).

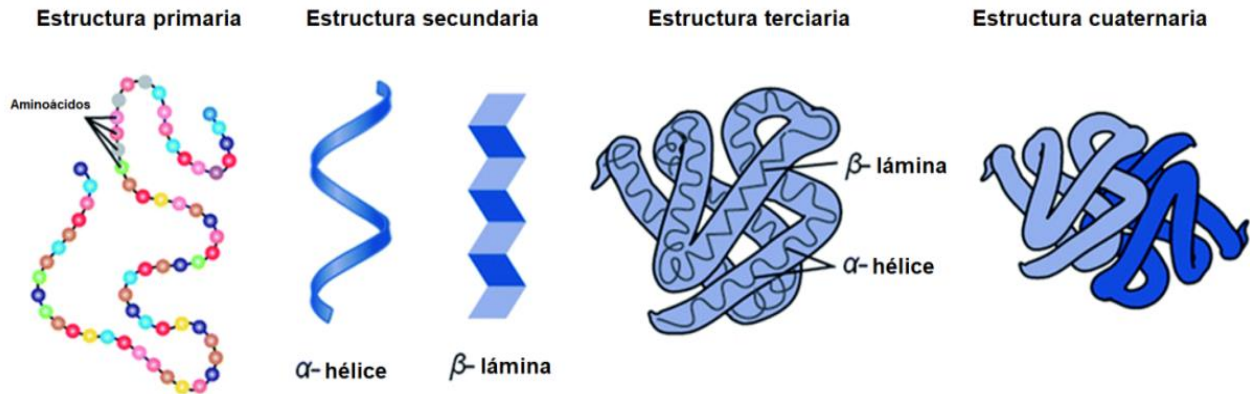


Figura 2. Estructura de las proteínas (tomando de Silva *et al.*, 2014).

2.1.3 Nomenclatura y clasificación

Las enzimas suelen tener nombres comunes referidos al sustrato o a la reacción que catalizan, además de contener el sufijo *-asa* (Ej. Oxidasa, deshidrogenasa, lipasa) o el sufijo *-in* en algunas enzimas proteolíticas (Ej. Tripsina, quimiotripsina). En algunos casos el nombre de la enzima indica el sustrato sobre el que actúa (Ej. Glucosa oxidasa) pero en otros el nombre no brinda información sobre el producto, el sustrato o la reacción involucrada (Ej. Catalasa) (Robinson, 2015; Blanco & Blanco, 2017). Por este motivo la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) estableció la Comisión de Enzimas. De acuerdo a la Comisión de Enzimas, estas se clasifican mediante un número compuesto por cuatro dígitos. El primer dígito indica la familia. El segundo dígito indica el subgrupo dentro de la familia, el cual está relacionado con el sustrato o grupo químico sobre el que actúa. El tercer dígito se refiere a la subclase dentro del subgrupo, el cual identifica el grupo químico específico que interviene en la reacción; y el último dígito se trata de un número serial que las identifica dentro de la subclase o el orden en que cada enzima se va agregando a la lista (Gurung, 2013; Robinson, 2015; Roy Choudhury, 2020). Por ejemplo, la enzima con el nombre genérico “lipasa” tiene el número E.C. 3.1.1.3, se denomina correctamente triacilglicerol lipasa. La primera parte del número se refiere a la naturaleza de la reacción química; una hidrolasa, el segundo dígito indica sobre qué tipo de enlace que actúa; enlaces ésteres. El tercer dígito indica el grupo químico sobre él que actúa; ácidos carboxílicos; y el último dígito corresponde a la identificación precisa.

Se pueden distinguir 7 (siete) categorías (**Tabla 1**) en las que se clasifican a las enzimas de acuerdo al tipo de reacción que cataliza (Tao *et al.*, 2020).

Tabla 1. Clasificación de las enzimas tomando de (Tao *et al.*, 2020 con modificaciones).

EC	Clase principal	Tipo de reacción
EC1	Oxidoreductasas	Actúan sobre el grupo CH-OH. Actúan sobre el grupo CH-NH. Actúan sobre el grupo CH-CH.
EC2	Transferasas	Transferencia de un carbono. Transferencia de nitrógeno. Transferencia de azufre. Glicosiltransferasas.
EC3	Hidrolasas	Actúan sobre enlace peptídico. Actúan sobre anhídridos de ácidos. Actúan sobre enlaces ésteres. Actúan sobre enlace de nitrógeno.
EC4	Ligasas	Ligasa de Fósforo-oxígeno. Ligasa de Carbono-nitrógeno. Ligasa de Carbono-carbono. Ligasa de Carbono-azufre.
EC5	Isomerasas	Ligasas intramoleculares. Transferasas intramoleculares. Oxidoreductasas intramoleculares. Cis-Trans-Isomerasas.
EC6	Ligasas	Forman enlaces Carbono-carbono. Forman enlaces de Carbono-oxígeno. Forman enlaces de nitrógeno-metales.
EC7	Translocasas	Translocación de protones, translocación de aminoácidos. Translocación de cationes. Translocación de aniones.

2.1.4 Usos y aplicaciones de las enzimas

La utilización de microorganismos se remonta a los tiempos de antiguas civilizaciones como los babilonios y los sumerios, estos utilizaban los microbios para la producción de bebidas alcohólicas a partir de las cebada, pan, vinagre y otros productos comunes sin comprender del todo la bioquímica de sus ingredientes (Singh *et al.*, 2016). Las enzimas se han utilizado ampliamente desde la antigüedad y en la fabricación de ciertos productos como el lino y el cuero (Gurung, 2013).

Hasta la década de 1970, la mayor parte de la aplicación comercial de las enzimas involucraba solo fuentes animales y vegetales para uso en la industria de procesamiento de alimentos. (Robinson, 2015).

Con la industrialización del proceso de fermentación se posibilitó la producción, la purificación y la caracterización a gran escala de enzimas mediante el uso de cepas seleccionadas animales, vegetales y de origen microbiano. Esto permitió la introducción de las enzimas de forma masiva en los procesos industriales (Gurung, 2013; Singh *et al.*, 2016).

En comparación con los catalizadores químicos clásicos, el uso de enzimas presenta varias ventajas marcadas sobre el uso de los catalizadores químicos clásicos; estas dirigen específicamente el curso de la reacción hacia un producto reduciendo el riesgo de reacciones

secundarias, trabajan en condiciones leves de temperatura y pH y evitan la aparición de productos tóxicos; además las enzimas pueden reutilizarse varias veces si se las inmovilizan en alguna matriz o soporte, esto reduce considerablemente el costo (Borrelli & Trono, 2015; Robinson, 2015; Rehm *et al.*, 2016).

Por otro lado, el uso de enzimas permite ahorrar energía y evita la contaminación, por lo cual es una biotecnología amigable con el medio ambiente y prometedora para estrategias ecológicas sostenibles y medidas de adaptación y mitigación frente al agotamiento de los recursos naturales así como la seguridad alimentaria y ambiental (Borrelli & Trono, 2015; Choi *et al.*, 2015).

Las enzimas de origen microbiano han ganado interés por su uso generalizado debido a su estabilidad, a que cubren una mayor variedad de actividades catalíticas y la facilidad de producción y optimización en menor tiempo que las enzimas vegetales y animales, otra de las ventajas es los microorganismos a partir de los cuales se las extraen crecen rápidamente en medios económicos con alto rendimiento, por lo que representan una fuente siempre disponibles (Borrelli & Trono, 2015; Robinson, 2015). El 50% de las enzimas utilizadas en las industrias provienen de hongos y levaduras, el 35% de bacterias, y el 15% restante proviene de plantas y animales (Liu & Kokare, 2017).

La tecnología del ADN recombinante, los avances en biotecnología como la ingeniería de proteínas y la evolución dirigida han permitido mejorar aún más los procesos de producción y comercialización de enzimas que no se podían producir anteriormente; actualmente el 90% de las enzimas industriales son versiones recombinantes obtenidas por alguna de estas técnicas, estas enzimas presentan nuevas actividades catalíticas y están adaptadas a nuevas condiciones (Gurung, 2013; Liu *et al.*, 2013; Adrio & Demain, 2014).

Las enzimas desempeñan un papel clave en numerosos productos y procesos biotecnológicos. En la industria alimentaria, se utilizan diferentes enzimas para el procesamiento de frutas y sus jugos (Ramadan, 2019), producción de jarabes, cerveza, vino y panificados (Ozatay, 2020), tanto para la producción como para mejorar la calidad de los yogures, helados, mantecas, panes, cremas y quesos (Abada, 2019); también se utilizan enzimas para el ablandamiento de carnes y obtener un mejor valor de mercado (Ozatay, 2020), en la producción de edulcorantes (Robinson, 2015), en la reutilización de los subproductos del extracto de vainilla (Rastogi & Bhatia, 2019). En la ganadería se utilizan para la industria de piensos (Adrio & Demain, 2014) y en alimentos a base de cereales para animales monogástricos enzimas como las xilanasas y las glucanasas (Ozatay, 2020). En la industria farmacéutica y médica se las usa para preparar antibióticos y otros fármacos como los las penicilinas semisintéticas y las cefalosporinas (Adrio & Demain, 2014), se utilizan como fármacos terapéuticos en problemas de salud asociados con deficiencia

enzimática y trastornos digestivos (Mane & Tale, 2015), en la eliminación de piel muerta, coágulos y quemaduras (Singh *et al.*, 2016), tratamiento de trombosis e intoxicaciones (Okafor, 2007), entre otros muchos usos más. Además, las enzimas tienen una amplia variedad de usos en los procedimientos analíticos, detección y cuantificación de sustancias incluidas las drogas; inmunodiagnósticos como los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), uso de biosensores (Robinson, 2015), entre otros. En cosmetología se utilizan superóxido dismutasa, proteasas y peroxidasa para eliminar radicales libres en las cremas para protectores solares, pasta de dientes, enjuagues bucales, ondulación y teñido del cabello (Li *et al.*, 2012). Asimismo se utilizan hidrolasas, amilasas, pectinasas, celulasas y proteasas en la fabricación de detergentes en polvo, productos de limpieza como lavavajillas, lavado de ropas, limpieza doméstica y en tratamientos enzimáticos para descomponer biopelículas cuando los agentes de limpieza estándar no dan resultados satisfactorios (Lequette, 2010; Li *et al.*, 2012; Robinson, 2015); también se utilizan enzimas como las lipasas, celulasas, glucoamilasas, amidasas, amiloglucosidasas, pectinasas, proteasas, entre otras para el tratamiento de efluentes industriales así como desechos domésticos y urbanos (Singh *et al.*, 2016; Ortellado *et al.*, 2020). Ante la preocupación mundial por el medioambiente se está comenzando a utilizar enzimas para la síntesis de polímeros biodegradables (Kadokawa & Kobayashi, 2010) que se sintetizan a partir de fuentes de carbono renovable y que después de su uso vuelven al medioambiente como CO₂ y biomasa (Hiraishi & Taguchi, 2009; Singh *et al.*, 2016). Se utilizan enzimas como medida de mitigación de los efectos adversos en el ecosistema de las industrias de papel, pulpa (Kuhad *et al.*, 2011) y de biocombustibles como el biodiesel y el bioetanol (Ríos-Fránquez *et al.*, 2019) ya que estas reducen el tiempo de procesamiento, el consumo de energía y la cantidad de productos químicos que se utilizan en las diferentes etapas del proceso (Adrio & Demain, 2014; Choudhury, 2020).

Así, las enzimas se utilizan en un amplio abanico de aplicaciones en diferentes industrias, ya sea alimentaria, textil, medicinal o cualquier otra. Con el avance de la tecnología y la ingeniería de proteínas se tiene la capacidad para introducir nuevas enzimas en los procesos industriales y responder ante la creciente demanda.

2.2 Lipasas.

2.2.1 Definición.

Las lipasas (glicerol-éster hidrolasas o triglicerol lipasas; E.C. 3.1.1.3) son enzimas que forman parte de la familia de las hidrolasas y que catalizan la hidrólisis de enlace esteres en

triacilglicéridos a gliceroles y ácidos grasos en la interfase lípido-agua. Esta hidrólisis tiene lugar a través de los pasos intermedios de formación de diacilglicéridos y monoacilglicéridos como se muestra en la **Figura 3** (Li & Zong, 2010; Geoffry & Achur 2018). Los enlaces de ésteres pueden ser hidrolizados también por esterases (Chandra *et al.*, 2020). Las lipasas se encuentran en animales, plantas, algunos protozoos, bacterias, levaduras y hongos (Li & Zong, 2010; Gopinath *et al.*, 2013).

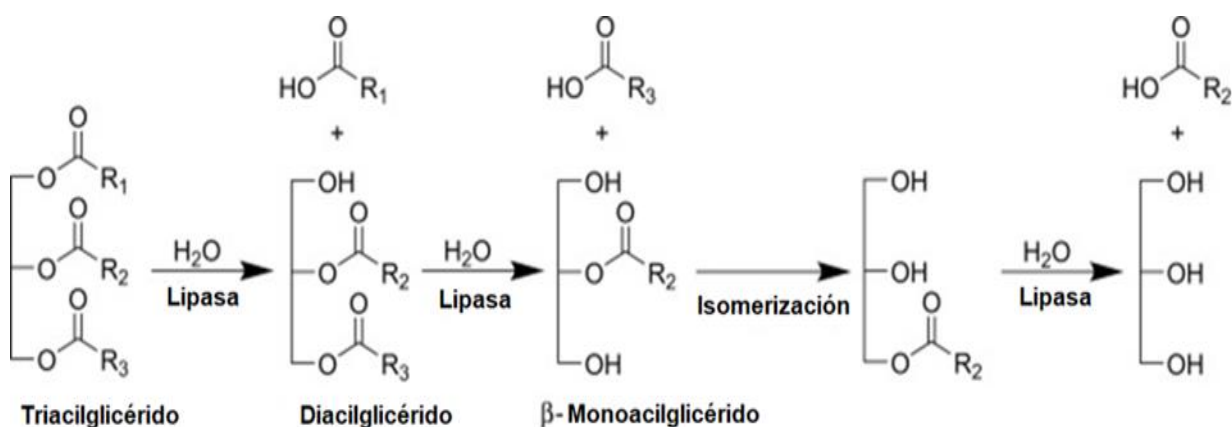


Figura 3. Hidrólisis de un triglicérido catalizada por la enzima lipasa (tomando de Cotten, 2020).

2.2.2 Clasificación de las lipasas.

Antes de clasificar las lipasas se debe prestar atención a su origen, dentro de las lipasas producidas por mamíferos se encuentran dos grades clasificaciones: 1) La familia de genes de las lipasas pancreáticas que comprenden las lipasas hepáticas, lipasas endoteliales, lipoproteína lipasa, lipasa pancreática y algunas otras y; 2) Otras lipasas que comprenden aquellas lipasas sensibles a hormonas y a sales biliares. (Borrelli & Trono, 2015).

En plantas no hay todavía una clasificación estandarizada de las lipasas aunque se las han encontrado en semillas de oleaginosas, cereales y frijoles; también se ha identificado lipasas en cloroplastos y en la savia lechosa (látex) de algunos árboles (Villeneuve, 2003; Paques & Macedo, 2006; Moussavou *et al.*, 2013).

En bacterias, de acuerdo con la clasificación de Arpigny & Jaeger, (1999) ampliada y revisada varias veces; las lipasas se encuentran divididas en siete subfamilias sobre la base de características estructurales, mecanismo de secreción y relación con otras familias de enzimas. Estas siete subfamilias están englobadas en la familia I de un total de XVI familias de enzimas lipolítica presente en estos organismos (Borrelli & Trono, 2015).

Además de la clasificación de Arpigny & Jaeger, (1999), aparece una nueva clasificación (LED – Lipase engineering database) que incluye no solo lipasas bacterianas sino también de levaduras, hongos y mamíferos. Esta clasificación está basada en la estructura de la cavidad del

oxianión: GX, GGGX e Y (**Figura 4**). Las lipasas de levaduras y fúngicas se agrupan en cinco subclases diferentes, dos en la clase GX, dos en la clase GGGX y una en la clase Y (Widmann *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2015)

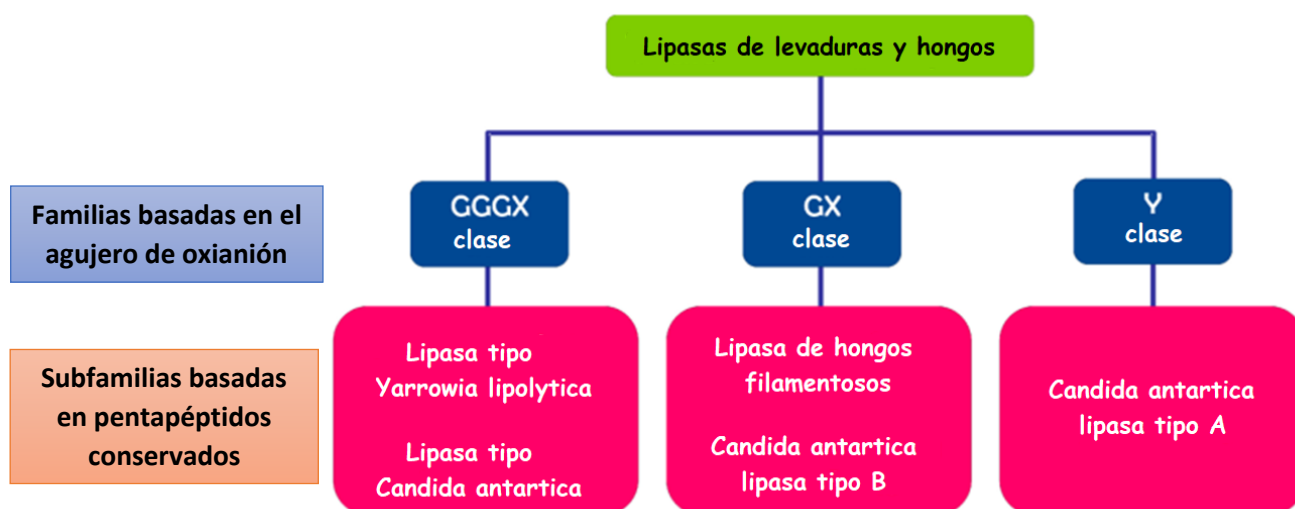


Figura 4. Clasificación de lipasas de levaduras y hongos (tomando de Gupta *et al.*, 2015 con modificaciones).

2.2.3 Estructura de las lipasas

El peso molecular de las lipasas puede variar de 19 a 60 kDa (Chandra *et al.*, 2020). A pesar de las diferencias en cuanto al tamaño y a la identidad de las secuencias; excepto por regiones alrededor de los residuos del sitio activo; las lipasas tienen un mismo patrón de plegamiento estructural que es común para otras muchas enzimas como hidrolasas, esterases, proteasas, peroxidasas y deshalogenasas (Anobom *et al.*, 2014; Borrelli & Trono, 2015).

Esta estructura que es común para varios tipos de enzimas se conoce como pliegue α/β hidrolasa. Como se muestra en la **Figura 5**, el pliegue se caracteriza por presentar una hoja central β que contiene ocho cadenas β paralelas excepto por la cadena β_2 que es antiparalela con respecto a las demás. Las cadenas β_3 a β_8 están conectadas por hélices α que se empaquetan a ambos lados de la hoja central β (Bacerio *et al.*, 2010; Anobom *et al.*, 2014; Borrelli & Trono, 2015).

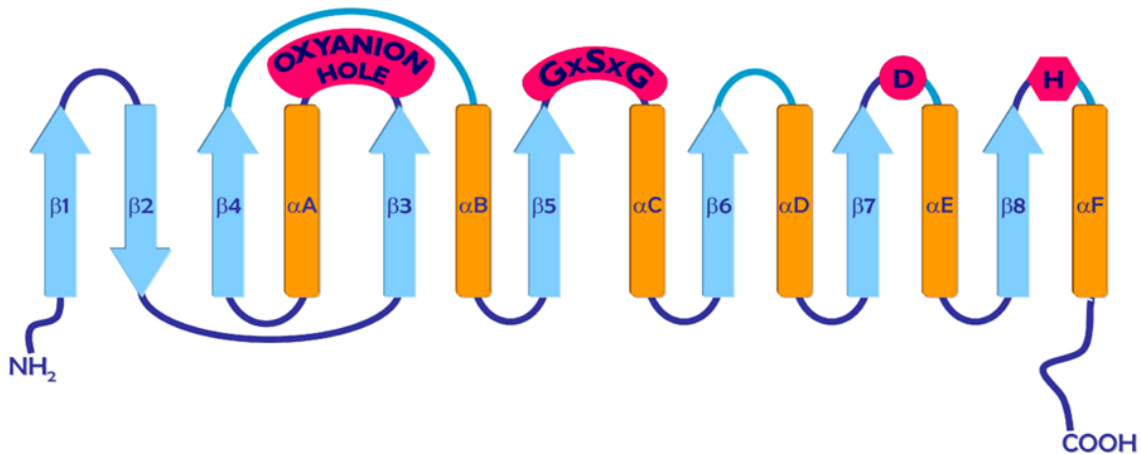


Figura 5. Estructura de α/β hidrolasa. Flechas: cadenas β ; Rectángulos: hélices α ; Líneas curvas: lazos; GxSxG: Residuo nucleófilo con la S serina; D: ácido aspártico o ácido glutámico; H: Residuo de histidina (tomando de Borrelli & Trono, 2015).

Para la expresión de las actividades de la lipasa los cofactores no son necesarios pero el calcio es el catión divalente que estimula la actividad (Chandra *et al.*, 2020). El sitio activo se encuentra dentro de un bolsillo en la hoja β central y consta de una triada catalítica altamente conservada: un residuo nucleofílico (serina, cisteína, ácido aspártico), un residuo ácido catalítico (ácido aspártico, ácido glutámico) y una histidina. En las lipasas, el residuo nucleofílico es siempre una serina, que se encuentra en el llamado “codo nucleofílico” que se identifica por el pentapéptido consenso Gly-X₁-Ser-X₂-Gly donde X puede ser un aminoácido cualquiera. Este pentapéptido forma un giro γ muy pronunciado entre la hebra β_5 y la hélice α (Anobom *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2022). El residuo ácido catalítico (aspartato o glutamato) se ubica en un bucle después de la cadena β_6 o β_7 y está unido por hidrógeno a la histidina catalítica que se encuentra en un bucle después de la cadena β_8 . Solo la histidina está completamente conservada en la tríada de las lipasas (Bian *et al.*, 2010; González-Bacerio *et al.*, 2010; Golaki *et al.*, 2015; Javed *et al.*, 2018). El sitio activo de la lipasa también presenta un gran sitio de unión hidrofóbico que acomoda la cadena del grupo ácido del enlace éster que va a ser hidrolizar (Borrelli & Trono, 2015). Además del centro activo principal, algunas lipasas presentan en su extremo C-terminal un sitio catalítico menor, este puede ser responsable de la actividad enzimática frente a sustratos hidrosolubles como los ésteres de p-nitrofenol (González-Bacerio *et al.*, 2010).

Otra estructura importante en las lipasas es la cavidad del oxianión, es un bolsillo que estabiliza los intermediarios cargados negativamente que se generan en la hidrólisis de los enlaces éster. La cavidad del oxianión consta de dos residuos que son variables según las clases GGGX; GX

o Y. En la clase GX de lipasas, el residuo es una glicina que tiene contacto con el codo nucleofílico (Borrelli & Trono, 2015; Casas-Godoy *et al.*, 2018).

El centro activo de la lipasa permanece protegido por una “lip, tapa o cubierta molecular” en forma de hélice o lazo que regula la unión con el sustrato y que está unida por un puente flexible a la estructura principal de la enzima. (González-Bacerio *et al.*, 2010; Golaki *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2022). Esta cubierta molecular está involucrada tanto en la actividad como en la selectividad de la enzima (Yaacob *et al.*, 2016). El sustrato solo puede ingresar al centro activo cuando la enzima se encuentra en su conformación activa y la cubierta abierta. La conformación nativa de la lipasa es un sistema dinámico de interconversión entre las estructuras cerradas y abiertas (**Figura 6**) (González-Bacerio *et al.*, 2010; Ugo *et al.*, 2017; Casas-Godoy *et al.*, 2018)

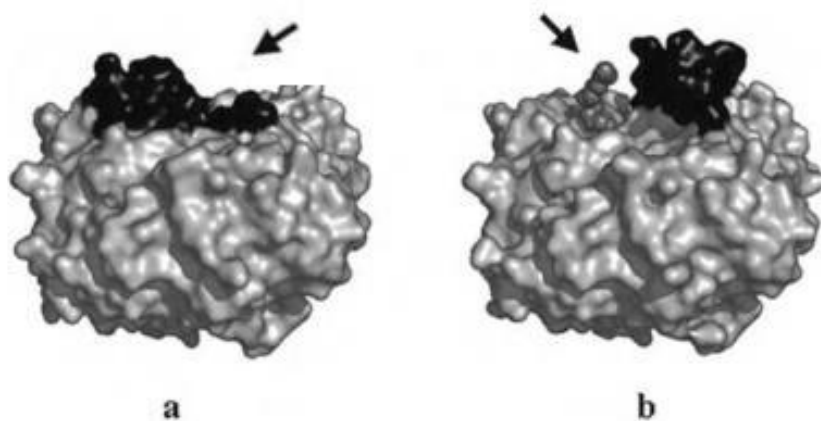


Figura 6. Cambio estructural de la lipasa: **(a)** La cubierta se encuentra cerrada y **(b)** la cubierta se encuentra abierta (tomado de Ugo *et al.*, 2017).

Cuando las lipasas están en presencia de una interfase lípido-agua, la cubierta sufre cambios conformacionales, descubriendo el sitio activo; los aminoácidos catalíticos quedan expuestos al solvente y alrededor de estos se forma la cavidad oxianiónica por exposición de residuos hidrofóbicos e internalización de otros hidrofílicos; cuando la cubierta está cerrada en ausencia de una interfaz, la enzima está inactiva ya que la entrada al sitio activo se encuentra boqueada (González-Bacerio *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2015; Casas-Godoy *et al.*, 2018). Este mecanismo de activación se conoce como interfacial y explica por qué la mayoría de las lipasas no se comportan según la cinética de Michaelis-Menten. La actividad lipasas aumenta considerablemente cuando el sustrato alcanza concentraciones suficientemente altas como para formar interfaces como micelas y sistemas emulsionados (Kapoor & Gupta, 2012; Casas-Godoy *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2022).

2.2.4 Mecanismo catalítico

El mecanismo catalítico de las lipasas consiste en tres etapas (**Figura 7**). La lipasa libre (A) se une al sustrato para formar el complejo Enzima-Sustrato ES (B).

El mecanismo comienza con una acilación, un protón es transferido entre los residuos de aspartato, histidina y serina de la lipasa, esto provoca la activación del grupo hidroxilo de la serina catalítica. El grupo hidroxilo de la serina produce un ataque nucleofílico al grupo carbonilo del enlace éster del sustrato debido a la protonación de la histidina y esta a su vez se estabiliza por el puente de hidrogeno que forma con el ácido glutámico. Los residuos de aminoácidos de la cavidad oxianiónica estabilizan el intermedio formando enlaces de hidrógeno con el oxígeno del grupo carbonilo del sustrato y los grupos $-NH$ de la cadena principal de los dos residuos de aminoácidos; esa forma se estabilizan las cargas y se reduce la energía de estado del intermedio (Anobom *et al.*, 2014; Ugo *et al.*, 2017; Casas-Godoy *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2022).

El tetraedro es rápidamente descompuesto, con la ayuda de la histidina protonada, lo que provoca la liberación del alcohol del enlace éster y la formación del complejo acil-enzima (C) (Navarro González & Periago, 2012; Ugo *et al.*, 2017).

Por último, con la liberación del alcohol del enlace éster se produce un segundo ataque nucleofílico sobre el complejo acil-enzima gracias a una molécula de agua que hidroliza el intermedio formando un nuevo intermedio tetraédrico. Esta desacilación produce la liberación del ácido graso y la regeneración del centro catalítico (D) (Navarro González & Periago, 2012; Castillo *et al.*, 2016; Casas-Godoy *et al.*, 2019).

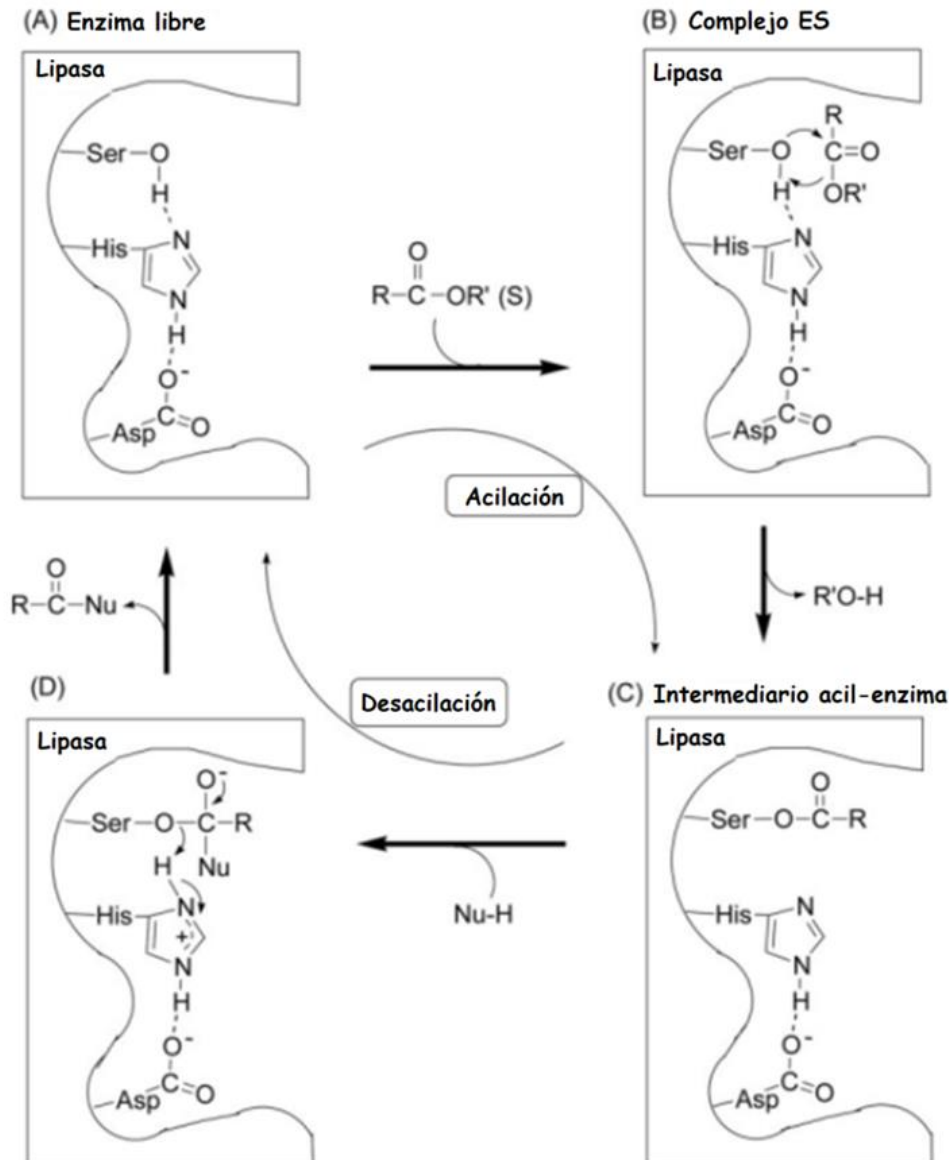


Figura 7. Mecanismo catalítico de las lipasas (tomado de Ugo *et al.*, 2017)

2.2.5 Reacciones catalizadas por lipasas

Las reacciones de hidrólisis no son las únicas reacciones catalizadas por lipasas. En condiciones favorables, las lipasas tienen la capacidad de catalizar una amplia gama de reacciones (**Figura 8**) (Castillo *et al.*, 2016). En medios acuosos, las lipasas catalizan las reacciones de hidrólisis, pero las reacciones de síntesis pueden ocurrir en medios que contienen una disponibilidad limitada de agua, como sustratos lipídicos, solventes orgánicos, líquidos iónicos, entre otros (Pereira *et al.*, 2022). La actividad del agua es la que regula el equilibrio entre reacciones directas e inversas. Bajo condiciones termodinámicas favorables, es decir con una baja actividad del agua las lipasas pueden catalizar reacciones inversas a la hidrólisis; reacciones de síntesis que se pueden clasificar en dos tipos: de esterificación así como de transesterificación (Casas-

Godoy *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2022). Dentro del primer grupo de reacciones también se incluyen las reacciones de amidación y tioesterificación (Casas-Godoy *et al.*, 2018), por otro lado, las reacciones de transesterificación incluyen reacciones de alcoholísis, acidólisis, aminólisis e interesterificación (Borrelli & Trono, 2015).

Las reacciones de hidrólisis consisten en un ataque nucleofílico a un enlace ésteres que se encuentra en los triacilglicéridos, diacilglicéridos y los monoacilglicéridos para producir ácidos grasos libres y glicerol (Castillo *et al.*, 2016). La esterificación es la reacción en la que un ácido graso se une, mediante acción enzimática, a un alcohol produciendo un éster y liberando una molécula de agua; la tioesterificación y la amidación son reacciones similares pero con un tiol o una amina como sustratos. Las reacciones de transesterificación consisten en el intercambio entre un éster y un alcohol (alcoholísis), entre un éster y un ácido (acidólisis), entre un éster y una amina (aminólisis), o entre dos ésteres (interesterificación) (Castillo *et al.*, 2016; Casas-Godoy *et al.*, 2018; Mehta *et al.*, 2018).

Las lipasas también son capaces de expresar actividades enzimáticas parecidas a fosfolipasas, colesterol esterasas, amidasas, entre otras más (Bora *et al.*, 2013), además de poder catalizar reacciones de epoxidación (Aouf *et al.*, 2014) y perhidrólisis (Castillo *et al.*, 2016).

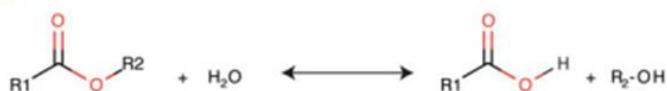
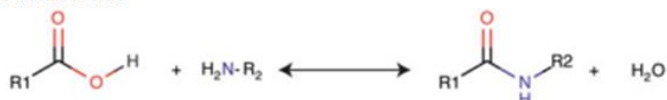
Hidrólisis**Síntesis****Esterificación****Amidación****Tioestificación****Transesterificación****Acidólisis****Aminólisis****Alcoholólisis****Interesterificación**

Figura 8. Reacciones catalizadas por lipasas (tomado de Casas-Godoy *et al.*, 2018)

2.2.6 Fuentes de Lipasas

Claude Bernard fue la primera persona que observó la acción lipolítica de las lipasas que producía el páncreas en el año 1856 (Vishnoi *et al.*, 2020). Desde entonces son notables y bien conocidas las fuentes de lipasas que incluyen animales, plantas, bacterias gram positiva y gram negativo, hongos filamentosos, levaduras y arqueas (Shamim *et al.*, 2018; Patel *et al.*, 2019; Vishnoi *et al.*, 2020). Las lipasas animales se producen a partir de las glándulas pancreáticas, generalmente de cerdo pero también de caballos y del humano, en cuanto a las lipasas de plantas se las extrae del látex de la papaya, la semilla de avena o de ricino (Andualema & Gessesse, 2012).

Independientemente de su origen y sabiendo que todas pueden catalizar la hidrólisis de los enlaces ésteres se prefiere la utilización de bacterias y hongos para la producción de lipasas debido a que la producción, comercialización y aplicación a escala industrial es más sencilla que en plantas y animales (Andualema & Gessesse, 2012; Borrelli & Trono, 2015). Otra de las razones de la utilización de microorganismos en la producción de lipasas es el enorme potencial biotecnológico de las lipasas microbianas ya que estas son estables en solventes orgánicos, no requieren cofactores, poseen una amplia especificidad de sustrato y actúan en un amplio rango de temperatura y pH además de tener una alta enantioselectividad (Andualema & Gessesse, 2012).

Se pueden encontrar microorganismos productores de lipasas en diversos hábitats, además estos tienen más habilidades de adaptación y pueden vivir en ambientes extremos como el mar muerto, los lagos alcalinos, las aguas termales, suelos contaminados incluso los polos (Chandra *et al.*, 2020).

Las lipasas bacterianas son menos diversas y su uso en las industrias es limitado, todavía se las siguen usando debido a su alto rendimiento y a la capacidad de catalizar reacciones en pH alcalinos (Vishnoi *et al.*, 2020). Normalmente, las lipasas producidas por bacterias son glicoproteínas pero algunas pueden ser de naturaleza lipoproteína. Algunos de los géneros bacterianos que producen lipasas son *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Staphylococcus*, *Chromobacterium*, *Achromobacter*, *Alcaligenes* y *Arthrobacter* (Gurung *et al.*, 2013; Liu & Kokare, 2017; Chandra *et al.*, 2020; Vishnoi *et al.*, 2020).

Las lipasas fúngicas tienen amplias aplicaciones comerciales y su uso es preferible al de bacterias por que se producen extracelularmente en el medio y se pueden aislar fácilmente convirtiendo este tipo de producción en económica, rápida, fácil y muy eficiente (Andualema & Gessesse, 2012; Gurung *et al.*, 2013; Vishnoi *et al.*, 2020). Los zigomicetes, hifomicetes y ascomicetes han sido reportados como productores de lipasas extracelular. Entre los generes productores de lipasas fúngicas podemos encontrar a *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Ashbya*, *Beauveria*, *Humicola*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Alternaria*, *Eurotrium* y *Ophiostoma* (Gopinath *et al.*, 2013; Gurung *et al.*, 2013; Liu & Kokare, 2017; Chandra *et al.*, 2020; Ortellado *et al.*, 2020). Dentro del grupo de las levaduras, podemos encontrar al género *Candida* como el más importante seguidos de *Rhodotorula*, *Pichia* y *Yarrowia* (Vishnoi *et al.*, 2020).

Actualmente en nuestra provincia se encuentran números grupos de investigación en la búsquedas de hongos y bacterias aislados en nuestra región con potenciales aplicaciones biotecnológicas como la biorremediación (Ortellado *et al.*, 2020), en procesos de pretratamiento

de caña de azúcar para la producción de combustibles de segunda generación (Barchuk, 2017), en procesos de sacarificación (Coniglio, 2017), en hidrolisis de residuos agroindustriales (Díaz, 2019).

2.3 Género *Penicillium* sp.

2.3.1 Características del género

Penicillium es un género muy diverso de hongo filamentoso perteneciente al grupo de los ascomicetes, sus especies tiene un papel muy importante en la disposición de la materia orgánica pudiendo causar serios problemas en la industria alimentaria; son alérgenos del aire, unas cuantas especies son consideradas como verdaderas fábricas de enzimas y algunas otras han sido explotadas para la producción de quesos como Camembert o Roquefort, penicilina con su aplicación en medicina, entre otras (Samson *et al.*, 2010; Visagie *et al.*, 2014).

Además, se trata de un género cosmopolita, es uno de los hongos más comunes en encontrarse en una gran variedad de hábitats desde el suelo, la vegetación y el compost en descomposición, el aire, el polvo, los ambientes interiores y las paredes de los edificios sobre todo cuando la humedad es alta, también crecen en varios alimentos secos, especias, cereales, en frutas y verduras frescas (Visagie *et al.*, 2014; Demjanová *et al.*, 2020). El nombre genérico *Penicillium* fue introducido por Link, (1809), nombre que proviene del latín y significa “cepillo”. Desde el primer reporte se han introducido más de 1000 nombres en el género, muchos con descripciones incompletas según los criterios modernos ya que en ese momento se utilizaba el concepto de especie morfológica para la clasificación e identificación. Con el comienzo de la secuenciación de ADN durante la década de 1990 muchos nombres fueron reintroducidos ya que se demostró que eran especies distintas. Estos avances condujeron a un enfoque combinado utilizando datos morfológicos y genéticos para la identificación y clasificación del género resultando así más de 300 especies descritas en la actualidad (Houbraken *et al.*, 2014; Visagie *et al.*, 2014; Perrone & Susca, 2017).

Las especies de *Penicillium* crecen mejor a temperaturas entre 5°C y 37 °C y una variación de pH entre 3 y 4,5 (Demjanová *et al.*, 2020). Muchas especies del género *Penicillium* tienen la capacidad de producir una amplia gama de metabolitos, incluidos antibióticos, agentes antivirales y micotoxinas (Perrone & Susca, 2017).

La estructura primaria del hongo consiste en filamentos tubulares, conocidos como hifas, que surgen de una sola espora reproductiva que puede llegar a formar una masa de hebras conocida como micelio; dando colonias: circulares si no hay algún impedimento para su crecimiento,

blancas, aterciopeladas, ligeramente algodonosas, se cubren de esporas y van tomando diferentes colores de acuerdo a la especie; los bordes muchas veces sin fructificación son generalmente blancos pero en algunas especies pueden ser amarillos, anaranjados, púrpuras o pardos. Luego de varios días la colonia queda completamente cubierta por esporas dando un aspecto pulverulento (Carrillo, 2003; Saif *et al.*, 2020).

Este género se caracteriza por producir conidios o fialoconidios en una estructura ramificada semejante a un pincel que termina en células conidiógenas llamadas fiálides; las ramificaciones del conidióforo se ubican formando verticilos. En la fiálides al dividirse el núcleo, se extiende el extremo apical que luego se estrangula separando la espora recién formada, generalmente una porción de pared, llamada conectivo, une entre sí a los conidios permitiendo la formación de cadenas (Carrillo, 2003). Los conidios nacen de forma basípeta, es decir el desarrollo se da desde el ápice hacia la base (Houbraken *et al.*, 2014).

Penicillium presenta conidióforos que pueden ser simples fiálides solitarias (**Figura 9a**) hasta patrones muy complejos y ramificados que dan como resultado patrones simétricos o asimétricos. Los conidióforos monoverticilados (**Figura 9b**) tienen un verticilo terminal de fiálides y en algunas especies la célula terminal del conidióforo suele estar hinchada o vesiculada pero a diferencia del género *Aspergillus*, los estípites presentan tabiques. Los conidióforos divaricados o irregulares (**Figura 9c**) tienen un patrón de ramificación simple a complejo con numerosas ramas subterminales. Los conidióforos biverticilados (**Figura 9d, e**) tienen un verticilo de tres o más métulas entre el final del estípite y las fiálides; las métulas pueden ser diferentes o iguales en longitud, pueden variar su grado de divergencia, suelen ser más o menos cilíndricas pero también pueden ser claviformes o vesiculadas. Los conidióforos terverticilados (**Figura 9f**) tienen otro nivel de ramificación entre el estípite y la métula, pudiendo ser una continuación del estípite y una rama lateral o siendo un verdadero espiral de tres o más ramas. Los conidióforos cuatriverticilados (**Figura 9g**) tienen un nivel adicional de ramificación. Los conidióforos terverticilados y cuatriverticilados tienden a ser notoriamente asimétricos. En muchas colonias sobre todo cuando tienen varios días puede haber más de un patrón de ramificación o formas intermedias. Otras características de importancia son las texturas y las ornamentaciones de la pared de los estípites y los conidios así como el color y el tamaño; las texturas de las paredes son sensibles a la composición y a la aireación del medio que se utiliza para su crecimiento. Las paredes del estípite, las ramas o las métulas pueden ser lisas, rugosas o equinuladas siendo las fiálides siempre lisas. Las fiálides pueden tener forma de ánfora o ser casi cilíndricas con la porción apical cónica. Los conidios son esféricos o

elipsoidales, lisos o rugosos, hialinos que en cantidad se observan de color verde, verde azulado, verde aceituna o gris (Carrilo, 2003; Visagie *et al.*, 2014).

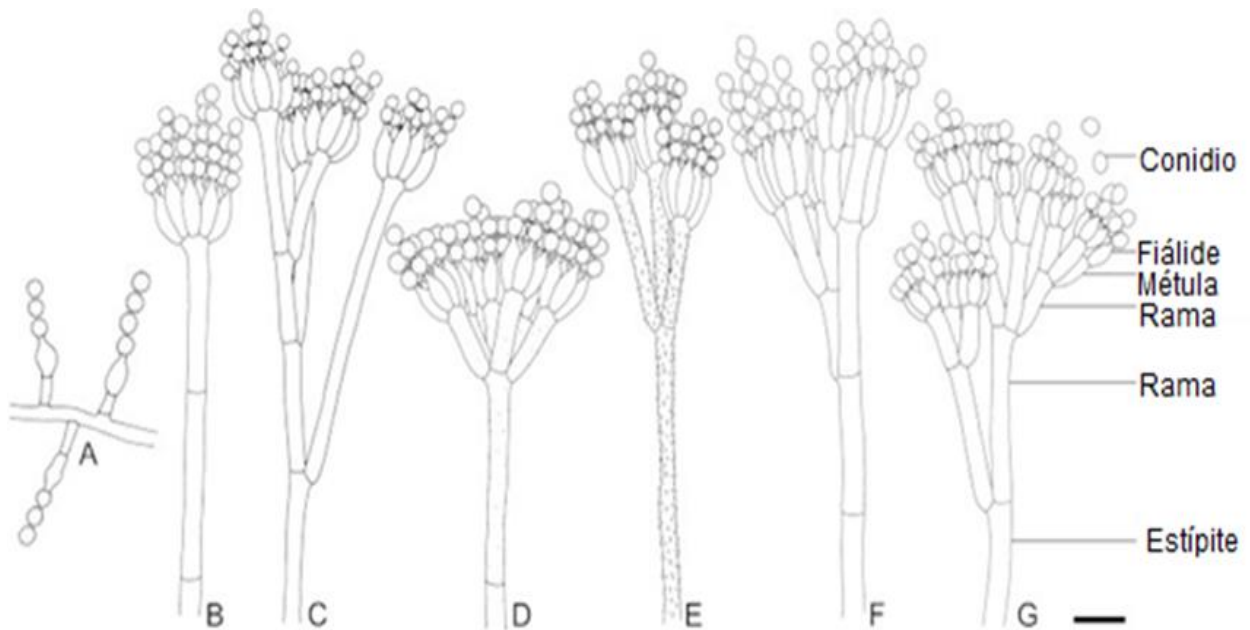


Figura 9. Patrones de ramificación de los conidióforos observados en *Penicillium*: **A.** Conidióforos con fiálides solitarias. **B.** Monoverticilado. **C.** Divaricado. **D, E.** Biverticilado. **F.** Terverticilado. **G.** Cuatriverticilados. Barra de escala = 10 μ m (tomado de Visagie *et al.*, 2014).

La secuenciación de ADN se convirtió en una herramienta más novedosa y eficaz para la taxonomía no solo para el grupo de *Penicillium*, esta herramienta abrió la posibilidad de inferir las relaciones entre las especies sin la necesidad de estandarizar los medios de cultivos y eliminó los problemas asociados al deterioro de las colonias (Visagie *et al.*, 2014). La región espaciadora transcrita interna (ITS, internal transcribed spacer) de ADN es aceptada como código de barras para los hongos (White *et al.*, 1990), esta región posibilita colocar cepas en un complejo de especies o en una de las 25 secciones, algunas veces proporciona una identificación a nivel de especie (Schoch *et al.*, 2012). Sin embargo, ITS no es lo suficientemente variable para distinguir todas las especies estrechamente relacionadas por lo que se necesita uno o más marcadores secundarios. Uno de los marcadores secundarios utilizados es el β -tubulina (BenA) (Glass & Donaldson, 1995); sin embargo BenA tiene problemas asociados, a menudo las alineaciones con este gen contienen una gran proporción de sitios alineados ambiguamente (Hubka & Kolarik, 2012). Otros posibles marcadores secundarios incluyen la calmodulina (CaM) (Hong *et al.*, 2006) o los genes de la segunda subunidad más grande de la ARN polimerasa II (RPB2) (Liu *et al.*, 1999). Ambos genes tienen un poder discriminatorio al igual que BenA y RPB2 tiene la ventaja de carecer de intrones en su amplicón, lo que permite alineaciones fáciles y robustas cuando se usa en filogenias aunque es difícil de amplificar y la

base de datos es incompleta así como para CaM. La utilización de los 4 marcadores es una buena alternativa y es una práctica común en la mayoría de los estudios que describen y caracterizan especies de *Penicillium* en conjunto con los datos morfológicos (Taylor *et al.*, 2000; Houbraken *et al.*, 2012).

2.3.2 Ubicación sistemática

Durante mucho tiempo el género *Penicillium* fue clasificado dentro del phylum Deuteromycota donde se agrupaban a los hongos imperfectos por no conocer su forma sexual. Actualmente y como resultado de los estudios filogenéticos la clasificación del género ha sido modificada hasta llegar a la siguiente clasificación (Houbraken, 2011; Hibbett *et al.*, 2018; Houbraken, 2020).

Reino: Fungi

Subreino: Dikarya

Phylum: Ascomycota

Subphylum: Pezizomycotina

Clase: Eurotiomycetes

Subclase: Eurotiomycetidae

Orden: Eurotiales

Familia: Aspergillaceae

Género: *Penicillium*

El phylum Ascomycota representa casi el 50 % de las especies de hongos conocidas hasta la fecha y representa aproximadamente el 80 % de los hongos de importancia médica. La reproducción sexual se produce con el desarrollo de meiosporas (ascosporas) producidas en un saco especializado llamado ascus. La reproducción asexual consiste en la producción de conidios. Todos los Ascomycota carecen de flagelos, exhiben mitosis intranuclear con cuerpos polares. Mayormente son hongos filamentosos con septos simples pero también existen numerosas levaduras. El phylum se divide en cuatro clases: Pneumocystidomycetes, Saccharomycetes, Eurotiomycetes y Sordariomycetes (Kumar *et al.*, 2011; Healy *et al.*, 2013; Hibbett *et al.*, 2018; Murray *et al.*, 2021).

Dentro de la clase Eurotiomycetes se encuentran un grupo de hongos muy diversos en cuanto a la morfología y a la ecología. La reproducción sexual conduce a la formación de un saco de paredes delgadas, o ascus, que contiene las ascosporas haploides. En el grupo se encuentran diferentes tipos de ascomas siendo el cleistotecioide el más común pero también apotecioide y peritocioide (Prieto *et al.*, 2021). Actualmente, se acepta que Eurotiomycetes comprende cinco subclases: Chaetothyriomycetidae, Coryneliomycetidae, Eurotiomycetidae,

Mycocaliciomycetidae y Sclerococomycetidae (Hibbett *et al.*, 2007; Murray *et al.*, 2021; Prieto *et al.*, 2021).

En la subclase *Eurotiomycetidae*, los ascos suelen ser evanescentes, a veces bitunicados, dispersos por todo el ascoma sin elementos de hamatecio y con ocho ascosporas (Hibbett *et al.*, 2007). La mayoría son especies saprofitas y algunos pueden producir metabolitos tóxicos. También se conocen hongos patógenos de vertebrados (Prieto *et al.*, 2021).

Dentro del orden *Eurotiales* se encuentran los hongos que se reproducen casi exclusivamente por reproducción asexual. A pesar de que muchas especies que no tienen ascos ni ascosporas, todavía se pueden encontrar un número considerable de especies con ciclos de vida convencionales. Estas especies presentan una gran diversidad de tipos de cleistotecios (Murray *et al.*, 2021).

La clasificación de los Eurotiales a nivel de familia y género se basó tradicionalmente en caracteres fenotípicos, y desde entonces la clasificación ha sido cuestionada innumerables veces utilizando caracteres moleculares (Houbraken *et al.*, 2020). Dentro del orden Eurotiales encontramos cinco familias: tres de ellas (Aspergillaceae, Trichocomaceae, Thermoascaceae) resultaron de la división de la familia Trichocomaceae (Houbraken & Samson, 2011); Elaphomycetaceae y la nueva familia Penicillaginaceae fue introducida por Houbraken en 2020. *Aspergillus* y *Penicillium* son dos de los 15 géneros que se agrupan dentro de la familia Aspergillaceae (Houbraken *et al.*, 2020). Filogenéticamente, estas especies están estrechamente relacionadas. Tanto *Aspergillus* como *Penicillium* se caracterizan por fiálides cilíndricas o en forma de matraz y los conidios nacen de forma basípeta (Houbraken *et al.*, 2014).

2.4 Lipasas producidas por *Penicillium*

2.4.1 Producción de lipasas

Las especies de *Penicillium* son buenos productores de enzimas extracelulares como ser: lipasas, esterases, proteasas, celulasas y xilanasas (Li & Zong, 2010). *P. camembertii*; *P. chrysogenum*; *P. crustosum*; *P. griseofulvum* y *P. roqueforti* son algunas de las especies más utilizadas para la producción de lipasas con fines industriales (Mase *et al.*, 1995; Yadav *et al.*, 1998; Di Lucio *et al.*, 2004; Bancarz *et al.*, 2005; Li & Zong, 2010;).

Las lipasas extracelulares tienen la ventaja de ser liberadas al medio siendo mucho más fácil su recuperación y purificación en comparación con las lipasas intracelulares (Vishnoi *et al.*, 2020). Estas se pueden obtener por fermentación en estado sólido (SSF) o por fermentación aeróbica sumergida (SmF).

Ciertos procesos de fermentación como la producción de etanol no se realizan por SmF pero sí por fermentación en estado sólido (SSF) entendido como un sistema en el cual el crecimiento del microorganismo ocurre en un material no soluble que actúa tanto como soporte físico como fuente de nutrientes en ausencia de un líquido que fluya libremente (Sharma *et al.*, 2016). La fermentación en estado sólido (SSF) muestra un enorme potencial en la producción industrial de enzimas microbianas como una opción de bajo costo y bajo consumo de energía pero sobre todo por el alto rendimiento que se obtiene, por la alta actividad del producto y porque tiene un bajo requerimiento de agua y no libera grandes cantidades de efluentes (Doriya *et al.*, 2016; Sharma *et al.*, 2016).

Desde la aparición de la fermentación aeróbica sumergida (SmF) en el siglo XX se ha convertido en una tecnología modelo para producción de fermentados debido a sus ventajas. Aproximadamente el 90% de las enzimas que son producidas industrialmente lo hacen por esta técnica (Li & Zong, 2010). Esta técnica consiste en un método de cultivo de microorganismos en medios líquidos. Para la producción industrial el cultivo se realiza en recipientes cerrados, llamados birreactores, que contienen el caldo de los nutrientes. El uso de birreactores permite el suministro de oxígeno según lo requiera el microorganismo (Ouedraogo & Tsang, 2021). Dentro de las ventajas de esta técnica están la capacidad de monitorear y controlar diferentes parámetros como el pH, temperatura, viscosidad, oxígeno disuelto, formación de espuma, formación de biomasa, utilización de sustratos y la formación del producto deseado además este método presenta una mejor circulación de oxígeno, se logra una mejor transferencia de calor y masa con una mejor difusión de microorganismos (Doriya *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2019; Melani *et al.*, 2020; Ouedraogo & Tsang, 2021). Parámetros como la fuente de carbono y nitrógeno, temperatura, pH, agitación, inductores y volumen de medio son importantes a la hora de optimizar las condiciones de fermentación (Liu & Kokare, 2017).

La producción de lipasas varía mucho según la naturaleza de la cepa fúngica, la composición del medio y los factores fisicoquímicos como la temperatura, el pH y el oxígeno disuelto (Geoffry & Achur, 2018). Los hongos filamentosos descomponen materiales en el medio natural que contienen grandes cantidades de carbono y nitrógenos que son útiles para su supervivencia por lo que es fundamental para el crecimiento de estos una fuente de carbono y nitrógeno presente en el medio de cultivo (Pacheco *et al.*, 2015).

El factor principal requerido para la expresión de la actividad de las lipasas siempre han sido las fuentes de carbono lipídicas como el aceite de oliva, tweens, aceite de maíz, etc. debido a que las lipasas son enzimas inducibles, requieren la presencia de una fuente de lípidos para su síntesis tras la inducción (Bindiya & Ramana, 2014; Balaji *et al.*, 2020). Las fuentes de carbono

comúnmente utilizadas son el aceite de oliva (Darvishi & Hosseini, 2015; Yong *et al.*, 2016), triacilgliceroles (Gupta *et al.*, 2004), aceite de palma, aceite de canola, aceite de maíz (Yong *et al.*, 2016), aceite de coco (Darvishi & Hosseini, 2015), aceite de soja (Cesário *et al.*, 2021), aceite de girasol (Hatice *et al.*, 2021), aceite de maní, aceite de sésamo (Das *et al.*, 2017). Yong *et al.*, (2016) demostraron que el aceite de oliva es el mejor inductor de lipasas en comparación con otros aceites. Actualmente nuestro grupo de trabajo ha determinado el potencial lipolítico de varias cepas pertenecientes al género *Penicillium* aislado en la provincia de Misiones usando como fuente de carbono aceite de oliva (Ortellado *et al.*, 2020).

La utilización de carbohidratos como fructosa, glicerol, xilosa, sacarosa, lactosa, maltosa, galactosa y manitol en los medios de cultivo indican poca o ninguna diferencia en la producción de lipasas fúngicas. Se ha documentado el efecto potenciados de la glucosa en la actividad y expresión de las lipasas en algunas cepas así como también la mezcla de sustratos (Geoffry & Achur, 2018).

La síntesis de lipasas fúngicas requiere factores como vitaminas y aminoácidos que se metabolizan a partir de las fuentes de nitrógeno. Por ese motivo, las fuentes de nitrógeno son esenciales para la producción, sobre todo aquellas de naturaleza orgánicas ya que presentan un gran efecto potenciador en la actividad lipolítica (Geoffry & Achur, 2018). Algunas de las fuentes de nitrógeno más usadas en la producción de lipasas son nitrato de sodio (Oliveira *et al.*, 2016), cloruro de amonio (Das *et al.*, 2017), peptona y extracto de levadura (Colla *et al.*, 2016), sulfato de amonio (Lima *et al.*, 2003), urea (Geoffry & Achur, 2018).

Parámetros como la fuente de carbono y nitrógeno, temperatura, pH, agitación, inductores (aceites en la mayoría de los casos) y volumen de medio son importantes a la hora de optimizar las condiciones de producción (Liu & Kokare, 2017; Geoffry & Achur, 2018). Durante varios años y en todo el mundo, los científicos han realizados grandes esfuerzos para optimizar la producción de lipasas de origen fúngicas mediante el estudio de la influencia del medio de producción con el objetivo de lograr un mayor rendimiento (Treichel *et al.*, 2010). A pesar de los avances logrados el costo de producción de lipasas continua siendo muy grande con una eficiencia moderada (Yong *et al.*, 2016). Por lo tanto, es de vital importancia de conocer y explorar a fondo la influencia de los parámetros fisicoquímicos en la producción de lipasas con el fin de obtener buenos rendimientos y abaratar los costes de la producción (Geoffry & Achur, 2018).

2.5 Aplicaciones de las lipasas fúngicas

La amplia variedad y diversificación de las propiedades enzimáticas, las condiciones de pH, temperatura, del medio así como la especificidad de sustrato es lo que hacen de las lipasas fúngicas muy atractivas para las aplicaciones industriales (**Figura 10**). Estas constituyen un grupo importante de enzimas importantes biotecnológicamente debido a la versatilidad de sus propiedades y la facilidad de la producción en cantidades mayores. Las aplicaciones industriales de las lipasas fúngicas han sido ampliamente reportadas (Hasan *et al.*, 2006; Thakur, 2012; Horchani *et al.*, 2012; Kapoor & Gupta, 2012; Ray, 2015; Mehta *et al.*, 2018).



Figura 10. Aplicaciones de las lipasas fúngicas (tomado de Nimkande *et al.*, 2022).

2.5.1 Industria alimentaria.

Las grasas y los aceites son constituyentes importantes de una gran variedad de alimentos y su modificación es una de las principales áreas en la industria de procesamiento (Gupta *et al.*, 2003). La mayoría de las lipasas comerciales producidas se utilizan para el desarrollo del sabor en productos lácteos y el procesamiento de otros alimentos, como carne, verduras, frutas, alimentos horneados, productos lácteos y cerveza (Farahat *et al.*, 1990; Nagodawithana & Reed, 1993; Mehta *et al.*, 2018).

Algunas de las aplicaciones a gran escala de las lipasas fúngicas se pueden encontrar en los productos lácteos, estas se utilizan para hidrolizar la grasa de la leche, en la maduración de los quesos, modificación de las grasas de la mantequilla, en el desarrollo de agentes saborizantes en leche, quesos y manteca (Sharma *et al.*, 2001). Las lipasas de *Aspergillus niger*, *Rhizopus*

oryzae, *Candida cylindracea* se han utilizado en productos de panadería para el mejoramiento del sabor (Buisman *et al.*, 1998) y las obtenidas de *Mucor meihei*, *A. niger* y *A. oryzae* han sido desarrollados para la industria de fabricación de queso. La lipasa sintetizada a partir de *Penicillium roquefortii* es en gran parte responsable del desarrollo del sabor característico del queso azul (Nelson, 1970; Kinsella & Hwang, 1976). Las aplicaciones a gran escala de las lipasas en la industria se pueden encontrar no solo en los productos lácteos e industria de la panificación, sino también para la producción de margarinas libres de ácidos grasos trans, en la mejora de los aromas de bebidas como el vino y el sake, en la transesterificación de alimentos saludables, en productos cárnicos y en pescados para el desarrollo del sabor y en la eliminación de grasas mejorando la calidad de los alimentos (Sharma *et al.*, 2001; Valero *et al.*, 2013; Borrelli & Trono, 2015; Zork *et al.*, 2016).

2.5.2 Industria textil

En la industria textil las lipasas se utilizan para ayudar a la tela a tener una mejor absorbencia para así también mejorar la uniformidad del teñido. El uso de la lipasa fúngica en la industria textil es cada vez más importante. Las lipasas se utilizan para ayudar a eliminar los lubricantes de apresto con el fin de proporcionar a la tela una mejor absorbencia para mejorar la uniformidad en el teñido. Las preparaciones comerciales utilizadas para el desencolado (ablandamiento de telas) de la mezclilla (denim, jean o tela vaquero) y otras telas de algodón contienen enzimas lipasas en conjunto con alfa amilasas que procesan el almidón de maíz (Rowe *et al.*, 2001; Hasan *et al.*, 2006; Mehta *et al.*, 2018).

2.5.3 Industria de detergentes

Las lipasas fúngicas se utilizan principalmente como aditivos en detergentes de ropa industrial y en detergentes domésticos. Se estima que se agregan 1000 toneladas de lipasas a los aproximadamente 13 mil millones de toneladas de detergentes que se producen cada año (Mehta *et al.*, 2018).

Las lipasas de *Thermomyces* sp. son las más importante en esta industria desde hace varios años (Gillis, 1998). Una nueva lipasa termoactiva y alcalina del hongo *Talaromyces thermophilus* mostró gran resistencia a pH alcalino y una alta tolerancia a varios surfactantes, oxidantes y agentes de lavado comerciales. Por lo tanto, esta enzima podría considerarse como un candidato prometedor para futuras aplicaciones industriales, principalmente procesos de limpieza (Romdhane *et al.*, 2010).

Las otras aplicaciones de los detergentes se encuentran en el lavado de platos, en una composición blanqueadora (Nakamura & Nasu, 1990), descomposición de contaminantes lipídicos en solventes de limpieza en seco (Abo, 1990), limpiador de cuero líquido (Kobayashi, 1989), limpieza de lentes de contacto (Bhatia, 1990).

2.5.4 Aplicaciones médicas

Las lipasas muestran un gran potencial en la medicina, desde su uso en terapia de sustitución, como agentes digestivos (Loli *et al.*, 2015), como activadores del factor de necrosis tumoral y, por lo tanto, usadas en el tratamiento de tumores malignos (Kato *et al.*, 1989) como también en el tratamiento de trastornos gastrointestinales, dispepsias, manifestaciones cutáneas de alergias digestivas (Park & Rew, 2015). La lipasa de *Candida rugosa* inmovilizada sobre un soporte de nailon se ha utilizado para sintetizar lovastatina, un fármaco que reduce los niveles de colesterol sérico (Yang *et al.*, 1997; Chandra *et al.*, 2020).

2.5.5 Productos cosméticos

Después de la industria alimentaria y farmacéutica tienen un gran valor de mercado en cosmética y perfumería. Las lipasas tienen una aplicación potencial porque muestran actividades en los tensioactivos y en la producción de aromas (Metzger & Bornscheuer, 2006). Se han utilizado lipasas para la transesterificación con lipasas de varias fuentes microbianas en la preparación de ingredientes importantes que forman parte de fragancias en la industria del perfume (Izumi *et al.*, 1997). Las lipasas se utilizan en la preparación para la ondulación del cabello (Gurung *et al.*, 2013), como ingredientes de cremas tópicas (Singh *et al.*, 2016) como biocatalizadores en productos como cremas para la piel, bronceadores, aceites de baños, etc. (Mouad *et al.*, 2016).

2.5.6 Producción de biodiésel

La producción de biodiésel ha aumentado considerablemente en la última década desde aproximadamente 950 litros en 2000 a casi 17.000 millones de litros en 2010 con la Unión Europea como el principal productor mundial, representando el 53% de la producción mundial de biodiésel (Eryilmaz *et al.*, 2016). En 2000, el biodiésel representó alrededor del 5 % de la producción mundial de biocombustibles y en 2011 la participación del biodiésel representó alrededor del 20 % de la producción total de biocombustibles (Eryilmaz *et al.*, 2016).

El biodiesel, también llamado biocombustible, es un grupo de ésteres producidos por una reacción de transesterificación entre ácidos grasos y un alcohol en presencia de un catalizador. Las lipasas tienen la capacidad de catalizar el proceso de transesterificación y convierten los ácidos grasos y los alcoholes de cadena corta en metanol (Javed *et al.*, 2018; Vishnoi *et al.*, 2020). La producción de biodiesel a partir de desechos y aceites vegetales no comestibles reduce en gran medida el costo de producción de biodiesel, reduce la contaminación y recicla el aceite usado (Narwal & Gupta, 2013; Gashaw *et al.*, 2015; Chandra *et al.*, 2020).

La mayoría de las lipasas de levaduras y hongos involucradas en la producción de biodiésel son *A. niger*, *C. antarctica*, *C. rugosa*, *R. miehei*, *R. oryzae* y *Thermomyces lanuginose* (Fan *et al.*, 2012).

2.5.7 Biorremediación

La biorremediación es una nueva aplicación biotecnológica para la eliminación de desechos y una enzima que se puede usar es la lipasa, particularmente en el tratamiento de aguas residuales (Dauber & Boehnke, 1993; Chandra *et al.*, 2020). Las especies pertenecientes a los géneros *Trichoderma*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Mortierella*, *Beauveria* y *Engyodontium* son algunos ejemplos de los hongos que recientemente se han descrito como tolerantes a una variedad de contaminantes y se indican como posibles agentes de biorremediación en el suelo y aguas (Islam & Datta, 2015).

Lipasas de algunas de estas especies son utilizadas para degradar los derrames de petróleo en ambientes costeros mejorando la restauración ecológica (Gopinath *et al.*, 1998), como también para la degradación de películas en suelos contaminados y de hidrocarburos poliaromáticos (Jecu *et al.*, 2010; Mahmoud *et al.*, 2015; Mauti *et al.*, 2016).

2.5.8 Otros Usos

Las enzimas lipolítica también se utilizan en otras industrias como la del papel o la del cuero. Las lipasas se utilizan para eliminar la brea, la fracción lipídica de la madera que interfiere en la elaboración de la pasta de papel y en la eliminación de manchas de lípidos durante el reciclaje del papel y para evitar la formación de materiales pegajosos (Horchani *et al.*, 2012; Gurung *et al.*, 2013).

En la industria del cuero, las lipasas se han utilizados en operaciones de remojo, depilado, rendido y desengrasado en la fabricación de cuero. Los cueros y pieles contienen proteínas y grasas en las fibras de colágeno que deben eliminarse antes de curtirlos. Las lipasas degradan

específicamente la grasa y no dañan el cuero en sí por lo cual estas representan el mejor método de eliminación de grasa con el menor impacto ambiental (Choi *et al.*, 2015; Choudhury, 2020).

2.6 Micorremediación de aguas residuales

La micorremediación es el uso de hongos para degradar o remover toxinas del ambiente, en los últimos años ha atraído a la comunidad científica debido a su potencialidad para su aplicación tanto en suelos como en aguas contaminadas (Ktata *et al.*, 2020).

La contaminación del agua por aceite es un caso típico de las aguas residuales procedentes de procesos industriales. La descarga del agua contaminada con aceite contribuye a la polución del medio ambiente. Consecuentemente, las normas sobre los niveles de contaminación son cada vez más estrictas. En muchos procesos industriales se utilizan detergentes y productos de limpieza a presión que generan mezclas de aceite y agua (Sharma *et al.*, 2016).

La liberación de aceites y grasas al medio acuático, como sustancias hidrófobas de menor densidad, además de provocar un impacto estético, aportan otros contaminantes como la elevada DQO que en gran medida afectan al intercambio gaseoso. Así, estas sustancias una vez entran al medio acuático, se difunden a la superficie reduciendo la oxigenación a través de la interfase aire-agua y la actividad fotosintética, ya que absorbe la radiación solar, disminuyendo así, además, la producción interna de oxígeno disuelto (Ramalho, 2021).

El vertido de aceites usados en los cursos de aguas deteriora notablemente la calidad de las mismas, al ocasionar una capa superficial que impide la oxigenación de las aguas y produce la muerte de los organismos que las pueblan. Los aceites no se disuelven en el agua, no son biodegradables, forman películas impermeables que impiden el paso del oxígeno y matan la vida tanto en el agua como en tierra, esparcen productos tóxicos que pueden ser ingeridos por los seres humanos de forma directa o indirecta (Ramalho, 2021).

Las industrias se están centrando en la gestión de residuos de lípidos dada a la importancia en la conservación del medio ambiente. Debido a las limitaciones de los métodos fisicoquímicos, como la formación de subproductos peligrosos, el alto costo, el mayor requerimiento de energía, la preferencia se desplaza hacia el tratamiento biológico de aguas residuales para la eliminación de lípidos. La lipasa es una de las enzimas eficaces para la eliminación de lípidos de las aguas residuales. Las lipasas consumen poca energía, no requieren condiciones severas ni productos químicos y tienen una especificidad de sustrato variada (Ribeiro *et al.*, 2011). Varias lipasas tienen otras características deseadas, como estabilidad en condiciones extremas y fácil producción.

Las lipasas tampoco requieren cofactor para sus reacciones, lo cual es una ventaja para las reacciones in vitro (Chandra *et al.*, 2020). La lipasa microbiana también puede ayudar en la producción de diferentes productos de valor agregado a partir de lípidos de desecho. Se proyecta que la lipasa sea la mejor opción para la producción de bioenergía a partir de desechos de alimentos y aguas residuales debido a su capacidad para tolerar una variedad de solventes y temperaturas. Además, la lipasa es prometedora para la digestión anaeróbica de desechos que contienen lípidos, lo que produce biogás en una cantidad significativa.

La lipasa es útil para superar los problemas de bloqueo planteados por las grasas de la leche que se cuajan en las aguas residuales lácteas. Se ha demostrado que la disminución de DQO y DBO en los desechos lácteos se debió a la degradación de las grasas por microbios productores de lipasa. Tsuji *et al.*, 2013 estudió la lipasa termotolerante y tolerante al pH de la cepa de levadura antártica *M. blollopis* sk4. La cepa presentó una tasa de eliminación de DBO 1,25 veces mayor y su lipasa se mantuvo estable en un amplio rango de temperatura (10°C a 65°C) y rango de pH (4–10). Se recomendó para el tratamiento de aguas residuales de productos lácteos para reducir las grasas de la leche. Mientras que la enzima lipasa de *Aeribacillus pallidus* mostró una termoestabilidad (65°C), estabilidad del pH (pH 10), tolerancia al halo, estabilidad del solvente (50 % de estabilidad durante 2 h), y se recomendó para la eliminación de aceite de las aguas residuales (Ktata *et al.*, 2020). Rigo *et al.*, 2012 emplearon la micorremediación de aguas residuales que contienen lípidos procesadas de la industria de procesamiento de carne para ello utilizaron 0,1 y 5% de lipasa comercial con un contenido de FOG de 250 mg/L y 5000 mg/L, que mostraron resultados prometedores con el proceso de pretratamiento.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

Aislamientos de hongos de la Provincia de Misiones (Argentina) del Género *Penicillium* secretan lipasas que reúnen condiciones adecuadas para su aplicación en biorremediación de aguas ricas en lípidos.

3.2 Objetivo general

Caracterizar lipasas producidas por aislamientos del Género *Penicillium* y evaluar su potencial aplicación en el proceso de biodegradación de aguas residuales ricas en lípidos.

3.3 Objetivos específicos

De acuerdo con el objetivo general planteado, se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. Seleccionar aislamientos del género *Penicillium* sp. de la Provincia de Misiones secretores de lipasas y determinar el potencial lipolítico.
2. Optimizar las variables de producción de lipasas.
3. Realizar la caracterización bioquímica de lipasas presentes en la cepa seleccionada.
4. Evaluar la prospección biotecnológica de la enzima lipasa producida para la biodegradación de aguas residuales ricas en lípidos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Selección de hongos aislados de Misiones productores de lipasas

4.1.1 Organismos utilizados

Para la selección semicualitativa de los aislamientos con mayor habilidad lipolítica se trabajó con una colección de 20 aislamientos del género *Penicillium*: LBM 064, LBM 067, LBM 068, LBM 069, LBM 070, LBM 071, LBM 073, LBM 075, LBM 076, LBM 077, LBM 078, LBM 079, LBM 080, LBM 081, LBM 082, LBM 083, LBM 085, LBM 086, LBM 088, LBM 089.

Todos los aislamientos se caracterizaron a nivel de género mediante características macro y microscópicas por nuestro grupo y se depositaron en la colección del Laboratorio de Biotecnología Molecular (BioTecMol), Instituto de Biotecnología Misiones (InBioMis) “María Ebe Reca”, Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales (FCEQyN), de la Universidad Nacional de Misiones (UNaM) que fueran colectados a partir de frutas en pudrición de zonas naturales de Misiones (Zini, 2013).

Los aislamientos se mantuvieron mediante siembras periódicas en placas de Petri de 60 mm de diámetro y tubos de 1,5 mL y de 15 mL conteniendo medio MEA (extracto de malta 12,7 g/L, agar 15 g/L), incubadas a 28°C en forma estática el tiempo necesario para su desarrollo y conservadas a 4°C.

4.1.2 Screening semicuantitativo de aislamientos productores de lipasas en medios sólidos

Para determinar semicuantitativamente los mejores aislamientos con habilidad lipolítica, se realizaron ensayos en medio de cultivo sólido conteniendo un sustrato indicativo de la actividad lipasa.

Para realizar estos ensayos primero los aislamientos se reactivaron en medio sólido MEA (extracto de malta 12,7 g/L, agar 15 g/L) y se incubaron a 28°C por 6 días. Al cabo de este periodo, se cortaron asépticamente tacos de agar cubiertos de micelio joven de cada aislamiento (5 mm²) y se colocaron al centro de las placas de Petri de 90 mm de diámetro conteniendo agar 1%, caldo nutritivo 0,8%, aceite de oliva 1%, rodamina B 0,0001% (p/v) (Kouker & Jaeger, 1987). Luego se incubaron durante 6 días a 28 ± 1°C y la actividad se detectó utilizando un transiluminador. La presencia de halos de fluorescencia de color naranja bajo luz UV (λ350 nm), denotó la presencia de actividad lipasa.

Los diámetros de las colonias y los halos de hidrólisis se midieron utilizando un calibre y se expresaron en mm.

El índice de actividad lipasa (I_{AL}) se determinó con la siguiente ecuación:

$$I_{AL} = dc/dh$$

Donde, dc: diámetro de la colonia, dh es el diámetro del halo de hidrólisis.

Este índice permite obtener una primera aproximación del nivel de actividad de lipasa de cada aislamiento. El mismo puede tomar valores que van de 0 a 1, correspondiendo aquellos más próximos a 0 a niveles máximos de actividad enzimática. Inversamente, aquellos índices con valores próximos a 1 indicaron un bajo nivel en dicha actividad. Los aislamientos que presentaron índices próximos a 0 y menores a 0,65 se seleccionaron para continuar con los estudios.

4.2 Identificación molecular de los aislamientos seleccionados por su actividad lipolítica

4.2.1 Extracción de ADN

Los aislamientos seleccionados LBM 068, LBM 069, LBM 070, LBM 073, LBM 079, LBM 081, LBM 088 se reactivaron en placas con medio sólido MEA incubándose durante 6 días a 28°C. Luego, se cortaron asépticamente tacos cubiertos de micelio joven, se colocaron en tubos de ensayos con 15 mL de medio líquido YES (del inglés *Yeast Extract Sucrose*) con extracto de levadura 15 g/L y sacarosa 30 g/L y se incubaron durante 2 días a 28 ± 2 °C. A partir del micelio crecido se extrajo el material genómico siguiendo el protocolo propuesto por Fonseca *et al.*, (2015). El ADN se cuantificó en base a los niveles de absorbancia a 260 nm, considerando que 1 unidad de absorbancia equivale a una concentración de 50 µg/mL de ADN. Por otro lado, la calidad y la pureza del ADN se comparó mediante la relación A260/A280. La integridad del ADN genómico se evaluó por medio de electroforesis en gel de agarosa como se describe en la sección 4.2.3. El ADN genómico extraído se conservó en *freezer* a -20 °C.

4.2.2 Obtención de las secuencias de interés

Se amplificaron tres regiones del ADN de interés mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*). La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 20 µL conteniendo solución tampón de PCR (5 mM KCl y 10 mM Tris-HCl pH 8,4), dNTPs 200 µM, MgCl₂ 2,5 mM, cebadores sentido y antisentido 10 pmol por reacción de cada uno, Taq polimerasa 0,5 U y ADN genómico 50 ng. Las secuencias amplificadas fueron las regiones espaciadoras transcritos internos del ADN ribosómico (ITS, del inglés *Internal Transcribed Spacer*), regiones de los genes β-tubulina (Bt), calmodulina (CMD) y una región del gen que codifica para la subunidad 2 de la ARN polimerasa (RPB-2). Los cebadores universales que se utilizaron para amplificar estas regiones génicas se seleccionaron a partir de una búsqueda bibliográfica adecuada al género de estudio (**Tabla 2**).

Tabla 2. Cebadores utilizados en la amplificación de diferentes regiones para la identificación de los aislamientos seleccionados.

Región amplificada	Cebadores	Secuencias (5´-3´)	Referencia
ADNr ITS1-5,8-ITS2	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White <i>et al.</i> , 1990
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
Bt, exones 3,4,5, región parcial del 6	Bt2a	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	Glass & Donaldson, 1995
	Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	
RPB-2, subunidad 2 de la ARN polimerasa	5F	GAY GAY MGW GAT CAY TTY GG	Liu <i>et al.</i> , 1999
	7CR	CCC ATR GCT TGY TTR CCC AT	
CMD, exones 2,3,4, región parcial del 5	CMD5	CCGAGTACAAGGARGCCTTC	Hong <i>et al.</i> , 2005
	CMD6	CCGATRGAGGTCATRACGTGG	

Los ciclados de PCR consistieron en una etapa inicial de 4 min a 94 °C, seguida por 30 ciclos de 94 °C, 52 o 55 °C según los cebadores utilizados por 40 s y 72 °C por 40 s y una etapa final de 10 min a 72 °C. Los cebadores ITS, con una Tm de 52°C; los demás cebadores con una Tm de 55 °C.

Las amplificaciones se separaron y corroboraron mediante electroforesis de geles de agarosa 2% (p/v) como se describe posteriormente (4.2.3). Se utilizó como referencia el marcador de peso molecular *qLadder* 1000 pb Precision (Productos Bio-Lógicos, S.A.).

4.2.3 Electroforesis en geles de agarosa

Los geles de agarosa se prepararon en *buffer* Tris base-ácido bórico-ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (*buffer* TBE) 0,5 X. Los geles de agarosa 1 % (p/v) se utilizaron para la separación de ADN genómico mientras que los geles de agarosa 2 % (p/v) se usaron para la separación de las amplificaciones por PCR. La electroforesis se realizó a 100 V por 30 min usando como *buffer* de corrida TBE 0,5 X. Los geles se tiñeron con *Gel Red* (Biotium, 10000 X) siguiendo las instrucciones del fabricante, se visualizaron bajo luz ultravioleta (UV) y se fotografiaron con cámara digital Canon *Power Shot* G10.

4.2.4 Árboles de secuencias concatenadas

Los productos de PCR obtenidos se enviaron a secuenciar al servicio de secuenciación automática de MacroGen Inc. (Corea). Una vez recibidas las secuencias, se realizaron análisis

bioinformáticos. En primer lugar, las secuencias se editaron con el programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* v7.0.5 para obtener las secuencias consenso.

Los árboles filogenéticos se construyeron con las secuencias ITS, Bt, Rpb-2 o CMD concatenadas. Las secuencias de ITS, Bt, Rpb-2 y CMD utilizadas en la construcción de los árboles se extrajeron del banco de datos de genes (*GenBank*) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI del inglés, *National Center for Biotechnology Information*) (Tablas 3, 4). Estas secuencias pertenecen en su mayoría a cepas tipo de especies del género *Penicillium* perteneciente a la colección CBS-KNAW referenciadas en el trabajo de Houbraken *et al.*, 2012 y la taxonomía de Pitt & Hocking, 1997.

Tabla 3. Lista de especies y números de acceso del *GenBank* utilizados para la construcción de los árboles con las secuencias concatenadas de ITS-Bt-CMD

Especie	Nombre tipo	ITS	Bt	CMD
<i>Penicillium bifforme</i>	DTO 269E2	KJ775624.1	KJ775117.1	KJ775397.1
<i>Penicillium bifforme</i>	CBS 297.48	KC411731.1	MN969373.1	KU896823.1
<i>Penicillium camemberti</i>	CBS 299.48	AB479314.1	FJ930956	KU896825
<i>Penicillium camemberti</i>	KAS7922	KY469068.1	KY469095.1	KY469023.1
<i>Penicillium commune</i>	CBS 311.48	AY213672.1	AY674366	KU896829
<i>Penicillium crustosum</i>	GN-HY-1-1	MG554296.1	MH424001.1	MH423989.1
<i>Penicillium crustosum</i>	115503	MH862985.1	MN969379.1	DQ911132
<i>Penicillium discolor</i>	DTO 047	AJ004816.1	MN149923.1	MN149941.1
<i>Penicillium expansum</i>	isolate R27	KX243329.1	MH040784.1	MK217414.1
<i>Penicillium expansum</i>	CBS 325.48	MH856369.1	JQ965099.1	DQ911134.1
<i>Penicillium melanoconidium</i>	CV1331	JX091410.1	JX091545.1	JX141587.1
<i>Penicillium melanoconidium</i>	CBS 115506	MH862986.1	MN969387.1	KU896843.1
<i>Penicillium nordicum</i>	DTO 098-F7	KJ834513.1	MN969389.1	KU896845.1
<i>Penicillium nordicum</i>	isolate F8	MG821369.1	MF100864.1	MF100884.1
<i>Penicillium palitans</i>	DTO 235D6	KJ775649.1	KJ775142.1	KJ775398.1
<i>Penicillium palitans</i>	CBS 107.11	KJ834514.1	MK450957.1	KU896847.1
<i>Penicillium solitum</i>	XF	MG821373.1	MF100861.1	MF100881.1
<i>Penicillium solitum</i>	CBS 424.89	AY373932.1	MN969398.1	KU896851.1
<i>Penicillium venetum</i>	CBS 201.57	MH857696.1	AY674335	KU896855
<i>Penicillium venetum</i>	ATCC 16025	KC146355.1	KU897013.1	KU933407.1
<i>Penicillium verrucosum</i>	CBS 603.74	AY373938.1	MN969405.1	DQ911138
<i>Penicillium verrucosum</i>	isolate F1B	MG821374.1	MF100863.1	MF100883.1
Grupo Externo				
<i>Aspergillus niger</i>	Isolate NRRL 326	EF661186.1	EF661089.1	EF661154.1

Tabla 4. Lista de especies y números de acceso del *GenBank* utilizados para la construcción de los árboles con las secuencias concatenadas de ITS-Bt-Rpb2.

Especie	Nombre tipo	ITS	Bt	Rpb2
<i>Penicillium allii sativi</i>	DTO 149B2	JX996630.1	JX996894.1	JX996630.1
<i>Penicillium allii-sativi</i>	DTO 149A8	JX996627.1	JX996891.1	JX996627.1
<i>Penicillium chrysogenum</i>	CBS 306.48	JN121487.1	JF909955.1	JN121487.1
<i>Penicillium chrysogenum</i>	CBS 259.29	JX996665.1	JX996924.1	JX996665.1
<i>Penicillium chrysogenum</i>	CBS 314.48	JX996670.1	JX996927.1	JX996670.1
<i>Penicillium chrysogenum</i>	DTO 98F1	JX996660.1	JX996921.1	JX996660.1
<i>Penicillium chrysogenum</i>	DTO 149A2	JX996621.1	JX996885.1	JX996621.1
<i>Penicillium chrysogenum</i>	DTO 149B5	JX996633.1	JX996897.1	JX996633.1
<i>Penicillium desertorum</i>	DTO 148I6	JX996682.1	JX996818.1	JX996682.1
<i>Penicillium desertorum</i>	DTO 148I5	JX996681.1	JX996817.1	JX996681.1
<i>Penicillium desertorum</i>	DTO 015H9	JX996684.1	JX996820.1	JX996684.1
<i>Penicillium desertorum</i>	DTO 16B5	JX996685.1	JX996821.1	JX996685.1
<i>Penicillium dipodomyis</i>	CBS 110412	JF909932.1	JF909950.1	JX996695.1
<i>Penicillium dipodomyis</i>	CBS 170.87	JX996707.1	JX996841.1	JX996707.1
<i>Penicillium dipodomyis</i>	CBS 110415	JX996698.1	JX996833.1	JX996698.1
<i>Penicillium dipodomyis</i>	CBS 112570	JX996704.1	JX996838.1	JX996704.1
<i>Penicillium egyptiacum</i>	CBS 244.32	JN406598.1	KU896810.1	JX996714.1
<i>Penicillium egyptiacum</i>	CBS 867.70	JX996728.1	JX996858.1	JX996728.1
<i>Penicillium egyptiacum</i>	CBS 137.70	JX996706.1	JX996840.1	JX996706.1
<i>Penicillium flavigenum</i>	CBS 419.89	JN406551.1	AY495993.1	JF909939.1
<i>Penicillium flavigenum</i>	CBS 110411	JX996694.1	JX996830.1	JX996694.1
<i>Penicillium flavigenum</i>	CBS 110407	JX996692.1	JX996828.1	JX996692.1
<i>Penicillium flavigenum</i>	CBS 110406	JX996691.1	JX996827.1	JX996691.1
<i>Penicillium flavigenum</i>	DTO 149C7	JX996683.1	JX996819.1	JX996683.1
<i>Penicillium kewense</i>	CBS 183.72	JX996710.1	JX996842.1	JX996710.1
<i>Penicillium kewense</i>	CBS 344.61	JX996718.1	KU896816.1	JF417428.1
<i>Penicillium lanosocoeruleum</i>	CBS 215.30	JX996712.1	KU896817.1	JX996712.1
<i>Penicillium lanosocoeruleum</i>	CBS 484.84	JX996723.1	MT328504.1	JX996723.1
<i>Penicillium mononematosum</i>	CBS 172.87	JX996709.1	JF909953.1	JF909935.1
<i>Penicillium mononematosum</i>	CBS 109616	JX996690.1	JX996826.1	JX996690.1
<i>Penicillium mononematosum</i>	CBS 112104	JX996700.1	JX996834.1	JX996700.1
<i>Penicillium nalgiovense</i>	CBS 352.48	JX996719.1	KU896811.1	JN406560.1
<i>Penicillium nalgiovense</i>	CBS 318.92	JX996717.1	AY496000.1	JX996717.1
<i>Penicillium rubens</i>	CBS 197.46	JX996663.1	JF909945.1	JF909927.1
<i>Penicillium rubens</i>	CBS 205.57	JX996664.1	JF909954.1	JX996664.1
<i>Penicillium rubens</i>	CBS 307.48	JX996669.1	JF909944.1	JX996669.1
<i>Penicillium rubens</i>	CBS 319.59	JX996671.1	JX996928.1	JX996671.1

<i>Penicillium vanluykii</i>	DTO 148I2	JX996615.1	JX996879.1	JX996615.1
<i>Penicillium vanluykii</i>	DTO 149A4	JX996623.1	JX996887.1	JX996623.1
<i>Penicillium vanluykii</i>	DTO 149B3	JX996631.1	JX996895.1	JX996631.1
Grupo externo				
<i>Penicillium griseofulvum</i>	CBS 185.27	JN121449.1	JF909942.1	JF909924.1

El alineamiento múltiple y empalme de las secuencias de los marcadores se realizó utilizando la herramienta *ClustalW* del paquete bioinformático *MEGA 7.0*. Los árboles se construyeron por los métodos estadísticos del vecino más cercano (NJ, del inglés *Neighbor Joining*) usando el modelo de sustitución Kimura-dos parámetros. En ambos casos, se utilizó el test de *Bootstrap* con 1000 replicaciones mediante la herramienta *Phylogeny* del programa *MEGA 7.0*.

4.3 Screening cuantitativo de los hongos seleccionados productores de lipasas en medio líquido

Con el propósito de obtener información cuantitativa acerca de la actividad lipasa, los hongos seleccionados previamente, mediante los ensayos de *screening* semicuantitativo (sección 4.1.2), se realizaron ensayos en medio líquidos. Para ello los hongos seleccionados se reactivaron en medio sólido MEA durante 6 días y a partir de estos cultivos se obtuvo una suspensión de esporas a una concentración de 10^6 esporas/ mL de cada aislamiento. Esta suspensión se realizó raspando suavemente la superficie de las placas y suspendiendo las esporas en una solución acuosa de Tween 80 0,1 % (v/v) hasta llegar a la concentración deseada. Se tomó 1 mL de dicha suspensión de esporas y se inoculó en frascos Erlenmeyer de 100 mL conteniendo 30 mL de medio líquido (PYE) con peptona 0,5%, extracto de levadura 0,3%, extracto de carne 0,3 % suplementados o no con 2 % de aceite de oliva (marca cocinero extra virgen) a pH 7 y se incubaron en agitación (140 rpm) a 30° C durante 8 días. Cabe aclarar que la selección del aceite de oliva para estos ensayos se debió a que se encuentra reportado en la bibliografía como uno de los mejores inductores de lipasas en comparación con otros aceites (Yong et al., 2016; Geoffry & Achur, 2018; Ortellado et al., 2020). Los días 4 y 6 se tomaron alícuotas de cada uno de los medios líquidos y se realizó una centrifugación de las mismas a 8000 g por 15 min para eliminar cualquier resto de micelio presente; al día 8 de cultivo se separó el micelio del sobrenadante por filtración en embudo de Buchner utilizando filtros de fibra de vidrio. Los sobrenadantes de los cultivos se centrifugarán a 8000 g por 15 min y se conservaron a 4°C.

4.3.1 Determinación de actividad lipasa en los hongos seleccionados

La actividad lipasa se determinó espectrofotométricamente (405 nm) con una solución de P (pNPP) como sustrato (se determinó el p-nitrofenol producido por la hidrólisis del pNPP). Para la reacción se utilizaron 100 µl de una solución A de pNPP (solución A: 0,0015 g pNPP + 4 mL isopropanol) y 800 µl solución B (0,1 g goma arábiga + 0,4 mL Tritón X-100 + 100 mL buffer fosfato 0,1 M, pH 7) y 100 µl del sobrenadante.

Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que libera 1 mol de p-nitrofenol por minuto (IU) bajo las condiciones descritas anteriormente.

4.3.2 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente utilizando el análisis de la varianza (ANOVA) y el test de significancia estadística utilizando para ambos los programas *STATGRAPHICS Centurion* y *GraphPad Prism* versión 7.0 para *Windows* (*GraphPad Software*, San Diego, CA, USA).

4.3.3 Caracterización bioquímica de la actividad lipolítica presente en los sobrenadantes de los aislamientos seleccionados.

Para la caracterización de la actividad lipolítica presente en el sobrenadante se seleccionó el sobrenadante que mostró la mayor actividad para cada uno de los siete hongos que demostraron actividad prometedora.

4.3.3.1 Determinación del perfil de isoenzimas y peso molecular

4.3.3.1.1 Zimograma

La presencia de isoenzimas con actividad lipasa y su peso molecular, se detectó mediante un análisis del perfil electroforético en geles de poliacrilamida con duodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*). La electroforesis se realizó en geles al 12% (p/v) (Laemmli, 1979). Las muestras se sembraron al gel añadiendo SDS al 10% (p/v), se sembraron 20 U/mL por carril. La corrida electroforética se realizó a 100 V durante 2 h, adicionando 1 g/L de SDS al *buffer* de corrida. Después de concluida la corrida electroforética, se eliminó el SDS de los geles sumergiéndolos durante 30 minutos en Triton X-100 al 2,5% a temperatura ambiente. Los geles se lavaron brevemente (1 min) en buffer fosfato 50 mM, pH 7,0 y se cubrieron con una solución de butirato de 4-metilumbeliferilo (MUF) 100 µM. Después de 40 minutos, las bandas de actividad se revelaron en transiluminador con luz UV (Diaz *et al.*, 1999, Okino-Delgado *et al.*, 2017).

4.3.3.2 pH óptimo

Para estudiar el efecto del pH sobre la actividad lipasa en los sobrenadantes de cultivo, las mediciones se realizaron como se indica en el apartado 4.3.1 a una temperatura constante de 30°C variando el pH en el rango de 7 a 8,5.

Las soluciones *buffer* utilizadas en la mezcla de reacción fueron realizadas con buffer fosfato de sodio para pH 7; 7,5; 8 y 8,5. La actividad relativa se expresó como un porcentaje tomando la máxima actividad enzimática como el 100 %.

4.3.3.3 Temperatura óptima

Para evaluar el efecto de la temperatura en la actividad lipasa se realizó una modificación en el protocolo de determinación de la actividad enzimática; la mezcla de reacción se incubó al pH óptimo (obtenido de acuerdo a lo expresado en el apartado anterior), variando la temperatura (4, 25, 30, 40, 55°C) y manteniendo constantes las demás condiciones. La actividad relativa se expresó en porcentaje tomando la máxima actividad enzimática como el 100 %.

4.3.3.4 Termoestabilidad

Para evaluar la termoestabilidad enzimática en el tiempo, se realizó una pre incubación de los sobrenadantes a 30 y 40°C. Los sobrenadantes se retiraron a distintos intervalos; 1, 6, 24, 48 y 72 h y se midió la actividad lipasa residual de ellos. La actividad residual se expresó en porcentaje tomando la actividad enzimática al tiempo cero como el 100 %.

4.3.3.5 Estabilidad en pH

Para determinar la estabilidad enzimática en función del pH, se realizó una preincubación del sobrenadante con *buffers* a diferentes pHs: 7; 7,5 y 8 a una temperatura constante (obtenida en la sección anterior 4.3.3.4), durante diferentes intervalos; 1, 6, 24, 48, y 72. Luego, se realizó la medición de la actividad lipasa. La actividad residual se expresó en porcentaje tomando la actividad enzimática al tiempo cero como el 100 %.

4.3.3.6 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente utilizando el análisis de la varianza (ANOVA) y el test de significancia estadística utilizando para ambos los programas *STATGRAPHICS Centurion* y *GraphPad Prism* versión 7.0 para *Windows* (*GraphPad Software*, San Diego, CA, USA).

4.4 Evaluación del efecto de diferentes variables nutricionales y físicas sobre la actividad lipasa producida por *Penicillium rubens* LBM 081

4.4.1 Evaluación del efecto de diferentes aceites sobre la actividad lipasa producido por *Penicillium rubens* LBM 081

Para la continuidad de los siguientes ensayos se optó por la selección del hongo que demostró mejores niveles de actividad enzimática lipasa en el este caso *Penicillium rubens* LBM 081.

Con el fin de evaluar el efecto de diferentes aceites como fuente de carbono y potenciador de la actividad lipasa, se realizaron ensayos en medios de cultivo líquidos compuestos por peptona 0,5 %, extracto de levadura 0,3 %, extracto de carne 0,3 % a pH 7. A este medio se adicionó por separado: aceites de maíz (Mazola AGD), maní (Maní King), girasol (Parafarm), chía (Tecno botánica), canola (Krol), oliva (Cocinero extra virgen), hígado de bacalao (Parafarm) todos suplementados al 2%. Los ensayos se realizaron en Erlenmeyer de 100 mL; por cada aceite ensayado se evaluó un control sin el agregado de aceite. La inoculación fue realizada con una suspensión de esporas como se describió en la sección 4.3 y la incubación se llevó a cabo durante 8 días a 30°C en agitación constante de 140 rpm. Los días 4 y 6 se tomaron alícuotas de cada uno de los medios líquidos y se realizó una centrifugaron de las mismas a 8000 g por 15 min para eliminar cualquier resto de micelio presente; al día 8 de cultivo se separó el micelio del sobrenadante por filtración en embudo de Buchner utilizando filtros de fibra de vidrio.

4.4.2 Evaluación del efecto de diferentes concentraciones del aceite cuyo efecto potenció la actividad lipasa de *Penicillium rubens* LBM 081

Posteriormente, se realizó una evaluación de diferentes concentraciones del aceite cuyo efecto potenció la actividad lipasa, para ello se llevaron a cabo ensayos en medio líquidos en los cuales evaluaron diferentes concentraciones de aceite de oliva al 1; 1,5; 3; 3,5; 4; 4,5% e incubados durante 8 días a 30°C en agitación constante de 140 rpm. Los días 4 y 6 se tomaron alícuotas de cada uno de los medios líquidos y se realizó una centrifugaron de las mismas a 8000 g por 15 min para eliminar cualquier resto de micelio presente; al día 8 de cultivo se separó el micelio del sobrenadante por filtración en embudo de Buchner utilizando filtros de fibra de vidrio.

4.4.3 Evaluación del efecto de diferentes fuentes de nitrógeno sobre la actividad lipasa de *Penicillium rubens* LBM 081

Para la evaluación de una fuente de nitrógeno adecuada se llevaron a cabo ensayos por separado evaluando cinco fuentes diferentes: extracto de carne, sulfato de amonio, peptona de carne, peptona de soja, extracto de levadura en tres concentraciones 0,3%; 1%; 2%. Suplementado con el aceite que mostró potenciar la actividad lipasa. La incubación se llevó a cabo durante 8 días a 30°C en agitación constante de 140 rpm. Los días 4 y 6 se tomaron alícuotas de cada uno de los medios líquidos y se realizó una centrifugación de las mismas a 8000 g por 15 min para eliminar cualquier resto de micelio presente; al día 8 de cultivo se separó el micelio del sobrenadante por filtración en embudo de Buchner utilizando filtros de fibra de vidrio.

4.4.4 Evaluación del efecto de diferente concentración de inóculo y agitación sobre la actividad lipasa de *Penicillium rubens* LBM 081

Con el fin de incrementar más la actividad lipasa del hongo seleccionado, se optimizó la concentración del inóculo y la agitación. Las concentraciones de inóculo evaluadas fueron 10^5 , 10^6 y 10^7 esporas/mL. La variable física de agitación se evaluó en tres niveles 100, 140, 160 rpm. Los cultivos para estos ensayos se llevaron a cabo en frascos Erlenmeyer de 100 mL conteniendo 25 mL del medio correspondiente (obtenido de los ensayos anteriores). Los frascos se esterilizaron a 121 °C por 20 min, se incubaron $30 \pm 1^\circ\text{C}$ y se tomaron alícuotas a los 4, 6 y 8 días en condiciones de esterilidad para la evaluación de la actividad. Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado.

Del mismo modo se realizó una evaluación de la actividad utilizando un mayor volumen de medio de cultivo a 300 y 500 mL.

4.4.5 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente utilizando el análisis de la varianza (ANOVA) y el test de significancia estadística utilizando para ambos los programas *STATGRAPHICS Centurion* y *GraphPad Prism* versión 7.0 para *Windows* (*GraphPad Software*, San Diego, CA, USA).

4.5 Caracterización bioquímica de la actividad lipolítica presente en el sobrenadante optimizado de *Penicillium rubens* LBM 081.

4.5.1 pH óptimo

Para estudiar el efecto del pH sobre la actividad lipasa en el sobrenadante de cultivo, las mediciones se realizaron a una temperatura constante de 30°C variando el pH en un rango de 7 a 8,5.

Las soluciones *buffer* utilizadas fueron realizadas con *buffer* fosfato de sodio para pH 7; 7,5; 8 y 8,5. La actividad relativa se expresó como un porcentaje tomando la máxima actividad enzimática como el 100 %.

4.5.2 Temperatura óptima

Para evaluar el efecto de la temperatura en la actividad lipasa se realizó una modificación en el protocolo de determinación de la actividad enzimática; la mezcla de reacción fue incubada al pH óptimo (obtenido en la sección anterior 4.5.1) variando la temperatura (4, 25, 30, 40, 55°C) y manteniendo constantes las demás condiciones. La actividad relativa se expresó en porcentaje tomando la máxima actividad enzimática como el 100 %.

4.5.3 Termoestabilidad

Para evaluar la termoestabilidad enzimática en el tiempo, se realizó una pre incubación del sobrenadante a 4, 25, 30, 40 y 50 °C. Los sobrenadantes se retiraron a distintos intervalos; 1, 6, 12, 48 y 72 h y se midió la actividad lipasa residual de ellos. La actividad residual se expresó en porcentaje tomando la actividad enzimática al tiempo cero como el 100 %.

4.5.4 Estabilidad en pH

Para determinar la estabilidad enzimática en función del pH, se realizó una preincubación del sobrenadante a diferentes pHs: 7; 7,5; 8 y 8,5 a una temperatura constante (obtenida en la sección anterior) durante diferentes intervalos; 1, 6, 12, 48 y 72. Luego, se realizó la medición de la actividad lipasa. La actividad residual se expresó en porcentaje tomando la actividad enzimática al tiempo cero como el 100 %.

4.5.5 Análisis estadísticos

El método empleado para discriminar entre las medias fue el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD, *Least Significant Difference*) de Fisher. Para ello se utilizó el programa *GraphPad 7.0* versión, al igual que para la realización de los gráficos.

4.6 Preparación de las muestras para el análisis secretómico

El sobrenadante optimizado libre de micelio se filtró al vacío y centrifugó a 10.000 rpm, 4 °C durante 15 min; luego, se clarificaron con filtros de 0,22 µm (*Chromafil® xtra*) y concentraron con dispositivos *Amicon* de 10 kDa. Se determinó la concentración de proteínas totales mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Se midió en espectrofotómetro a una absorbancia de 595 nm y la concentración de proteínas se expresó en mg/mL en relación con una curva estándar de diluciones seriadas de albúmina. De cada muestra se utilizó un volumen de sobrenadante que presentara 40 µg de proteínas como máximo para continuar con el protocolo de reducción y precipitación con acetona.

Primeramente, las muestras se trataron con dithiothreitol (DTT) 10 mM a 56 ± 2 °C durante 45 min a fin de reducir los puentes disulfuro de las proteínas y para evitar que se vuelvan a formar, se llevó a cabo una alquilación con iodoacetamida a una concentración final de 20 mM a 25 °C en oscuridad durante 45 min. Luego las muestras se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA, del inglés *Trichloroacetic acid*) 100 % (v/v) igual a la quinta parte del extracto proteico obtenido para cada muestra, incubándose a -20 °C durante 2 h. Las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm, 4 °C durante 10 min y se recuperaron los pellets. Estos se lavaron con acetona fría, -4 °C y se centrifugó a 10.000 rpm, 4 °C durante 10 min, repitiendo el lavado tres veces.

Los precipitados proteicos obtenidos se enviaron a analizar al Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa (CEQUIBIEM) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEyN) de la Universidad Nacional de Buenos Aires (UBA), donde se agregó tampón bicarbonato de amonio 0,05 M pH 8 a las muestras y se las digirió con tripsina durante toda la noche. Posteriormente, las muestras se liofilizaron por *Speed Vac* y se re-suspendieron con 10 µL de ácido fórmico 0,1 % (v/v).

4.6.1 Espectrometría de masas

Las muestras se analizaron por nano-HPLC acoplado a un espectrómetro de masa con tecnología Orbitrap lo que permitió, en primer lugar, una separación de los péptidos obtenidos por digestión trípica y su posterior identificación.

En primer lugar, las muestras se ionizaron por electrospray EASY-SPRAY (*Thermo Scientific*) con un voltaje de spray de 3,5 kV. Con el fin de separar estos completos proteicos con un alto grado de resolución se utilizó un cromatógrafo EASY-nLC 1000 (*Thermo Scientific*) con una columna de fase reversa *EASY-Spray Accucore* (P/N ES801) (*Thermo Scientific*) a 35 °C y una pre-columna *Acclaim PepMap* (P/N 164946) (*Thermo Scientific*). Se utilizó un gradiente con dos soluciones; solución A, agua con ácido fórmico 0,1 % y solución B, acetonitrilo con ácido fórmico 0,1 %. Se utilizó un espectrómetro Q-Exactive (*Thermo Scientific*) con una celda de disociación inducida por colisión (HCD, del inglés *High Collision Dissociation*) y un analizador Orbitrap, lo que permitió la identificación de los péptidos mientras se separaban por cromatografía. De esta manera, se obtuvieron un espectro de masas completo (Full MS, del inglés *Mass Spectrum*) y un espectro de masa masa (MSMS). Se utilizó un método que realizó la mayor cantidad de ciclos de medición por unidad de tiempo, por cada ciclo se obtuvo un Full MS y luego un MSMS de los 12 picos de mejor señal ruido en ese ciclo, con un rango de exclusión dinámico para disminuir el número de veces que un mismo péptido es fragmentado a lo largo de su elución del cromatograma.

4.6.2 Análisis de los datos

El análisis de los datos obtenidos se realizó con el programa *Proteome Discoverer* (*Thermo Scientific*) versión 1,4, utilizando la base de datos correspondiente al estudio en cuestión. El programa desarrolló un informe donde indicó que proteínas fueron identificadas y los péptidos que utilizó para esta identificación.

Criterios de búsqueda

- Base de datos (origen): *Penicillium rubens*.
- Enzima: tripsina.
- Miscleavage: 2.
- Tolerancia de masa para precursor: 10 ppm.
- Tolerancia de masa para fragmento: 0,05 Da.
- Modificaciones Dinámicas: Oxidación (M); Carbamidometilación (C)
- Modificaciones estáticas.
- Nivel de confianza de los péptidos: alto.

Caracterización de las proteínas identificadas

La caracterización de la proteínas identificadas por el servicio espectrometría de masas se realizó con las siguientes bases de datos y programas on-line: NCBI, Cazy, Uniprot (*the Universal protein resource*, <http://www.uniprot.org>), Pfam (*Protein families*,

<http://pfam.xfam.org/>) y DeepLoc - 1.0 (<http://services.healthtech.dtu.dk/service.php?DeepLoc-1.0>)

La dispersión de las proteínas identificadas se graficó respecto a sus masas moleculares y puntos isoeléctricos y también se graficaron según su frecuencia relativa.

4.7 Aplicación del sobrenadante optimizado de *Penicillium rubens* LBM 081 en la hidrólisis de efluente domiciliario

La temperatura a la cual se llevó a cabo la hidrólisis enzimática es muy importante de manera tal que las enzimas actúen de manera óptima, así como también lo es la termoestabilidad de las enzimas durante el período de la aplicación para que el proceso sea lo más eficiente posible. Teniendo en cuenta estos parámetros se realizaron ensayos a fin de observar el efecto del sobrenadante optimizado sobre un efluente domiciliario rico en aceites y grasas y un efluente sintético con aceite de oliva en diferentes porcentajes. El efluente sintético con aceite de oliva fue empleado como modelo debido a su composición química conocida. Está constituida mayoritariamente por ácidos oleicos (C18:1), un ácido graso con cadena carbonada larga, blanco principal de la hidrólisis ejercida por las lipasas (Ganapathy *et al.*, 2019).

El efluente sintético de aceite de oliva se realizó mediante una mezcla de aceite de oliva y agua no potable (2:1), mientras que para el caso del efluente domiciliario estuvo constituido por una mezcla de agua (no potable) más aceites de girasol y oliva (2:1:1) obtenidos luego de dos ciclos de uso en frituras en la cocina, mediante filtración empleando embudo Buchner.

Cada ensayo se realizó en Erlenmeyer de 250 mL a diferentes porcentajes, un ensayo al 26% (26% de sobrenadante optimizado y 74% del efluente domiciliario) y 44% (44% de sobrenadante optimizado y 56 % del efluente domiciliario). Cada ensayo se incubó por un periodo de 6, 24 y 48 h a 30°C a 140 rpm tomando como referencia las experiencias realizadas por Posso Mendoza *et al.*, (2020).

En cada efluente, antes y después de la incubación se evaluaron diferentes parámetros como ser: pH, Temperatura, aceites y grasas totales, DQO (demanda química de oxígeno).

Los parámetros de pH y temperatura fueron medidos al momento de ser obtenidas las muestras de partida y al momento de concluir cada ensayo con pH metro y termómetro.

Para la determinación de aceites y grasas totales en los efluentes antes y después de la aplicación del sobrenadante obtenido del aislamiento de *Penicillium rubens* LBM 081, se empleó el método de extracción Soxhlet.

Para ésta determinación primeramente, se realizó la acidificación con HCl de 200 mL de efluente sin tratar o tratado a un pH menor a 2.

Posteriormente se colocó un papel de filtro en el embudo Buchner, luego se lo humedeció con agua destilada y se procedió al filtrado de 100 mL de una suspensión de tierra de diatomeas (10 g/L) utilizando la bomba de vacío y un lavado con 1 L de agua destilada. Una vez finalizada esta preparación la muestra se filtró en su totalidad. Con la ayuda de unas pinzas, el papel de filtro se transfirió a un vidrio reloj, con otro papel de filtro humedecido en solvente se limpió el embudo Buchner y el frasco que contenía la muestra, asegurándonos de eliminar las películas de grasa y material sólido presentes. Se juntaron ambos filtros, se los envolvió y colocó en el cono de extracción y se los seco en estufa a 103°C durante 30 min con el objetivo de que los compuestos volatilizables a esta temperatura se pierdan.

Se realizó el pesado del el matraz de extracción con las perlas de ebullición en su interior a este peso se lo denomino como P1.

Se colocó el cono en el embudo Soxhlet y se agregó 250 mL de solvente (cloroformo o hexano) al matraz de extracción. Se realizó la extracción de aceites y grasas a razón de 20 ciclos por hora durante 4 horas, tiempo tomado del primer ciclo. Para finalizar la extracción se procedió a destilar el solvente del matraz de extracción en un baño de agua a 70°C. Cuando se observó que la condensación del solvente finalizó, se procedió al sacado del matraz de extracción a baño María, tapándolo con un soporte adecuado y secando el matraz durante 15 min, en el último minuto soplar aire por el residuo con un vacío adecuado.

Una vez enfriado el matraz de extracción durante 30 min, se procedió a pesarlo, a este peso se lo denomino como P2.

Para el cálculo de los resultados obtenidos en cada extracción se empleó la fórmula:

$$\text{Aceites y grasas, mg/L} = \frac{(P2 - P1) * 1000}{V}$$

Dónde: P1= Peso del matraz con las perlas de ebullición previo a la extracción en mg.

P2= Peso del matraz con las perlas de ebullición luego de la extracción en mg.

V= volumen de muestra filtrado en mL.

Para la determinación de la demanda química de oxígeno (DQO) se empleó el método de reflujo abierto.

En principio, se tuvo el recaudo de que si la muestra tenia materia orgánica biológicamente activa, el análisis se realizara inmediatamente, aunque preservada a pH 2 por adición de H₂SO₄ concentrado puede analizarse hasta siete días después.

Se realizaron diluciones preliminares, para reducir el error inherente en la medida de pequeños volúmenes de muestra. De esas diluciones realizadas se tomaron 2 mL de muestras y se adicionaron en tubos de reflujo, luego se agregaron 0,2 g de HgSO₄ en presencia de perlas de

vidrio para controlar la ebullición. Se adicionaron 1 mL de una solución de $K_2Cr_2O_7$ 0,0417 M y muy lentamente 3 mL de una solución de $AgSO_4 + H_2SO_4$ se colocaron los tubos con esta mezcla de soluciones al condensador por 2 h.

Finalizado el tiempo se dejaron enfriar los tubos con muestras y se adicionaron 3 mL de agua destilada a cada tubo y 30 μ l de solución indicadora de ferroina. Para finalizar se realizó una titulación con una solución de sulfato ferroso de amonio (FAS) 0,25 M se tomó como punto final de la titulación el primer cambio nítido de color azul-verdoso a café-rojizo.

Para una cuantificación correcta se estandarizó la solución FAS diariamente con una solución de $K_2Cr_2O_7$ de la siguiente forma: se diluyeron 10,0 mL de la solución estándar de $K_2Cr_2O_7$ a aproximadamente 100 mL, luego se agregaron 30 mL de H_2SO_4 concentrado y enfriado. Se tituló con FAS en presencia de 0,10 a 0,15 mL (2 o 3 gotas) de indicador de ferroina esto permitió el cálculo de molaridad del FAS.

Molaridad del FAS = Volumen de $K_2Cr_2O_7$ 0.0417 M titulado, mL / Volumen del FAS empleado mL * 0.25

Una vez conocida la molaridad del FAS y realizada la titulación de cada muestra se realizó el correspondiente cálculo de DQO como:

DQO como mg de $O_2/L = (A-B) \times M \times 8000/mL$ de Muestra

Donde:

A = mL FAS usados para el blanco

B = mL FAS usados para la muestra, y M = molaridad del FAS

4.7.1 Ensayo de toxicidad con semillas de *Lactuca sativa*

Para evaluar la toxicidad de los ensayos realizados en la sección anterior 4.7 se empleó un lote de semillas no tratadas químicamente de *L. sativa* con un 97 % de germinación las cuales se mantuvieron en un ambiente seco a 4°C.

Antes de las pruebas de toxicidad, las muestras se homogeneizaron mediante agitación suave. Los parámetros finales de toxicidad evaluados fueron: la elongación de la raíz (índice de crecimiento relativo=ICR y el índice de germinación= IG). Una semilla se consideró germinada cuando se detectó la apariencia visible de la radícula. Los controles de calidad fueron una germinación superior al 90 % y un coeficiente de variación para la elongación de raíces inferior al 30 % en los tratamientos de control (Sobrero y Ronco, 2004).

Los ensayos fueron realizados en placas de Petri de 90 mm de diámetro forradas con papel filtro con 10 semillas cada una, a estos papeles se añadieron 4 mL de una dilución al 50 % de la muestra o de agua para el caso del control. Cada ensayo fue realizado por triplicado, las

mediciones fueron realizadas luego de 5 días de exposición en oscuridad a 22°C, según protocolos estandarizados (EPA, 1989; Sobrero y Ronco, 2004).

El número de semillas germinadas se utilizó para calcular el índice de crecimiento relativo (**ICR**).

$$\mathbf{ICR} = \mathbf{LRM} / \mathbf{LRC}$$

Donde; **LRM** es la longitud de la radícula de la muestra, **LRC** es la longitud de la radícula del control.

Los valores de **ICR** se pueden diferenciar en tres categorías según los efectos de toxicidad observados:

-Inhibición de la elongación radicular (I): $0 < \mathbf{X} > 0,8$

-Sin efectos significativos (NSE): $0,8 \leq \mathbf{X} \leq 1,2$

-Estimulación de la elongación radicular (S): $\mathbf{X} > 1,2$

Donde X es el valor obtenido del **ICR**.

También se calculo el Índice de germinación (**IG**) según la formula:

$$\mathbf{IG} (\%) = \mathbf{LRM} * \mathbf{NGM} * 100 / \mathbf{LRC} * \mathbf{NGC}$$

Donde; **LRM** es la longitud de la radícula de la muestra, **LRC** es la longitud de la radícula del control, **NGM** es el número de semillas germinadas en la muestra y **NGC** es el número de semillas germinadas en el control.

5. RESULTADOS

5.1 Evaluación de la habilidad lipolítica de aislamientos del género *Penicillium* nativos de la Provincia de Misiones

En esta primera parte del trabajo, se focalizó en explorar la habilidad lipolítica de aislamientos pertenecientes género *Penicillium* depositadas en la colección del Laboratorio de Biotecnología Molecular (BioTecMol), Instituto de Biotecnología Misiones (InBioMis) “María Ebe Reca”, Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales (FCEQyN), de la Universidad Nacional de Misiones (UNaM) que fueran colectados a partir de frutas en pudrición de zonas naturales de Misiones (Zini, 2013). Una vez reactivados los aislamientos se verificó su pertenecía al género en base a sus características macro y microscópicas, para continuar con los ensayos.

5.1.1 Screening de aislamientos productores de lipasa en medios sólidos

Primeramente se realizaron ensayos semicuantitativos para evaluar la actividad lipasa de 20 (veinte) aislamientos de *Penicillium* sp. Para ello se realizaron ensayos en medios sólidos suplementados con rodamina B y aceite de oliva como sustrato. La presencia de actividad lipasa se evidenció a través de la formación de un halo ≥ 10 mm alrededor del taco sembrado en 16 de los 20 aislamientos en estudio.

Para la selección de los mejores aislamientos productores de actividad lipasa extracelular se calculó el índice de actividad lipasa (I_{AL}).

Los valores de I_{AL} oscilaron con valores entre 0,31 y 1 para los aislamientos analizados (**Tabla 5**).

Tabla 5. Screening semicuantitativo de actividad lipasa en placas de agar rodamina-aceite de oliva.

Aislamientos fúngicos	Diámetro de la colonia (cm)	Diámetro de halos de hidrolisis (cm)	I_{AL}^a
LBM064	1 ± 0.4	2 ± 0.5	0.66 ± 0.1
LBM067	1.1 ± 0.1	1.3 ± 0.3	0.85 ± 0.10
LBM068 (*)	1.3 ± 0.3	2.6 ± 1	0.5 ± 0.12
LBM069 (*)	0.9	1.6 ± 0.2	0.56 ± 0.08
LBM070 (*)	2.8 ± 0.8	6.7 ± 1.8	0.41 ± 0.02
LBM071	1.2 ± 0.5	1.4 ± 0.3	0.86 ± 0.66
LBM073 (*)	1.9 ± 1.2	3 ± 1.8	0.63 ± 0.05
LBM075	1.6 ± 0.09	2.1 ± 0.5	0.76 ± 0.01

Tabla 5. (Continua)

Aislamientos fúngicos	Diámetro de la colonia (cm)	Diámetro de halos de hidrolisis (cm)	I _{AL} ^a
LBM076	1.9 ± 0.9	2.6 ± 1.4	0.73 ± 0.02
LBM077	1.5 ± 0.5	1.5 ± 0.5	1
LBM078	1.1 ± 0.2	1.2 ± 0.2	0.92 ± 0.02
LBM079 (*)	0.9 ± 0.1	1.5 ± 0.2	0.6 ± 0.01
LBM080	1.7 ± 0.8	2.2 ± 1	0.77 ± 0.02
LBM081 (*)	0.5 ± 0.1	1.6 ± 0.1	0.31 ± 0.09
LBM082	1.1 ± 0.2	1.7 ± 0.5	0.65 ± 0.01
LBM083	1 ± 0.3	1.2 ± 0.4	0.83 ± 0.04
LBM085	0.9 ± 0.4	1 ± 0.3	0.9 ± 0.19
LBM086	1 ± 0.2	1.4 ± 0.1	0.71 ± 0.21
LBM088 (*)	0.9 ± 0.2	1.5 ± 0.1	0.6 ± 0.18
LBM089	1.9 ± 0.4	2 ± 0.2	0.95 ± 0.12

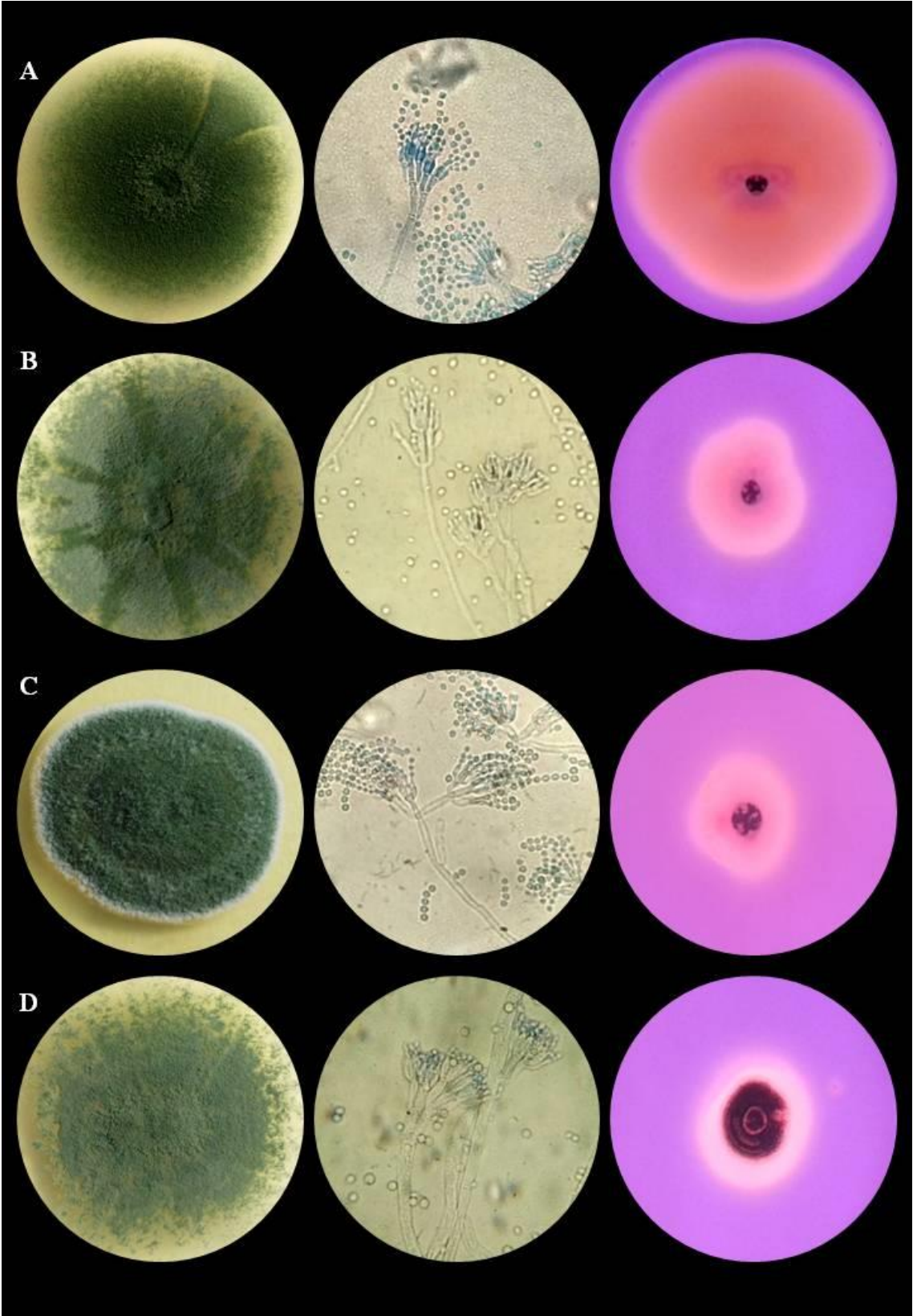
a- Índice de actividad lipasa

*- aislamientos seleccionados según el I_{AL}

Aquellos aislamientos con índices cercanos a 1 y por ende con baja actividad lipasa fueron: LBM 077 con un I_{AL} de 1, lo cual indicó ausencia de actividad lipasa; LBM 089 con un I_{AL} de 0,95 ± 0,12 (P < 0,001); LBM 078 con un I_{AL} de 0,92 ± 0,02 (P < 0,001); LBM 085 con un I_{AL} de 0,9 ± 0,19 (P < 0,001).

Por otra parte, se observaron aislamientos con índices más cercanos a 0; destacándose en este caso el aislamiento LBM 081 con el I_{AL} más bajo de 0,31 ± 0,09 (P < 0,001); seguido por el aislamiento LBM 070 con un I_{AL} de 0,41 ± 0,02 (P < 0,001); el aislamiento LBM 068 con un I_{AL} de 0,5 ± 0,12 (P < 0,001); el aislamiento LBM 069 con un I_{AL} de 0,56 ± 0,08 (P < 0,001); LBM 079 con un I_{AL} de 0,6 ± 0,01 (P < 0,001); LBM 088 con un I_{AL} de 0,6 ± 0,18 (P < 0,001); LBM 073 con un I_{AL} de 0,63 ± 0,05 (P < 0,001) (**Figura 11**).

Los aislamientos que presentaron los mejores índices de I_{AL} se seleccionaron para continuar con su identificación y análisis mediante un *screening* en medio líquido. En total fueron 7 (siete) los aislamientos seleccionados LBM 081, LBM 070, LBM 068, LBM 069, LBM 079, LBM 088, LBM 073. Cada aislamiento seleccionado se examinó a nivel macro y microscópica observándose claramente la presencia de conidios, metúlas y fiálides en estructuras típicas del género *Penicillium* (**Figura 11**). Además se llevó a cabo la identificación molecular de estos aislamientos como se describe en el siguiente apartado.



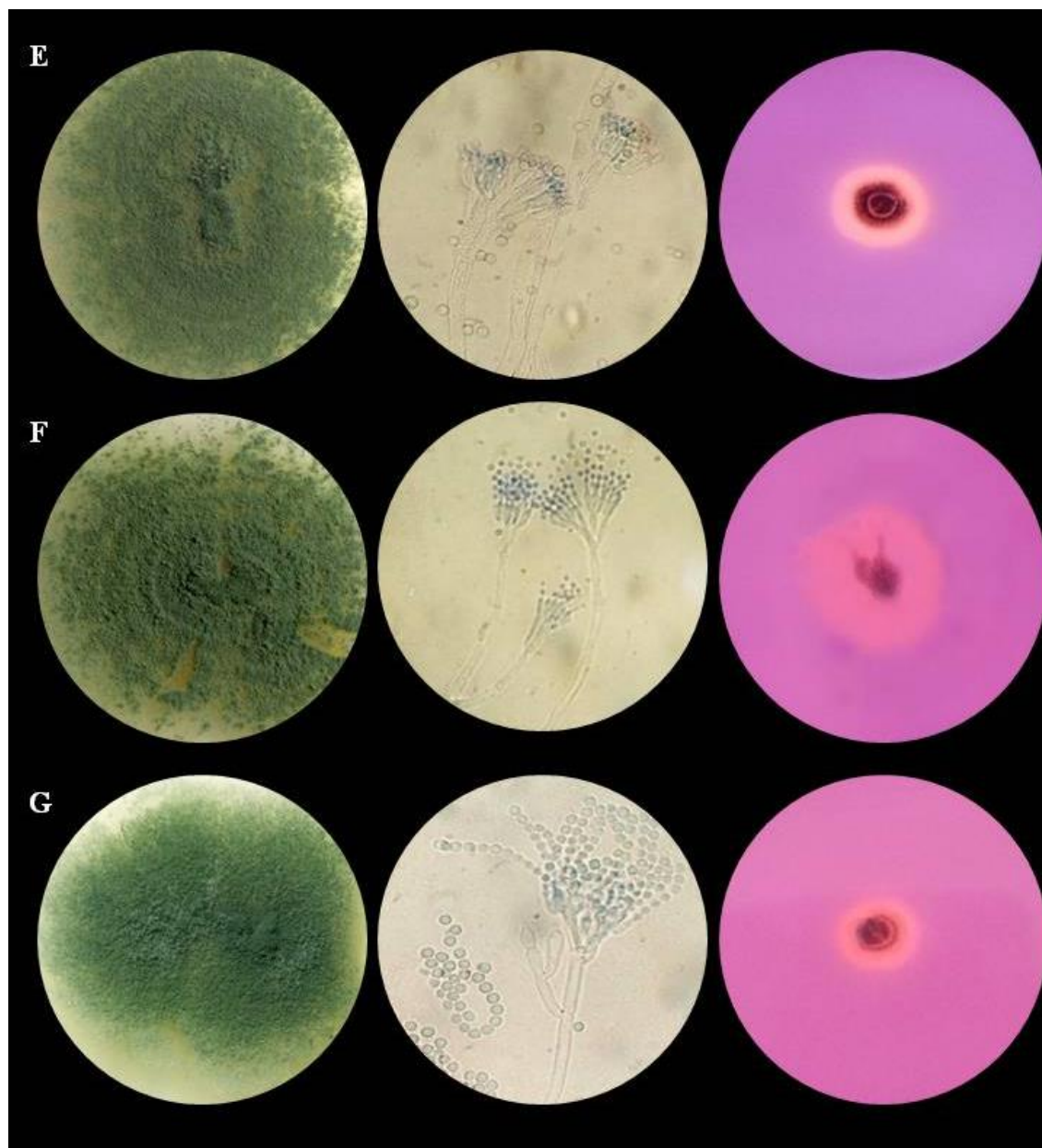


Figura 11. Aislamientos de *Penicillium* sp. con los mejores I_{AL}. **A-** LBM 081. **B-** LBM 070. **C-** LBM 068. **D-** LBM 069. **E-** LBM 079. **F-** LBM 088. **G-** LBM 073. Se observa a la izquierda vista del hongo crecido en medio de cultivos en MEA luego de 6 días; en el centro microfotografías tomadas en microscopio óptico con 100 X de aumento; a la derecha placas con actividad lipasa del hongo en presencia de Rodamina B 0,001% - Aceite de oliva 1%.

5.2 Identificación molecular de los aislamientos seleccionados por su actividad lipolítica

Los siete aislamientos: LBM 068, LBM 069, LBM 070, LBM 073, LBM 079, LBM 081, LBM 088, seleccionados previamente por presentar mejor habilidad lipolítica en el ensayo semicuantitativo se identificaron a nivel molecular.

Como primer paso, se logró extraer material genético en buena cantidad y calidad. La concentración del ADN extraído para todos los aislamientos fue de $1196 \pm 0,02 \mu\text{g/ml}$ y la

relación Abs260/Abs280 fue 1,73 denotando la pureza de las mismas; pudiéndose observar bandas nítidas en geles de agarosa al 1%, correspondientes al ADN genómico de los siete aislamientos (datos no mostrados).

Luego se procedió a la amplificación de tres marcadores moleculares y la construcción de árboles para su identificación.

Para la amplificación por PCR de la región ITS1-5,8S-ITS2 se utilizaron los cebadores universales ITS 1 e ITS 4 (White *et al.*, 1990). Cuando los productos obtenidos se separaron electroforéticamente en geles de agarosa al 2% p/v, se visualizó una banda única, la cual fue secuenciada y analizada bioinformáticamente (datos no mostrados).

Mediante estos análisis, se obtuvieron secuencias de diferentes tamaños que se depositaron en la base de datos del *GenBank NCBI* (**Tabla 6**).

Tabla 6. Números de acceso del *GenBank NCBI* correspondientes a los siete aislamientos con el marcador molecular de las regiones ITS.

Aislamiento	Nº de Acceso	Tamaño (pb)
LBM 068	MW029645	379
LBM 069	MW029732	379
LBM 070	MW033331	379
LBM 073	MW033383	379
LBM 079	MW328523	487
LBM 081	MT952959	477
LBM 088	MW340940	867

En primera instancia y luego de realizar los análisis bioinformáticos pertinentes, los datos obtenidos con la secuenciación de las regiones ITS, no permitieron la identificación a nivel de especie de cada aislamiento. Por lo que se decidió emplear dos marcadores moleculares adicionales para la construcción de secuencias concatenadas para lograr la identificación más precisa.

Para ello, se utilizaron los marcadores Bt y CMD; en el caso particular de los aislamientos LBM 081 y LBM 088 no se logró la amplificación con el marcador CMD, por lo que se requirió el uso del marcador molecular *Rpb2* con el cual se logró una correcta amplificación y secuenciación (**Tabla 7**).

Tabla 7. Números de acceso del *GenBank NCBI* correspondientes a los siete aislamientos con los marcadores moleculares adicionales Bt, CMD, Rpb2

Aislamiento	N° de Acceso	Marcador molecular empleado
LBM 068	MW035700	Bt
	MW035704	CMD
LBM 069	MW035701	Bt
	MW035705	CMD
LBM 070	MW035702	Bt
	MW035706	CMD
LBM 073	MW035703	Bt
	MW035707	CMD
LBM 079	MW363880	Bt
	MW363881	CMD
LBM 081	MT955993	Bt
	MT955992	Rpb2
LBM 088	MW363882	Bt
	MW363883	Rpb2

Para la correcta identificación de los aislamientos LBM 068, LBM 069, LBM 070, LBM 073, LBM 079, LBM 081, LBM 088 se construyeron árboles concatenados a partir del alineamiento múltiple de secuencias obtenidas en este trabajo y secuencias almacenadas en las bases de datos públicas.

Los árboles concatenados construidos con el método de NJ mostraron el posicionamiento de los aislamientos LBM 068, LBM 069, LBM 070, LBM 073 con *Penicillium crustosum* (N° de acceso MG554296.1)(90, 95, 95, 97 % de identidad respectivamente) con un *bootstrap* de 94, 95, 92 y 92 respectivamente (**Figura 12, 13, 14 y 15**).

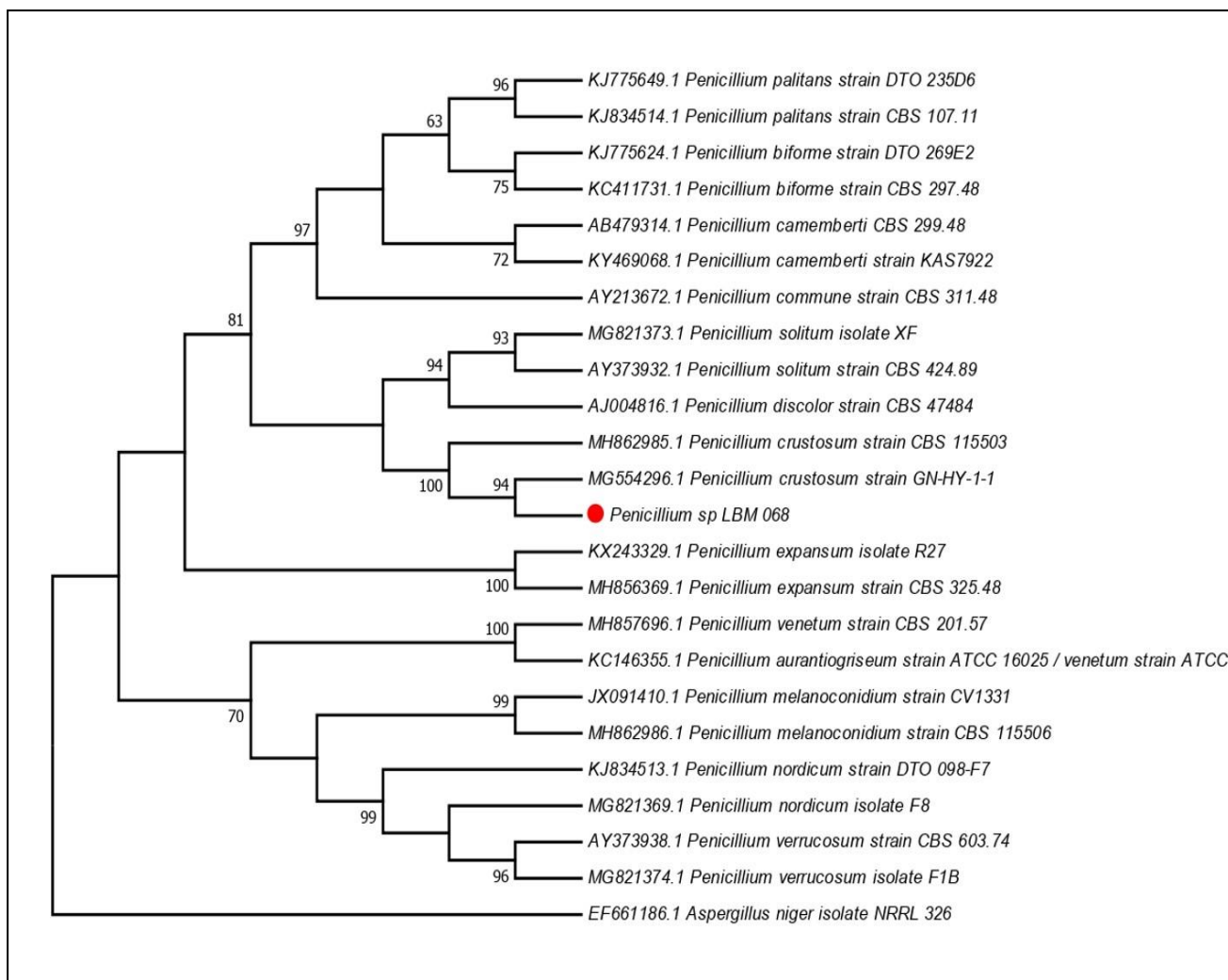


Figura 12. Árbol de las secuencias concatenadas de **ITS**, **Bt** y **CMD** obtenido por el método NJ. El alineamiento múltiple se realizó entre las secuencias de *Penicillium* sp. LBM 068 (señalado con un punto rojo) y secuencias obtenidas de *GenBank* (NCBI).

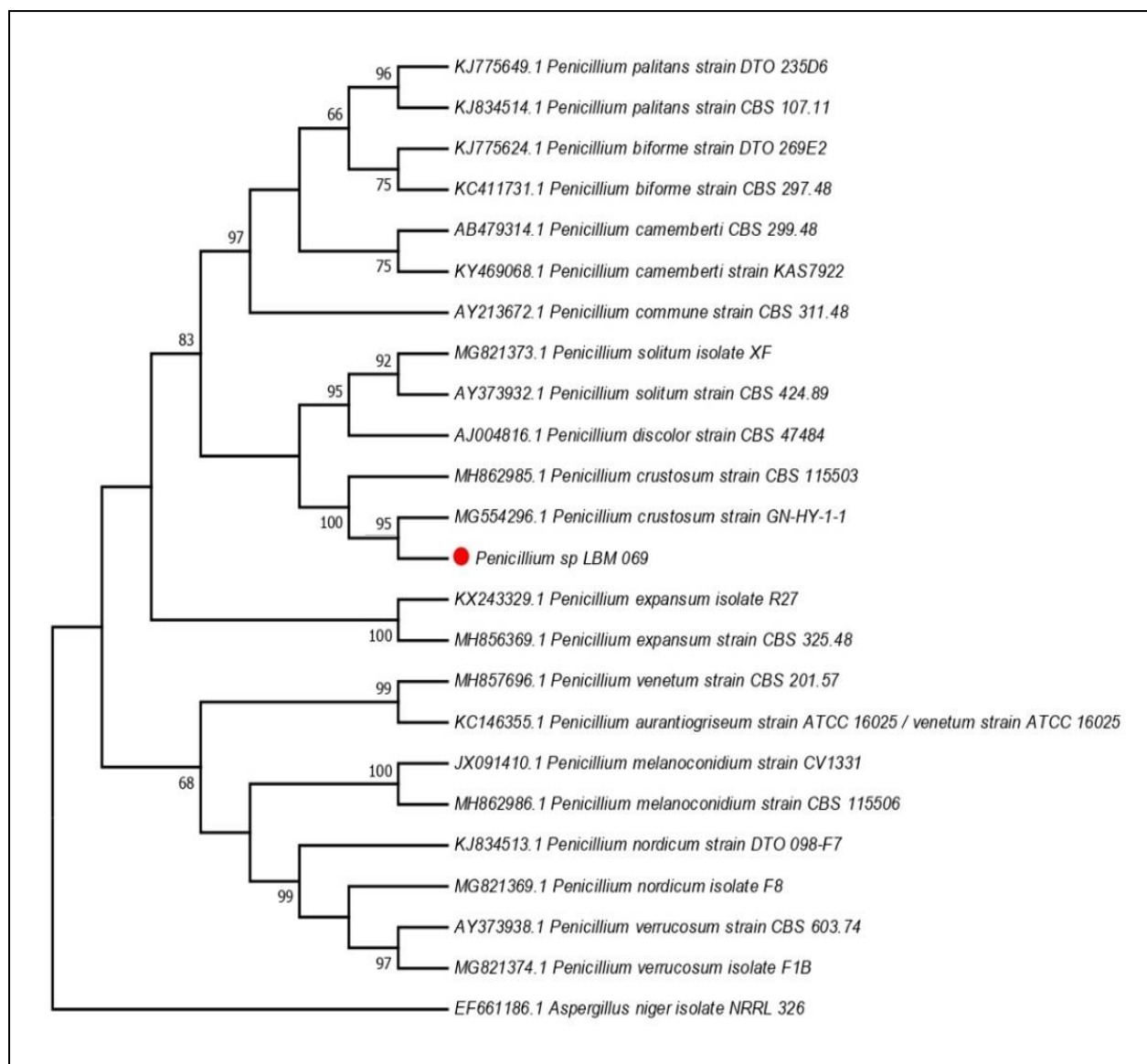


Figura 13. Árbol de las secuencias concatenadas de ITS, Bt y CMD obtenido por el método NJ. El alineamiento múltiple se realizó entre las secuencias de *Penicillium* sp. LBM 069 (señalado con un punto rojo) y secuencias obtenidas de *GenBank* (NCBI).

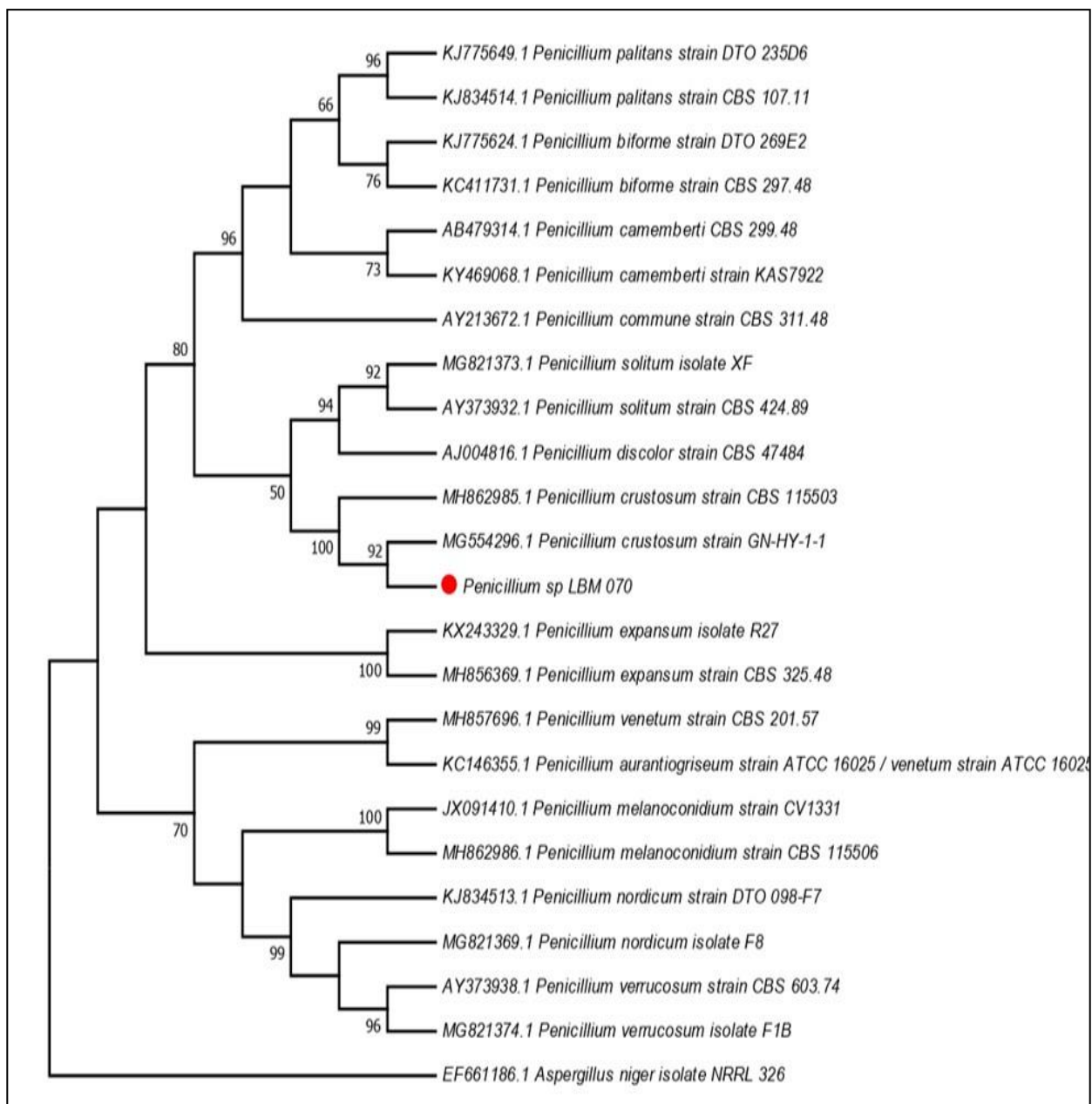


Figura 14. Árbol de las secuencias concatenadas de **ITS, Bt y CMD** obtenido por el método NJ. El alineamiento múltiple se realizó entre las secuencias de *Penicillium* sp. LBM 070 (señalado con un punto rojo) y secuencias obtenidas de *GenBank* (NCBI).

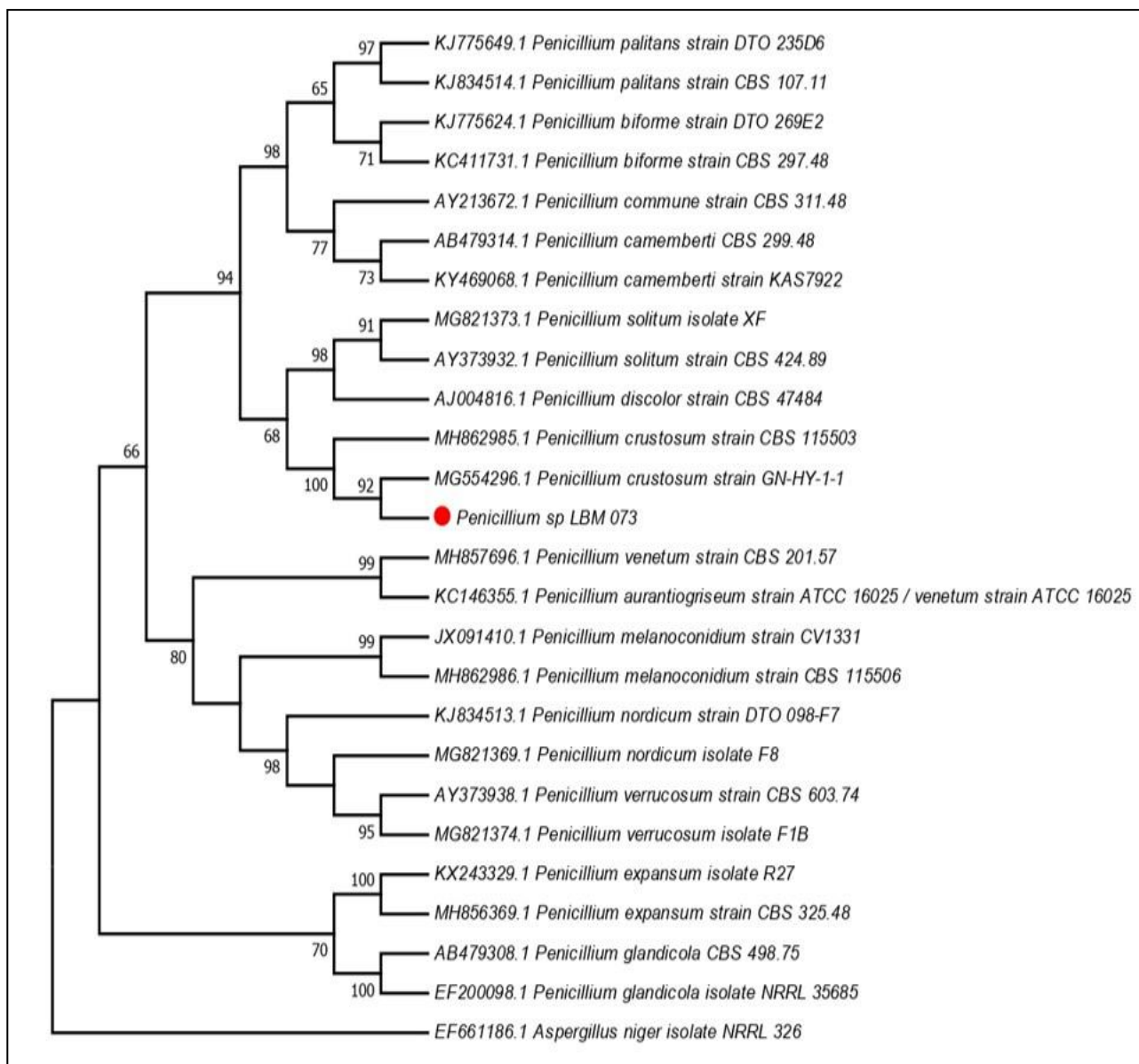


Figura 15. Árbol de las secuencias concatenadas de **ITS, Bt y CMD** obtenido por el método NJ. El alineamiento múltiple se realizó entre las secuencias de *Penicillium* sp. LBM 073 (señalado con un punto rojo) y secuencias obtenidas de *GenBank* (NCBI).

En el caso del aislamiento *Penicillium* sp. LBM 079, el árbol concatenado resultante con los marcadores moleculares ITS-Bt-CMD demostró un fuerte posicionamiento de este aislamiento con un *bootstrap* de 99 con *Penicillium discolor* (N° de acceso AJ004816.1) (95 % de identidad) (**Figura 16**) por lo que este aislamiento corresponde a esta especie.

Para la identificación de los aislamientos LBM 081 y LBM 088, se utilizaron los marcadores ITS y Bt, sin embargo no se logró amplificar el marcador molecular CMD; por lo cual se amplificó y usó el marcador Rpb2. En una primera aproximación de la identificación con el marcador ITS se llegó a conocer que ambos aislamientos pertenecían a la sección *Chrysogena*,

con esta aproximación y el empleo de las secuencias obtenidas con los marcadores adicionales se construyeron los árboles concatenados ITS-Bt-Rpb2 correspondientes utilizando el método de NJ. De esta manera se logró posicionar al aislamiento LBM 081 con un *bootstrap* de 96 como *Penicillium rubens* (N° de acceso JX996671.1, JX996669.1) (98% de identidad) (**Figura 17**) y al aislamiento LBM 088 con un *bootstrap* de 96 como *Penicillium chrysogenum* (N° de acceso JN121487.1) (97 % de identidad) (**Figura 18**).

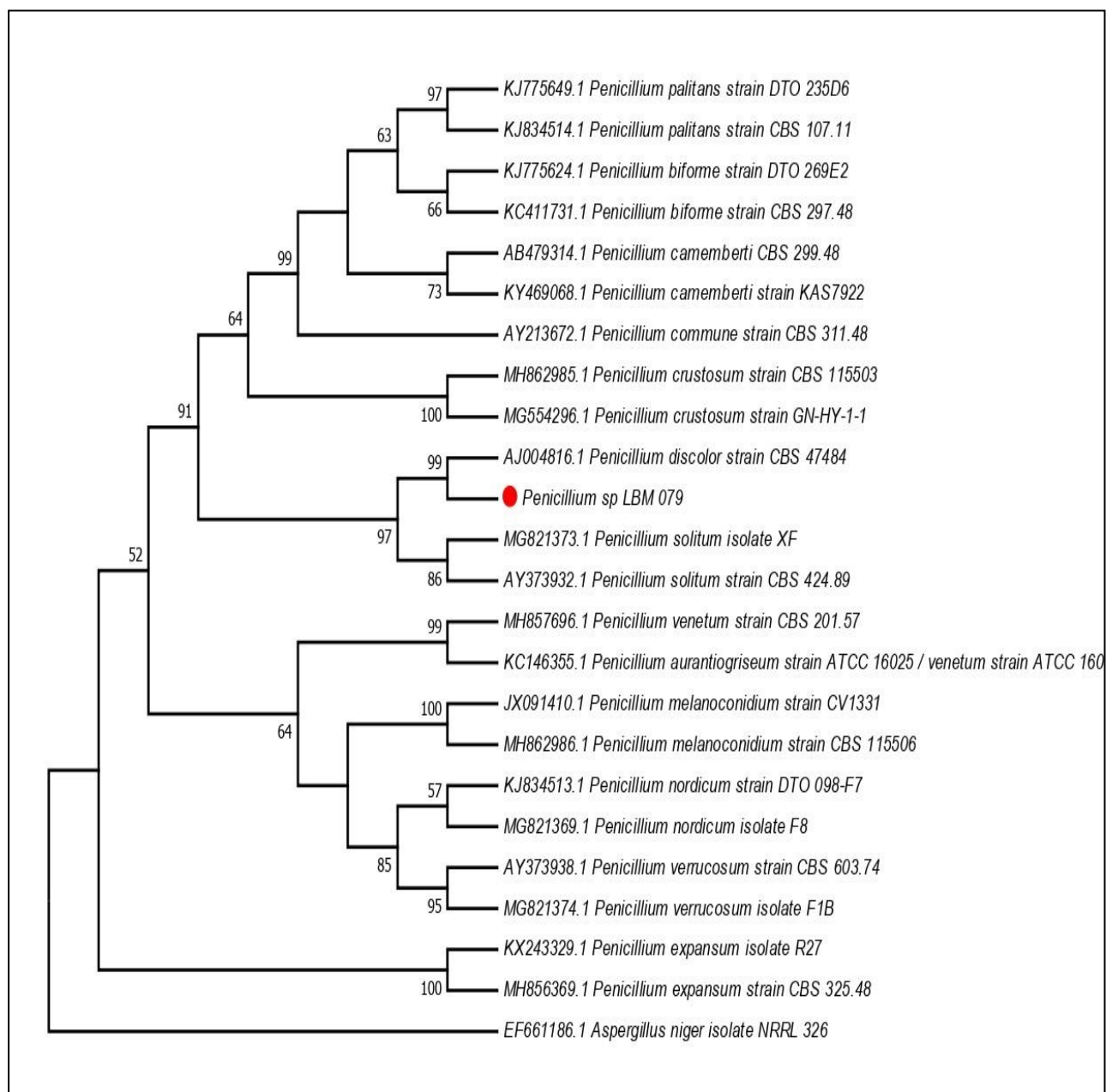


Figura 16. Árbol de las secuencias concatenadas de ITS, Bt y CMD obtenido por el método NJ. El alineamiento múltiple se realizó entre las secuencias de *Penicillium* sp. LBM 079 (señalado con un punto rojo) y secuencias obtenidas de *GenBank* (NCBI).

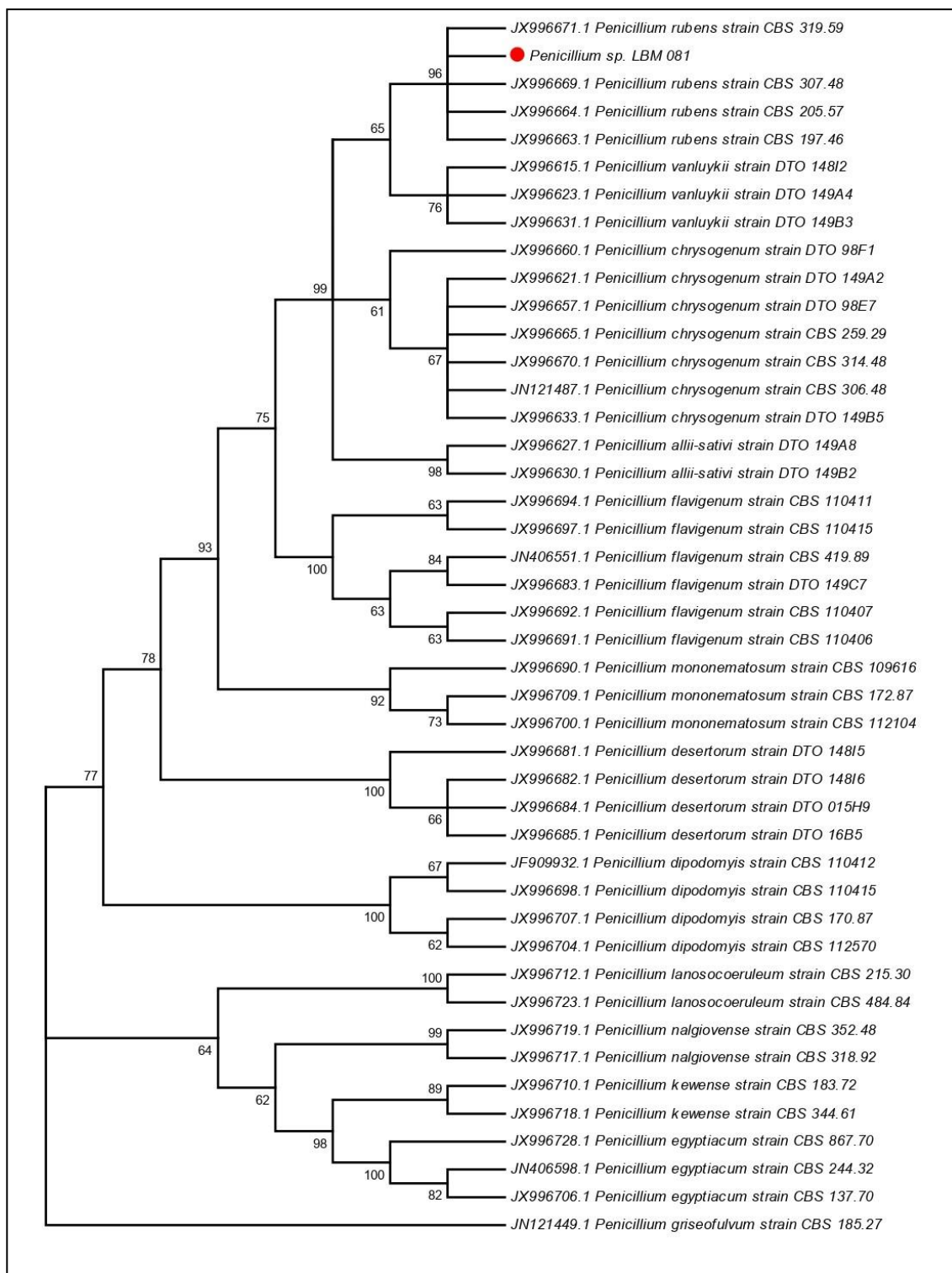


Figura 17. Árbol de las secuencias concatenadas de ITS, Bt y Rpb2 obtenido por el método NJ. El alineamiento múltiple se realizó entre las secuencias de *Penicillium sp.* LBM 081 (señalado con un punto rojo) y secuencias obtenidas de *GenBank* (NCBI).

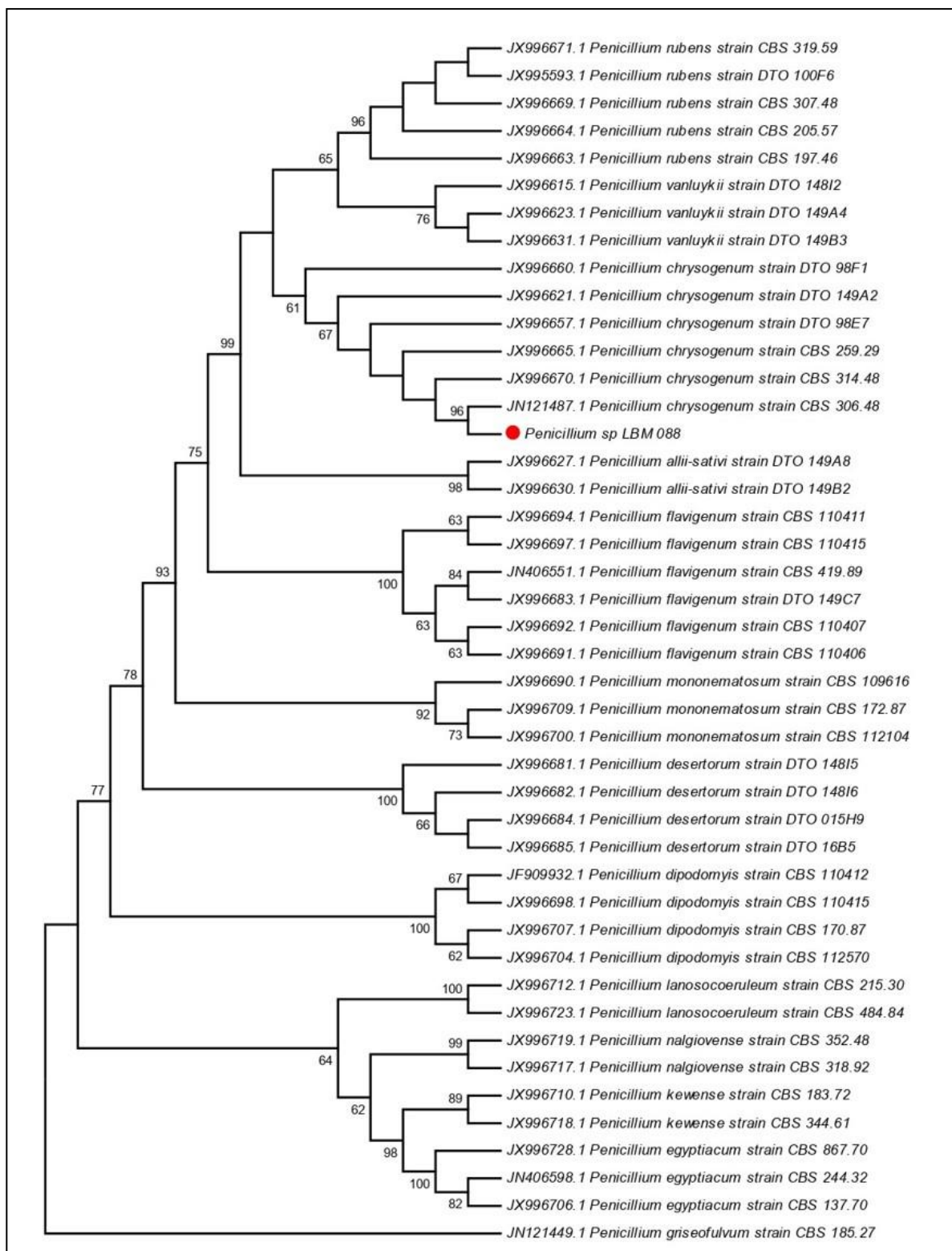


Figura 18. Árbol de las secuencias concatenadas de **ITS, Bt y Rpb2** obtenido por el método NJ. El alineamiento múltiple se realizó entre las secuencias de *Penicillium* sp. LBM 088 (señalado con un punto rojo) y secuencias obtenidas de *GenBank* (NCBI).

En base a los árboles concatenados realizados con tres marcadores moleculares, se llegó a la identificación de los siete aislamientos estudiados como: *Penicillium crustosum* LBM 068,

Penicillium crustosum LBM 069, *Penicillium crustosum* LBM 070, *Penicillium crustosum* LBM 073, *Penicillium discolor* LBM 079, *Penicillium rubens* LBM 081, *Penicillium chrysogenum* LBM 088.

5.3 Screening cuantitativo de los hongos seleccionados productores de lipasas en medio líquido

La evaluación de la habilidad lipolítica en medio líquido se realizó con los siete hongos seleccionados (*Penicillium crustosum* LBM 068, *Penicillium crustosum* LBM 069, *Penicillium crustosum* LBM 070, *Penicillium crustosum* LBM 073, *Penicillium discolor* LBM 079, *Penicillium rubens* LBM 081, *Penicillium chrysogenum* LBM 088) a partir del screening en medio sólido descrito anteriormente (sección 5.1.1).

Para ello los ensayos se realizaron con medio líquido PYE suplementado o no con aceite de oliva al 2%. Para todos los hongos se observó que la adición de aceite de oliva 2% aumentó la actividad de la lipasa. La actividad lipasa fue baja en todos los hongos estudiados al cuarto día de incubación tanto en medios suplementados con aceite de oliva como en los no suplementados (**Figura 19**).

Al sexto día de incubación, se observó un pico de actividad lipasa en los hongos *P. rubens* LBM 081 con 1224 U/mL ($P < 0,0001$), *P. crustosum* LBM 070 con 730 U/mL y *P. crustosum* LBM 069 con 644 U/mL ($P < 0,001$), todos ellos en los medios suplementados con aceite de oliva al 2% (**Figura 19**).

En el octavo día de cultivo, se observó que *P. rubens* LBM 081 mantuvo el nivel de actividad lipasa con 1120 U/mL ($P < 0,001$). Por otra parte, otros hongos que en el sexto día no mostraron actividad lipasa prometedora, aumentaron notablemente la producción al octavo día de cultivo. Entre ellos, se destacó *P. crustosum* LBM 073 con 1105 U/mL y *P. discolor* LBM 079 con 941 U/mL ($P < 0,001$) (**Figura 19**), aunque estos valores fueron inferiores a los observados en *P. rubens* LBM 081.

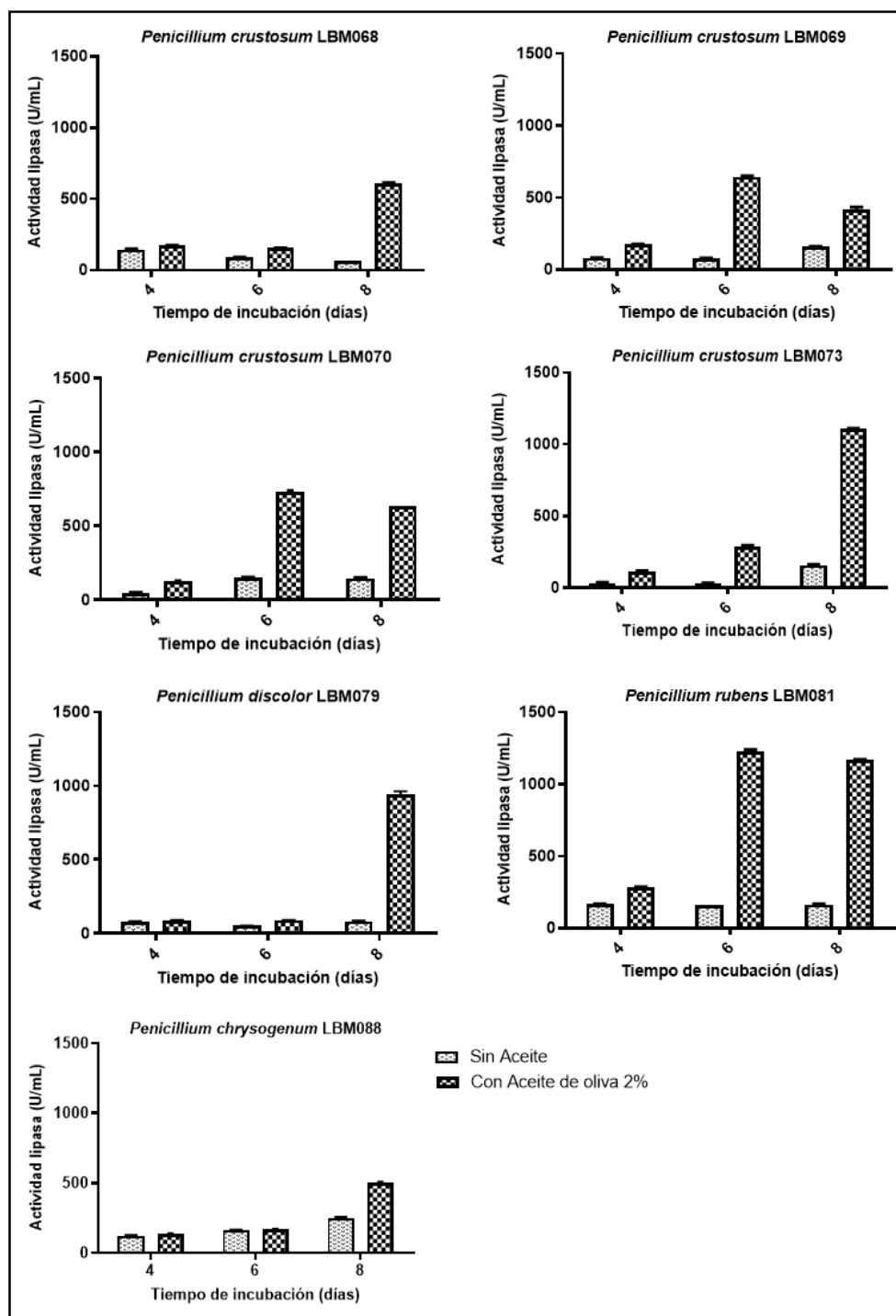


Figura 19. Actividad lipasa correspondiente a los siete hongos seleccionados con el mejor IAL a los 4, 6 y 8 días de incubación. Cada ensayo se realizó en medio líquido PYE con y sin la adición de aceite de oliva 2%.

5.3.1 Caracterización bioquímica de la actividad lipolítica presente en los sobrenadantes de los hongos seleccionados

Para la caracterización bioquímica de la actividad lipolítica presente en los sobrenadantes se seleccionaron los días que mostraron los máximos niveles de actividad para cada ensayo.

En esta etapa se evaluaron los perfiles isoenzimáticos y el peso molecular de lipasas presentes en los sobrenadantes utilizando MUF-butirato como sustrato.

Además, la temperatura y el pH son dos factores principales que afectan la actividad enzimática y deben estudiarse para luego aplicar eficientemente las enzimas en cualquier proceso biotecnológico. Por lo tanto, se estudió el efecto de la temperatura y del pH sobre la actividad lipasa de los sobrenadantes que mostraron mejor actividad lipasa de los siete aislamientos y sus efectos en el tiempo, termoestabilidad y estabilidad en función del pH.

5.3.3.1 Determinación del perfil de isoenzimas y peso molecular

Para verificar la posible presencia de isoenzimas de lipasa y su respuesta diferencial a la inducción con aceite de oliva al 2%, se realizaron análisis en geles de SDS-PAGE con MUF-butirato como sustrato que revelaron la existencia de isoenzimas de diferentes pesos moleculares. El cuarto día de cultivo no se pudo observar ninguna banda en el zimograma en ninguno de los siete aislamientos mientras que al sexto y octavo día se observaron diferentes patrones isoenzimáticos, que variaron según el hongo, la presencia de aceite de oliva y el día de cultivo.

En los hongos *P. crustosum* LBM 068 y *P. crustosum* LBM 069 se observó una enzima de 33 kDa tanto en presencia como en ausencia de aceite de oliva en el sexto día de cultivo. Al octavo día de cultivo también se observó la enzima de 33 kDa en ausencia de aceite de oliva mientras que en presencia del aceite se observó una enzima diferente movilidad con un peso de 42 kDa (**Figura 20**).

En *P. crustosum* LBM 070 y *P. rubens* LBM 081 se observó una enzima de 33 kDa en ausencia de aceite de oliva, mientras que en presencia del aceite sólo se observó una enzima de 42 kDa al sexto y octavo día de cultivo.

En *P. crustosum* LBM 073 no se observó banda al sexto día de cultivo en ausencia de aceite de oliva, mientras que en el ensayo con aceite de oliva se observó una banda de 33 kDa. Esta misma banda también se observó en ausencia y presencia de aceite de oliva en el octavo día de cultivo.

En el caso de *P. discolor* LBM 079, se observó la presencia de una isoenzima de 26 kDa el sexto día de cultivo en presencia y ausencia de aceite de oliva, mientras que al octavo día se observó una enzima de 37 kDa en ambos medios.

En *P. chrysogenum* LBM 088, se observó una isoenzima de 31 kDa en ausencia de aceite de oliva, mientras que una isoenzima de 41 kDa se observó en el ensayo con aceite de oliva. Este perfil se obtuvo tanto para el sexto día como para el octavo día de cultivo.

En los aislamientos *P. crustosum* LBM 068 y *P. crustosum* LBM 069, se observó la aparición de una banda de 42 kDa al octavo día de cultivo solo en presencia de aceite de oliva como se mencionó anteriormente. Este mismo perfil se observó tanto al sexto como al octavo día de cultivo con la adición de aceite de oliva en *P. crustosum* LBM 070 y *P. rubens* LBM 081. En *P. discolor* LBM 079 y *P. chrysogenum* LBM 088 también se observó una banda de mayor peso molecular en los cultivos con la adición de aceite de oliva pero con pesos moleculares diferentes. Cabe destacar que se observó las diferencias en los perfiles según cada aislamiento analizado. Por otro lado, el aislamiento *P. crustosum* LBM 073 mostro una sola enzima, ya sea con la adición de aceite de oliva o en diferentes días de cultivo (**Figura 20**).

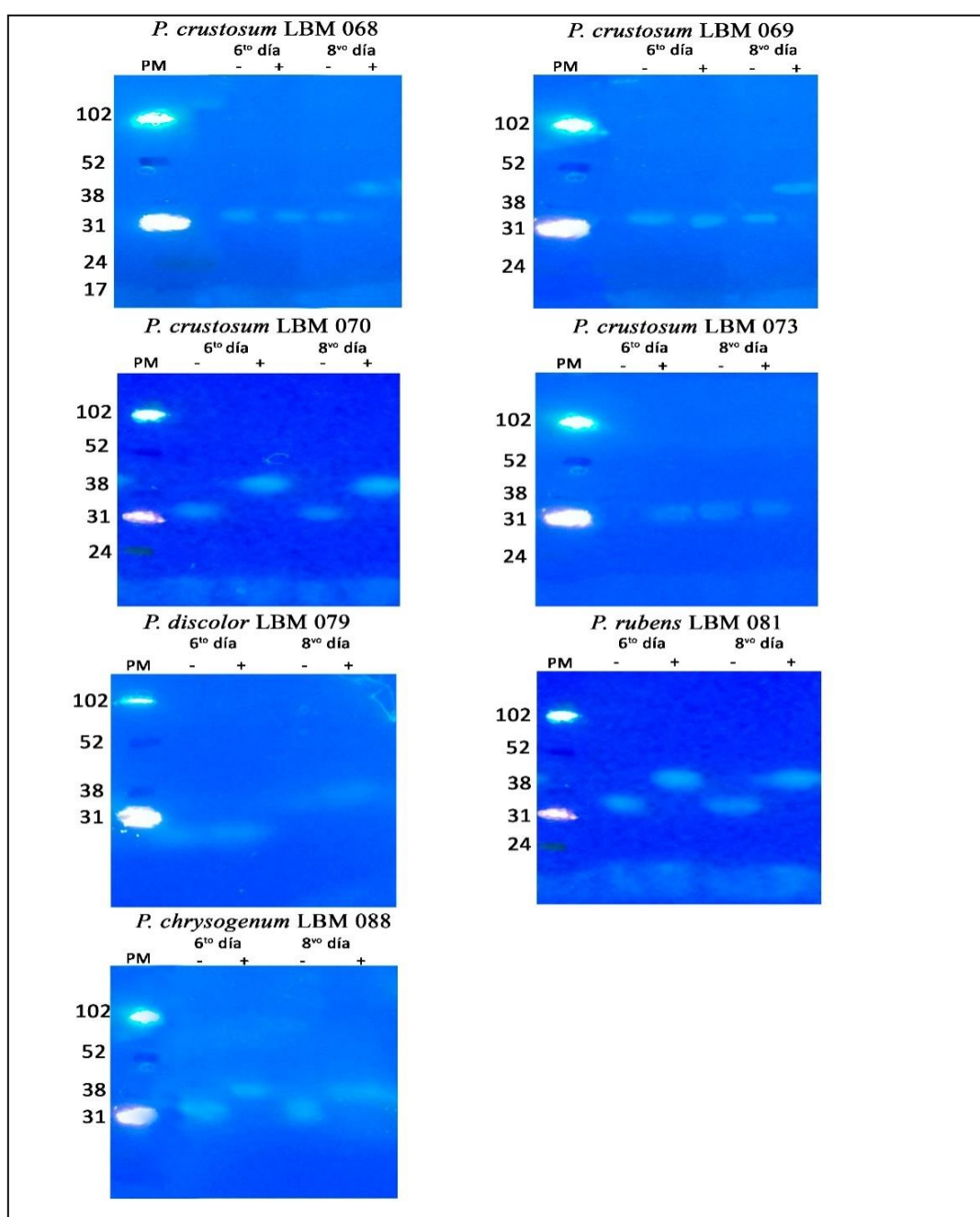


Figura 20. Detección de lipasa por zimogramas en geles SDS-PAGE. Las bandas de lipasas se detectaron por fluorescencia con MUF-butirato. Se observan las bandas correspondientes a los días 6 y 8. Los signos - y + indican la ausencia o presencia de aceite de oliva al 2% en el medio de cultivo; PM: marcador de peso molecular (Amersham ECL rainbow Marker, GE Healthcare).

5.3.3.2 pH óptimo

La máxima actividad enzimática ($P < 0,05$) se encontró en diferentes pH dependiendo del hongo en estudio. En el caso de *P. crustosum* LBM 068 la mayor actividad enzimática fue a pH 7 ($P < 0,05$) (**Figura 21**), al igual que los hongos *P. crustosum* LBM 069 y *P. crustosum* LBM 073 ($p > 0,05$). Mientras que para *P. crustosum* LBM 070, *P. discolor* LBM 079, *P. rubens* LBM 081 y *P. chrysogenum* LBM 088 la mayor actividad enzimática se observó a los pH 7 y 7,5 ($p > 0,05$) ya que no se observó diferencia significativa entre la actividad obtenida con ambos pH (**Figura 21**).

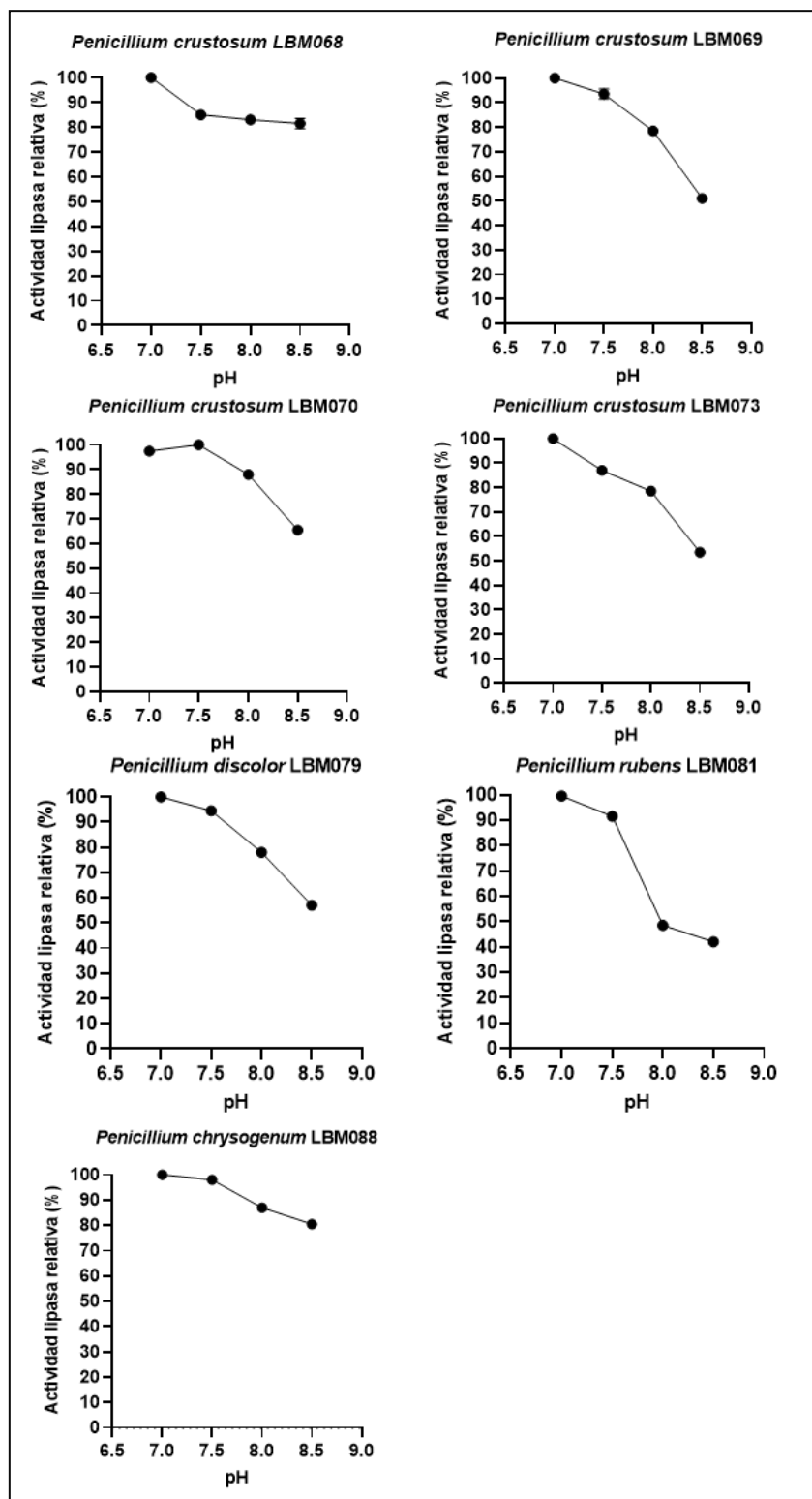


Figura 21. Actividad lipasa relativa a diferentes valores de pH y a 30°C. Los datos son la media \pm desviación estándar de duplicados. El 100 % correspondió a *P. crustosum* LBM 068: 607 U/mL, *P. crustosum* LBM 069: 644 U/mL, *P. crustosum* LBM 070: 730 U/mL, *P. crustosum* LBM 073: 1105 U/mL, *P. discolor* LBM 079: 941 U/mL, *P. rubens* LBM 081: 1224 U/mL, *P. chrysogenum* LBM 088: 500 U/mL.

5.3.3.3 Temperatura óptima

La actividad lipasa máxima ($p < 0,05$) se registraron a diferentes temperaturas según los hongos estudiados. *P. crustosum* LBM 068 mostró una temperatura óptima a 25°C ($p > 0,05$) y para *P. crustosum* LBM 069 fue a 40°C ($p > 0,05$). Mientras que para *P. crustosum* LBM 070, *P. crustosum* LBM 073, *P. discolor* LBM 079, *P. rubens* LBM 081 y *P. chrysogenum* LBM 088 la temperatura óptima fue a 30°C ($p > 0,05$) (Figura 22).

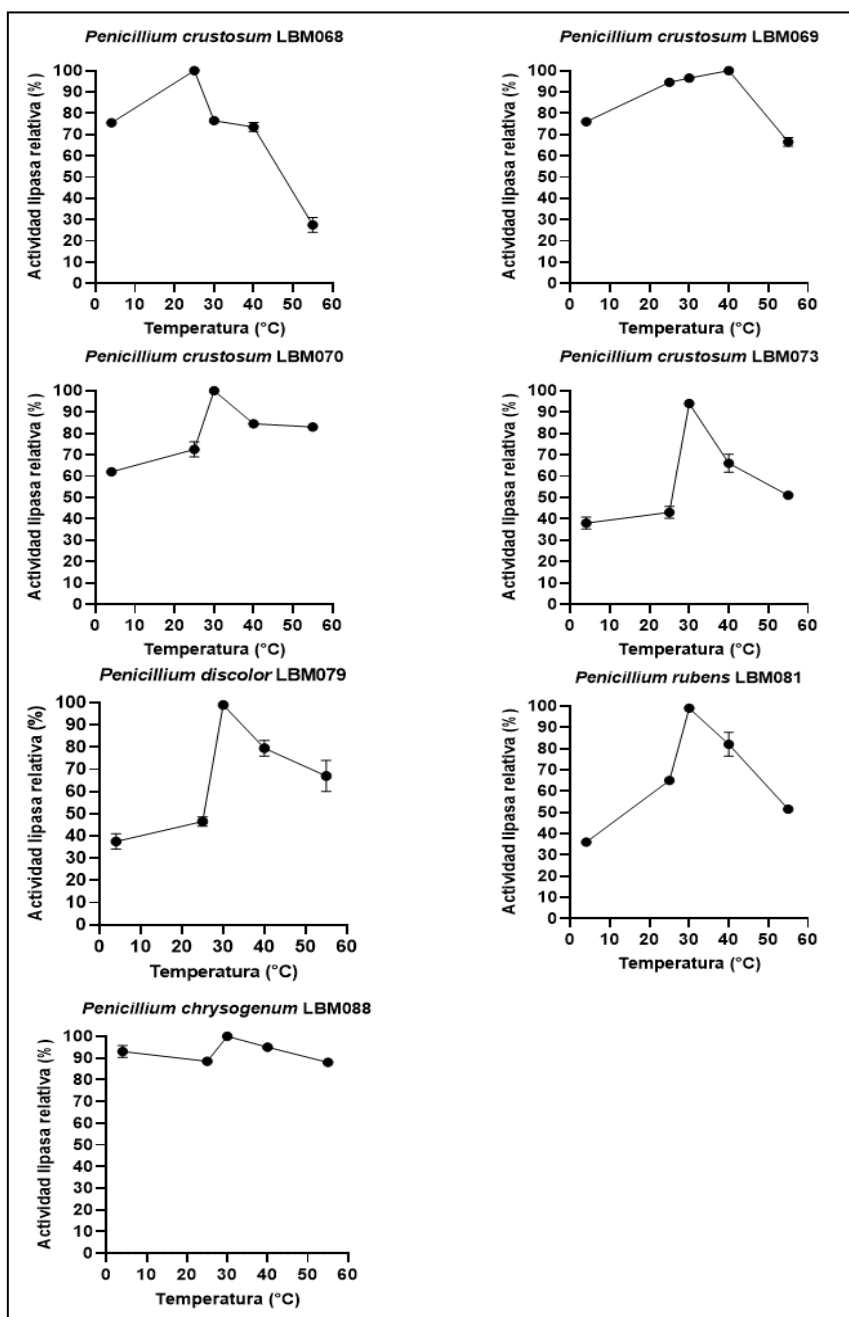


Figura 22. Actividad lipasa relativa a diferentes valores de temperatura y a pH óptimo. Los datos son la media \pm desviación estándar de duplicados. El 100 % correspondió a *P. crustosum* LBM068 607 U/mL, *P. crustosum* LBM 069 644 U/mL, *P. crustosum* LBM 070 730 U/mL, *P. crustosum* LBM 073 1105 U/mL, *P. discolor* LBM 079 941 U/mL, *P. rubens* LBM 081 1224 U/mL, *P. chrysogenum* LBM 088 500 U/mL.

5.3.3.4 Termoestabilidad

La estabilidad de la actividad enzimática de los sobrenadantes seleccionados para cada cepa se evaluó a 30 y 40°C a diferentes intervalos de tiempos hasta las 72 h.

Al evaluar la estabilidad a 30°C en los sobrenadantes enzimáticos obtenidos se observó que la actividad enzimática fue superior o igual al 80% en casi todos los hongos hasta las 24 h salvo *P. crustosum* LBM 073 que mantuvo hasta un 60% de su actividad. Mientras que un descenso al 50% de la actividad enzimática se vio en todos los hongos a las 72 h a 30°C (**Figura 23**).

En cuanto a la termoestabilidad a 40°C se observó que se mantuvo el 80% de la actividad en tres hongos *P. crustosum* LBM 068, *P. crustosum* LBM 069, *P. chrysogenum* LBM 088 transcurridas las 24 h. Mientras que para los otros hongos se observó que la actividad se mantuvo hasta el 60% en el mismo periodo de tiempo (**Figura 23**).

Trascurridas las 72 h de incubación se observó una menor retención de la actividad lipasa en todos los hongos llegando al 50% en casi todos los aislamientos, salvo el aislamiento *P. chrysogenum* LBM 088 que mantiene su actividad en el orden del 80% (**Figura 23**).

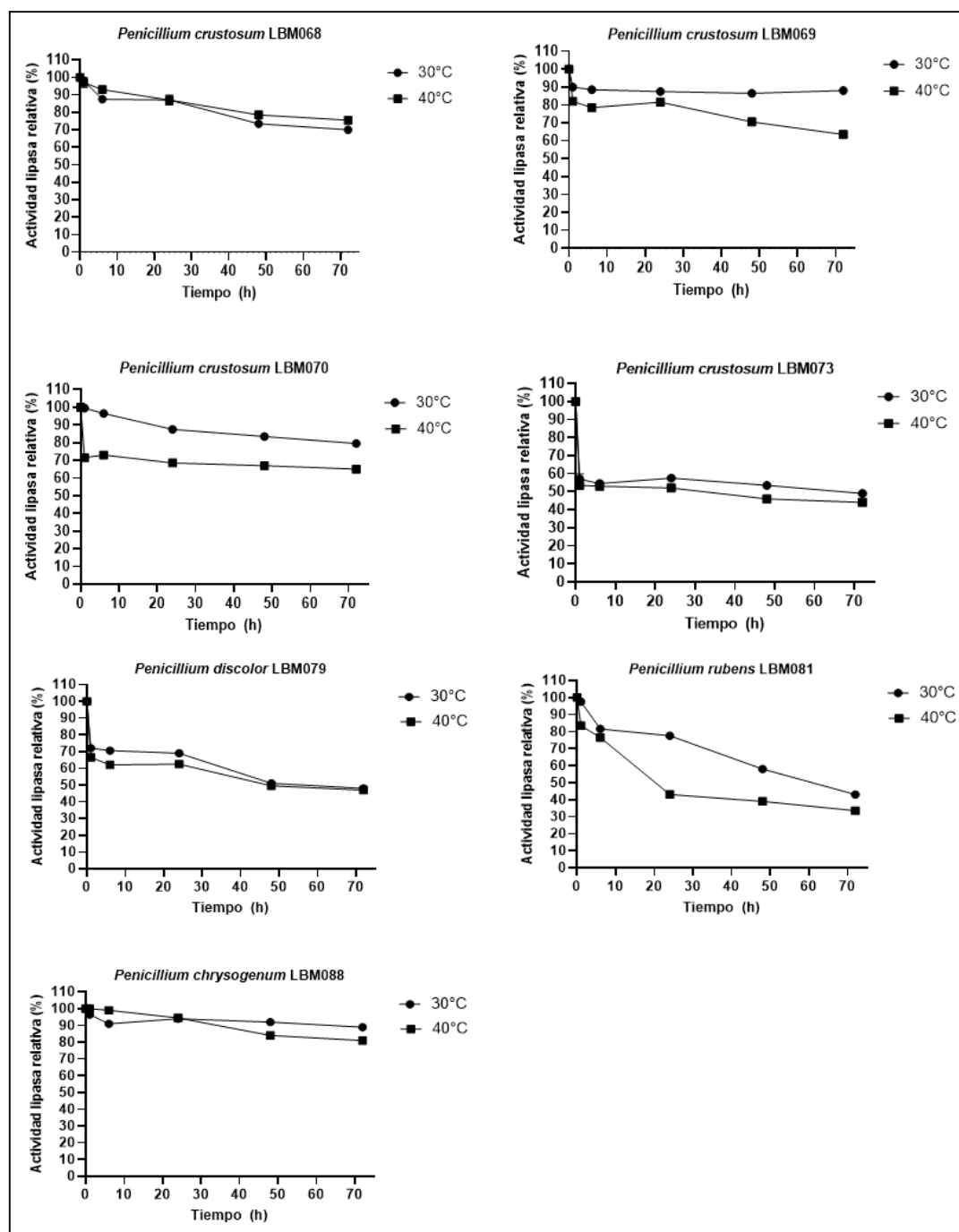


Figura 23. Estabilidad enzimática en el tiempo cuando el sobrenadante se incubó a 30°C y 40°C de los siete hongos seleccionados.

5.3.3.5 Estabilidad en pH

La actividad enzimática residual fue definida como el porcentaje de actividad enzimática medida en un tiempo dado con respecto a la actividad enzimática en el tiempo inicial (cero). Para determinar la estabilidad enzimática, el sobrenadante se incubó a distintos pHs y se determinó la actividad lipasa en diferentes intervalos de tiempo.

A pH 7 se observó que la actividad enzimática se mantuvo en un 90% en *P. crustosum* LBM 068, *P. crustosum* LBM 069 y *P. chrysogenum* LBM 088 a las 24 h. Mientras que para *P. crustosum* LBM 070, *P. crustosum* LBM 073, *P. discolor* LBM 079, *P. rubens* LBM 081 se observó que la actividad se mantuvo en un 70% en el mismo periodo de tiempo (24h). Y a un 50% en todos los hongos a las 72 h (**Figura 24**).

A pH 7,5 la actividad enzimática del sobrenadante de *P. crustosum* LBM 069 se mantuvo en un 90% a las 24 h de incubación. Mientras que se observó que la actividad de los sobrenadantes en *P. crustosum* LBM 068, *P. rubens* LBM 081 y *P. chrysogenum* LBM 088 se mantuvo en un 80%. Y los sobrenadantes de *P. crustosum* LBM 070, *P. crustosum* LBM 073 y *P. discolor* LBM 079 se mantuvo en un 65% en el mismo tiempo de incubación. Mientras a las 48 h se observa que la actividad de *P. crustosum* LBM 068 se mantuvo en un 75%, mientras que para los hongos *P. crustosum* LBM 069 y *P. chrysogenum* LBM 088 un 80% de su actividad se mantuvo transcurridas 48 h. Y para los hongos *P. crustosum* LBM 070, *P. crustosum* LBM 073, *P. discolor* LBM 079 y *P. rubens* LBM 081 se observó que se mantuvo un 60% de la actividad en el mismo periodo de tiempo (**Figura 24**).

Para el pH 8 se observa una caída abrupta de la actividad lipasa y solo se mantuvo un 40% de la actividad para *P. crustosum* LBM 073 a las 24 h, mientras que para los restantes hongos se observan que mantienen entre un 70 y 60 % de la actividad en el mismo periodo. Mientras que a las 72 h se observa un que solo un 20 % de la actividad se mantiene en los hongos *P. crustosum* LBM 068 y *P. crustosum* LBM 070. Y los restantes aislamientos mantienen solo un 50% de su actividad enzimática a las 72h (**Figura 24**).

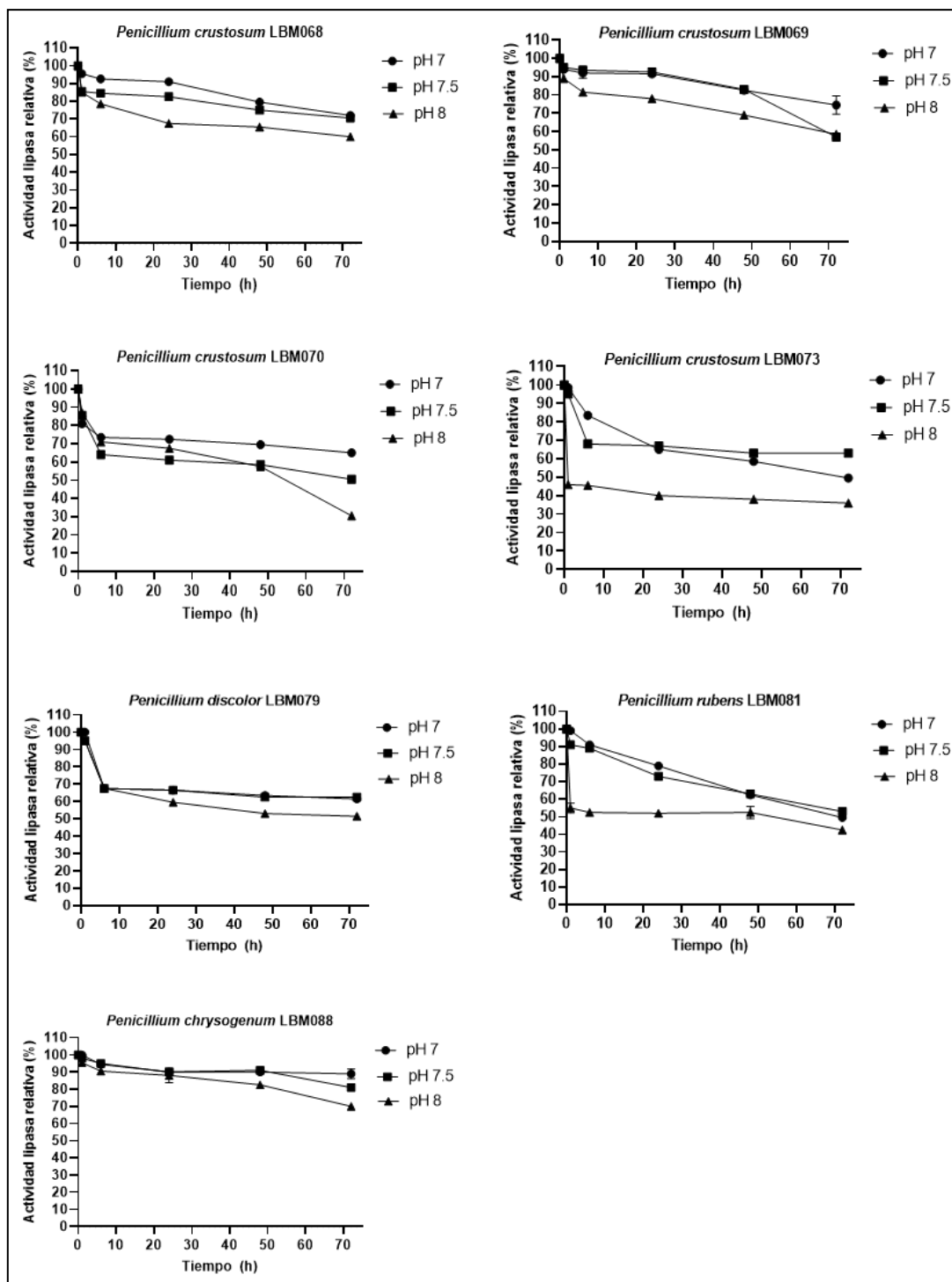


Figura 24. Estabilidad enzimática en el tiempo cuando el sobrenadante se incubó a pH 7; 7,5 y 8 de los siete hongos seleccionados.

En base a la información obtenida y analizada con los diferentes ensayos de actividad lipolítica y características bioquímicas observadas se decidió continuar los ensayos con un hongo de los siete previamente seleccionados. En este caso *P. rubens* LBM 081 evidencio la mayor actividad enzimática (1120 U/mL) en menor cantidad de días de cultivo (6 días), condiciones de

crecimiento optimas a pH 7 y temperatura de 30°C, así como también una alta estabilidad frente a temperaturas de 30 y 40 °C y pH 5 y 7 que permiten una potencial aplicación.

5.4 Evaluación del efecto de diferentes variables nutricionales y físicas sobre la actividad lipasa del hongo seleccionado *Penicillium rubens* LBM 081

5.4.1 Evaluación del efecto de diferentes aceites sobre la actividad lipasa producida por *Penicillium rubens* LBM 081

Para determinar componentes del medio de cultivo que favorezcan la producción de lipasa, se llevó a cabo una selección de fuentes de carbono como potenciadores de la actividad lipasa. Se evaluó el efecto de siete aceites diferentes: aceite de girasol, aceite de hígado de bacalao, aceite de maní; aceite de canola, aceite de maíz, aceite de chía, aceite de oliva adicionados al 2%. Los ensayos en medios líquidos se realizaron con cada uno de los aceites por separado y con un control sin el agregado de aceite durante 8 días, con toma de alícuotas a los 4 y 6 días. En todos los casos se observó que el agregado de aceite mostró incrementó la actividad lipasa.

Del análisis de la actividad obtenida el día 4 de cultivo se observó una mayor actividad de 1148 U/mL ($P < 0,05$) con el agregado de aceite de oliva, mientras que con la adición de aceite de chía se observó una actividad de 808 U/mL ($P < 0,05$) como segunda una actividad destacada. La adición de los aceites de maní y girasol no mejoraron la actividad lipasa al día 4 de cultivo (**Figura 25**).

En el día 6 se pudo observar la misma tendencia en el incremento de la actividad con el agregado de aceite de oliva y chía con una actividad de 1283 U/mL ($P < 0,05$) y 891 U/mL ($P < 0,05$) respectivamente. Mientras que se observó un pequeño incremento con la adición de aceite de maíz con una actividad de 249 U/mL (**Figura 25**).

En el día 8 de cultivo se observó que la actividad lipasa se mantuvo tanto en ensayo con el agregado de aceite de oliva, como con el agregado de aceite de chía con una actividad de 1230 U/mL y 871 U/mL respectivamente. Mientras que otros aceites como el de maíz, bacalao y canola incrementaron la actividad a 252, 223 y 138 U/mL respectivamente, pero sin llegar a los niveles de actividad obtenidos con los aceites de oliva y chía (**Figura 25**).

En base a los datos analizados y obtenidos se observó que el aceite de oliva al 2% en el día 6 de cultivo produjo la mejor actividad lipasa.

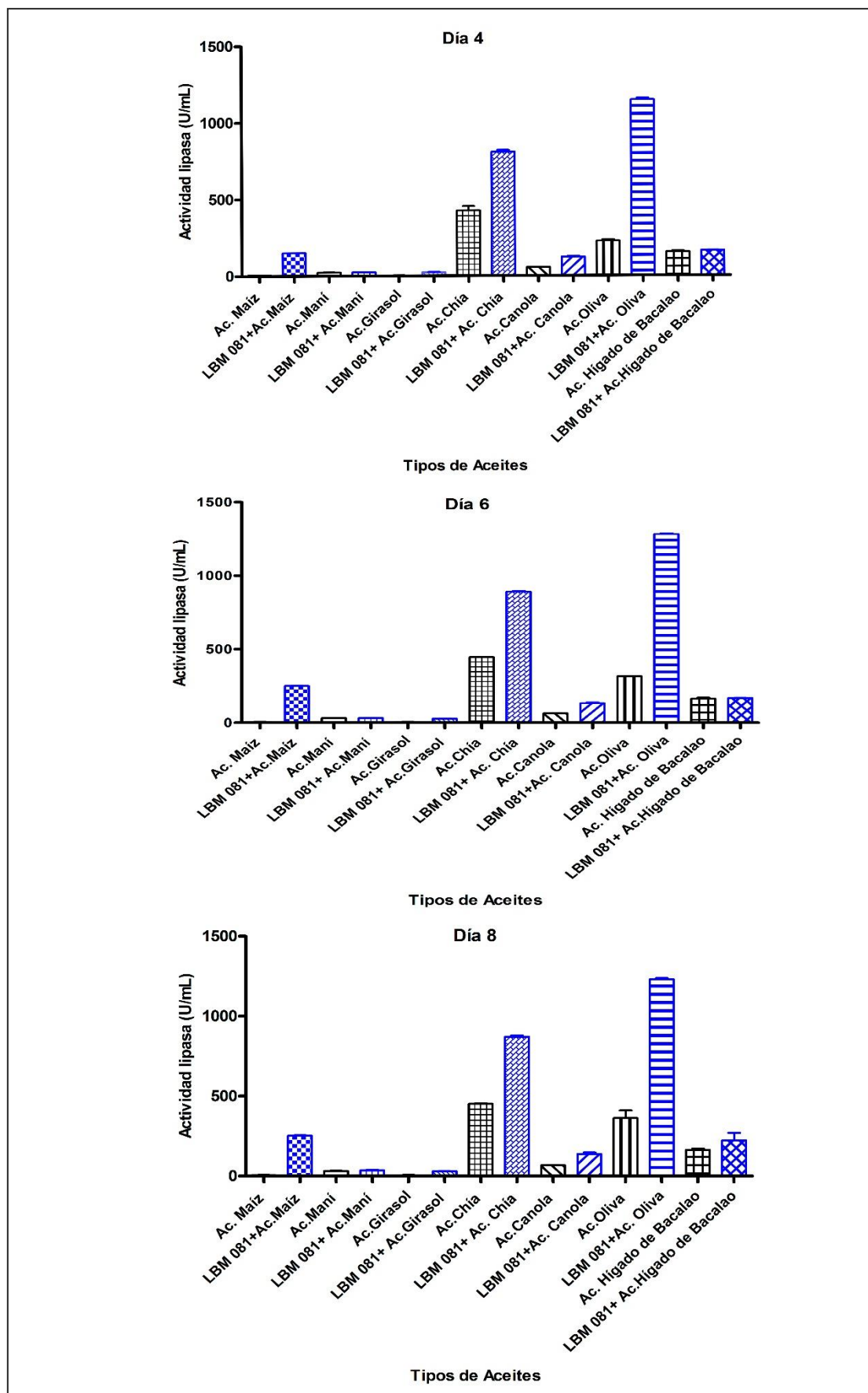


Figura 25. Evaluación de la influencia de diferentes aceites sobre la actividad lipasa en *P. rubens* LBM 081.

5.4.2 Evaluación del efecto de diferentes concentraciones del aceite de oliva sobre la actividad lipasa producida por *Penicillium rubens* LBM 081

Para obtener la concentración adecuada de aceite de oliva que incremente la actividad lipasa se realizaron ensayos con diferentes concentraciones de aceite de oliva. Se evaluaron las concentraciones de 1; 1,5; 3; 3,5; 4; 4,5%, además de la concentración al 2% todos los ensayos fueron incubados durante 8 días a 30°C en agitación constante de 140 rpm, tomando alícuotas a los 4 y 6 días de cultivo.

La adición de aceite de oliva al 4% permitió obtener el mayor incremento en la actividad enzimática al día 6 de cultivo con 1722 U/mL ($P < 0,05$), seguida de la concentración de 3,5 % con una actividad de 1459 U/mL (**Figura 26**).

Mientras que al día 8 la mayor actividad (1461 U/mL $P < 0,05$) se obtuvo con una concentración de 4, 5% (**Figura 26**).

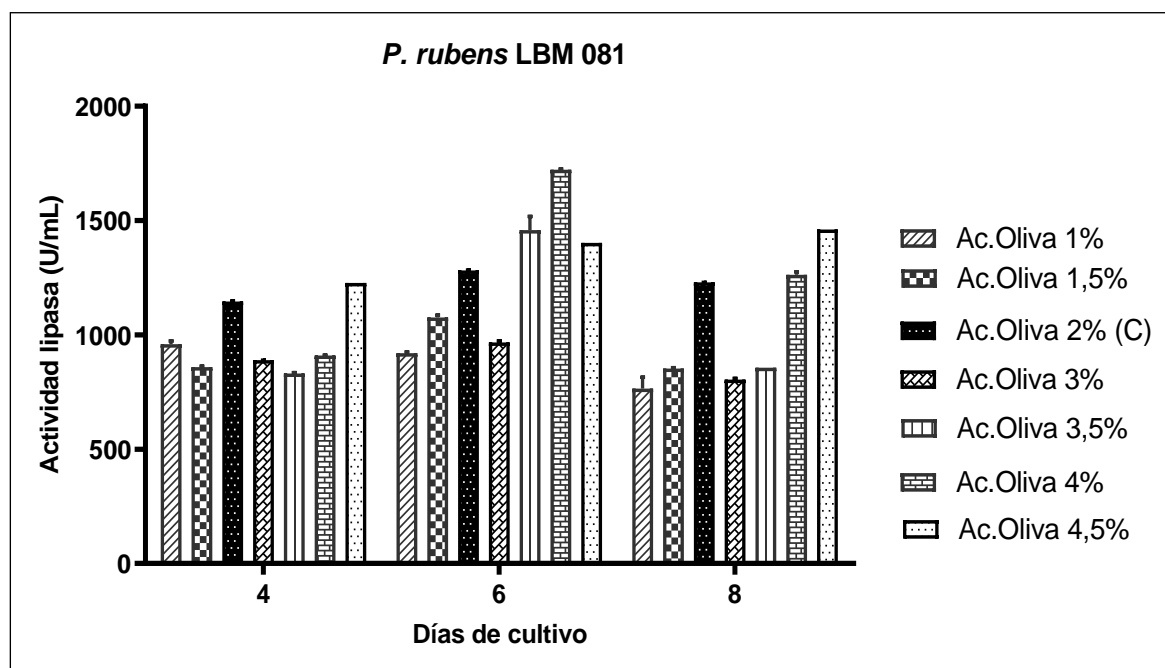


Figura 26. Evaluación de la influencia de diferentes concentraciones de aceite de oliva sobre la actividad lipasa en *P. rubens* LBM 081.

5.4.3 Evaluación del efecto de diferentes fuentes de nitrógeno sobre la actividad lipasa producida por *Penicillium rubens* LBM 081

La concentración de las fuentes de nitrógeno presentes en el medio de cultivo al igual que las fuentes de carbono juegan un rol de gran importancia en la actividad enzimática producida. Es por ello que se realizó la evaluación de cinco fuentes de nitrógeno: extracto de carne, sulfato de amonio, peptona de carne, peptona de soja, extracto de levadura.

Del análisis de la actividad obtenida el día 4 de cultivo se observó una mayor actividad de 2373 U/mL ($P < 0,05$) con el agregado de peptona al 0,3%, mientras que con la adición de 2% de peptona se observó una actividad significativa de 2193 U/mL ($P < 0,05$) al igual que la actividad detectada con peptona de soja al 2%. La adición de sulfato de amonio y extracto de carne no mejoraron la actividad lipasa al día 4 de cultivo (**Figura 27**).

En el día 6 se pudo observar la misma tendencia en el incremento de la actividad con el agregado de peptona al 2% con una actividad de 2881 U/mL ($P < 0,05$). Y con peptona de soja al 2% 2393 U/mL ($P < 0,05$). Mientras que no se observó una variación significativa de actividad con la adición de las restantes fuentes de nitrógeno (**Figura 27**).

En el día 8 de cultivo se observó que la actividad lipasa tuvo un descenso en ensayo con el agregado de peptona 2%, así como con el agregado de peptona de soja 2% con una actividad de 1813 U/mL y 1653 U/mL respectivamente. Mientras que otras fuentes de nitrógeno no mostraron incremento significativo en la actividad lipasa (**Figura 27**).

De los resultados obtenidos se pudo observar que los mejores rendimientos se obtuvieron con con peptona al 2% y aceite de oliva 4% siendo de 2881 U/mL.

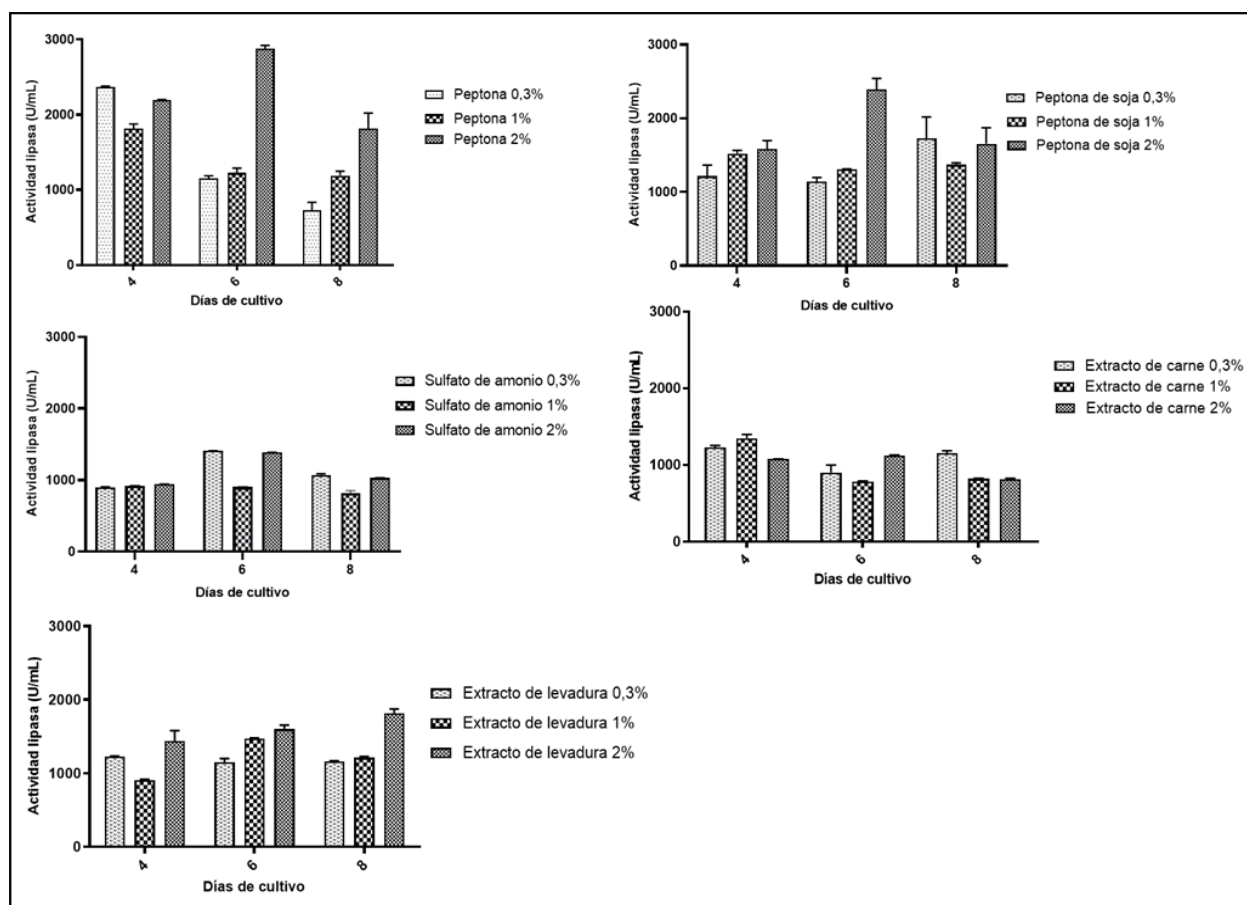


Figura 27. Evaluación de la influencia de diferentes fuentes de nitrógeno sobre la actividad lipasa en *P. rubens* LBM 081.

5.4.4 Evaluación del efecto de diferente concentración de inóculo y agitación sobre la actividad lipasa de *Penicillium rubens* LBM 081

El hongo se creció en presencia de peptona al 2% y aceite de oliva 4% como fue optimizado previamente y se estableció que la concentración del inóculo y la agitación demostraron tener efectos significativo sobre la actividad lipasa ($p < 0,05$) de *P. rubens* LBM 081.

La mayor actividad lipasa se evidenció con una concentración de esporas de 1×10^6 siendo de 2779 U/mL al día 6 de cultivo (**Figura 28**).

La agitación del medio de cultivo produjo una variación significativa ($p < 0,05$) en la actividad lipasa al día 6 y 8 de cultivo cuando se utilizaba una agitación mayor de 140 o 160 rpm ($p < 0,05$) en comparación con una menor agitación de 100 rpm ($p > 0,05$) (**Figura 28**). Además, se identificó la formación de grupos de grumos a una velocidad de agitación de 140 y 160 rpm la cual es importante para la síntesis de la enzima lipasa. Por el contrario, con la menor agitación de 100 rpm, se obtuvieron los micelios dispersos y una menor actividad.

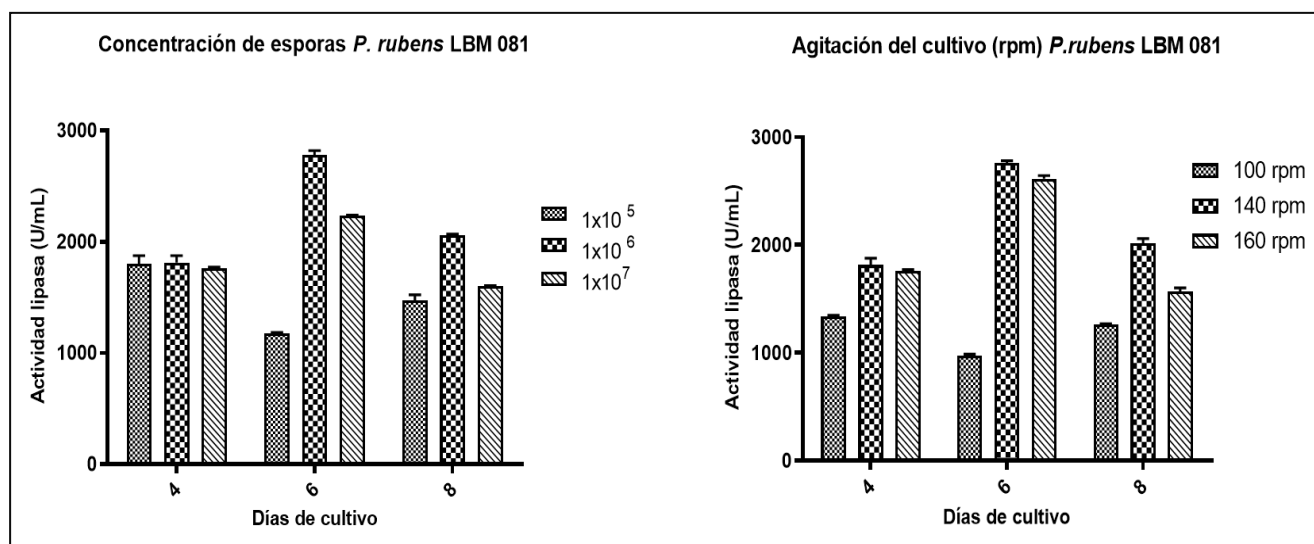


Figura 28. Evaluación de la influencia de la concentración de esporas y agitación sobre la actividad lipasa en *P. rubens* LBM 081

5.5 Caracterización bioquímica de la actividad lipolítica presente el sobrenadante optimizado de *Penicillium rubens* LBM 081

El pH y la temperatura son variables que influyen en la actividad enzimática. Es por ello, que se analizó el efecto de la variación de estos parámetros en la actividad lipasa sobre el sobrenadante de cultivo de *P. rubens* LBM 088 obtenido en las condiciones estandarizadas en el punto 5.4.

5.5.1 pH óptimo

La máxima actividad enzimática lipasa ($P < 0,05$) para *P. rubens* LBM 081 se encontró en los ensayos realizados a pH 7 y 7,5 ($p > 0,05$). Mientras que a pH 8 y 8,5 la actividad se mantuvo en un 30 y 27 % respectivamente (**Figura 29**).

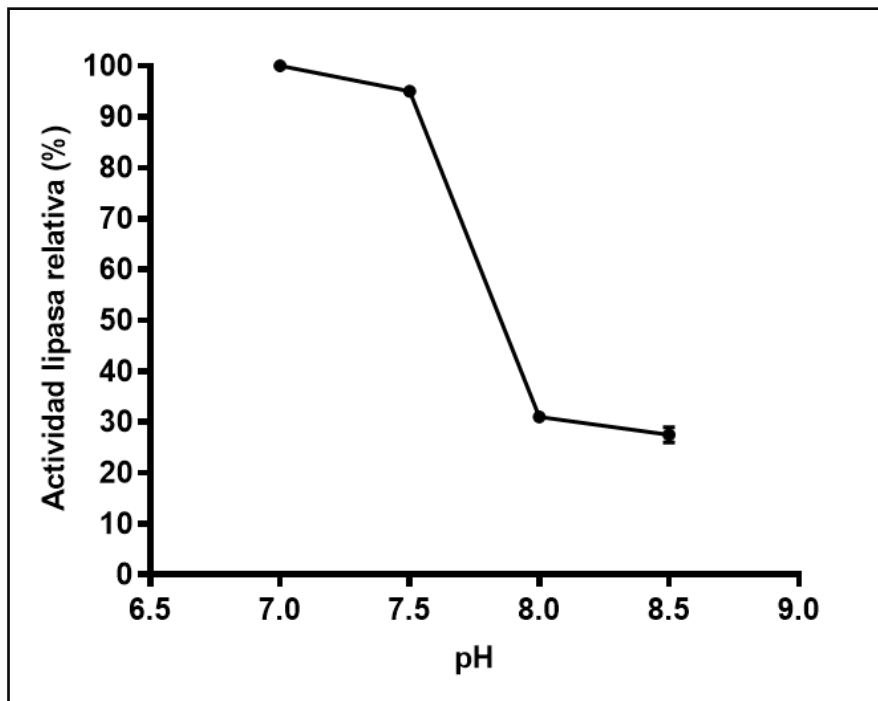


Figura 29. Actividad lipasa relativa a diferentes valores de pH y a 30°C. Los datos son la media \pm desviación estándar de duplicados.

5.5.2 Temperatura óptima

La actividad lipasa máxima de *P. rubens* LBM 081 ($p < 0,05$) se registró a 30°C ($p > 0,05$) considerándose este valor de actividad enzimática como 100% (**Figura 30**). Además se observó que se mantuvo la actividad en un 80 y 65 % en las temperaturas de 40 y 25°C respectivamente (**Figura 30**).

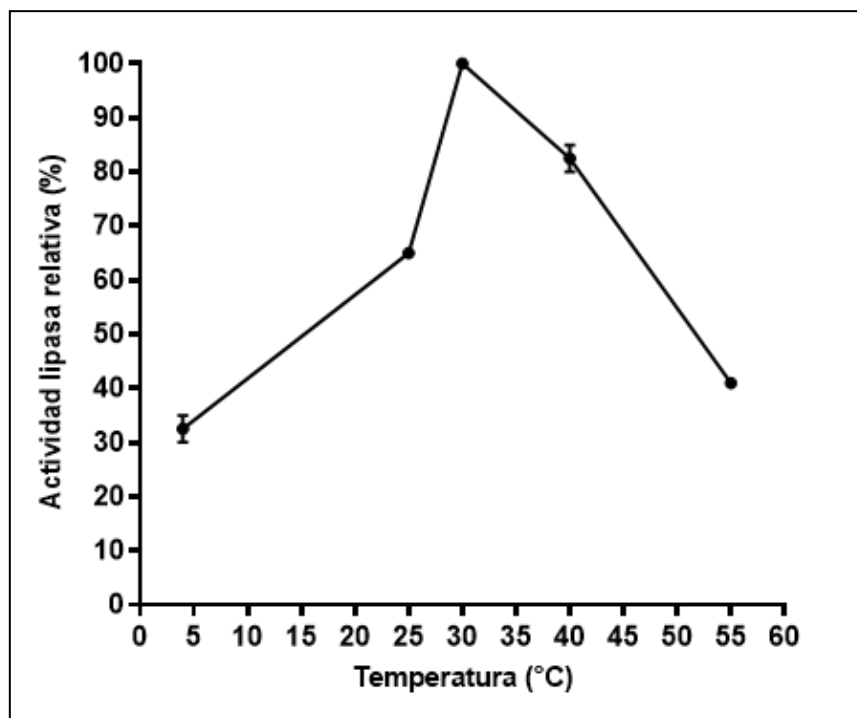


Figura 30. Actividad lipasa relativa a diferentes valores de temperatura y a pH óptimo. Los datos son la media \pm desviación estándar de duplicados.

5.5.3 Termoestabilidad

La estabilidad de la actividad enzimática del sobrenadante de *P. rubens* LBM 081 se evaluó a 4, 25, 30 y 40°C a diferentes intervalos de tiempos hasta las 72 h.

A 4°C se observó que la actividad enzimática lipasa se mantuvo en un 68% al transcurrir 6 h de incubación mientras que a las 12 h se mantuvo un 50% de la actividad y trascurridas las 48 h solo se mantuvo un 34% de la actividad y a las 72 h de incubación se retuvo un 25% de la actividad (**Figura 31**).

En cuanto a la termoestabilidad a 25°C se observó que se mantuvo 87% de la actividad transcurridas 6 h, a las 48 h se mantuvo un 82% de la actividad, mientras que a las 48 y 72 h de incubación se observó que se mantuvo en un 52 y 41 % la actividad enzimática. Mientras que a 30°C se observó que a las 6 h de incubación se mantuvo un 94% de la actividad, a las 12 h se mantuvo un 91% de la actividad enzimática mientras que un 61 y 46 % de actividad enzimática lipasa se mantuvo a las 48 y 72 h respectivamente (**Figura 31**).

En el caso de la estabilidad a 40°C se observó que se mantuvo un 53% de la actividad enzimática a las 6 h, mientras que a las 12 h de incubación se mantuvo un 43% de la actividad. Mientras que 48 y 72 h se mantuvo un 32 y 27% de la actividad enzimática lipasa (**Figura 31**).

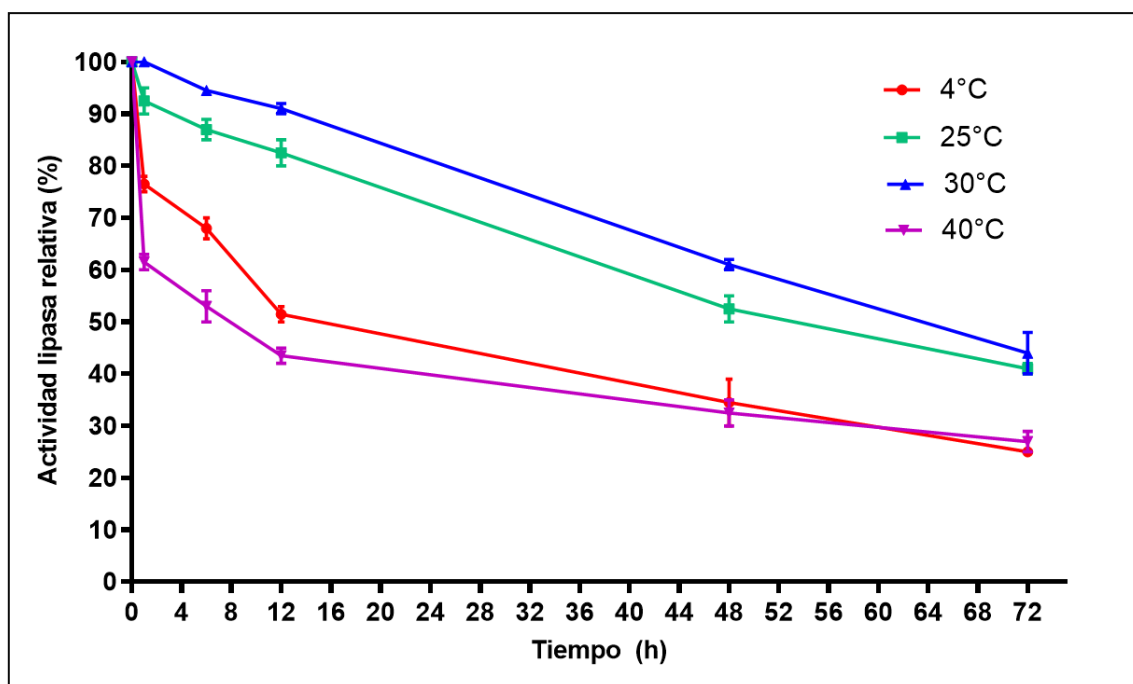


Figura 31. Estabilidad enzimática en el tiempo cuando el sobrenadante se incubó a 4, 25, 30 y 40°C. Los datos son la media \pm desviación estándar de duplicados.

5.5.4 Estabilidad en pH

Para determinar la estabilidad enzimática, el sobrenadante de *P. rubens* LBM 081 se incubó a distintos pHs y se determinó la actividad lipasa en diferentes intervalos de tiempo.

En el caso de la estabilidad a pH 7 a las 6 h de incubación se observó que la actividad enzimática lipasa se mantuvo en un 95%, a las 12 h de incubación se observó que la actividad enzimática lipasa se mantuvo en un 88%. Trascorridas las 48 h un 77% de la actividad se mantuvo a este pH, y luego de las 72 h se observó que la actividad enzimática lipasa se mantuvo en un 58 % (**Figura 32**).

A pH 7,5 se observó que la actividad enzimática se mantuvo en un 90% transcurridas las 6 h, a las 12 h se observó que la actividad enzimática se mantuvo en un 84%. Mientras que a las 48 y 72 h un 70 y 53 % de la actividad enzimática se mantuvo, respectivamente (**Figura 32**).

En el análisis de la estabilidad a pH 8 a las 6 h de incubación se observó que la actividad enzimática lipasa se mantuvo en un 71%, a las 12 h de incubación se observó que un 52% de actividad se mantuvo. Trascorridas las 48 h solo un 17% de la actividad se mantuvo a este pH, y luego de las 72 h un 5% de la actividad se mantuvo bajo estas condiciones de pH (**Figura 32**).

En el caso de la estabilidad a pH 8,5 a las 6 h de incubación se observó que la actividad enzimática lipasa se mantuvo en un 73%, a las 12 h de incubación se observó que un 45% de

actividad se mantuvo. Trascurridas las 48 h un 19% de la actividad se mantuvo a este pH, y luego de las 72 h un 12% de la actividad se mantuvo (**Figura 32**).

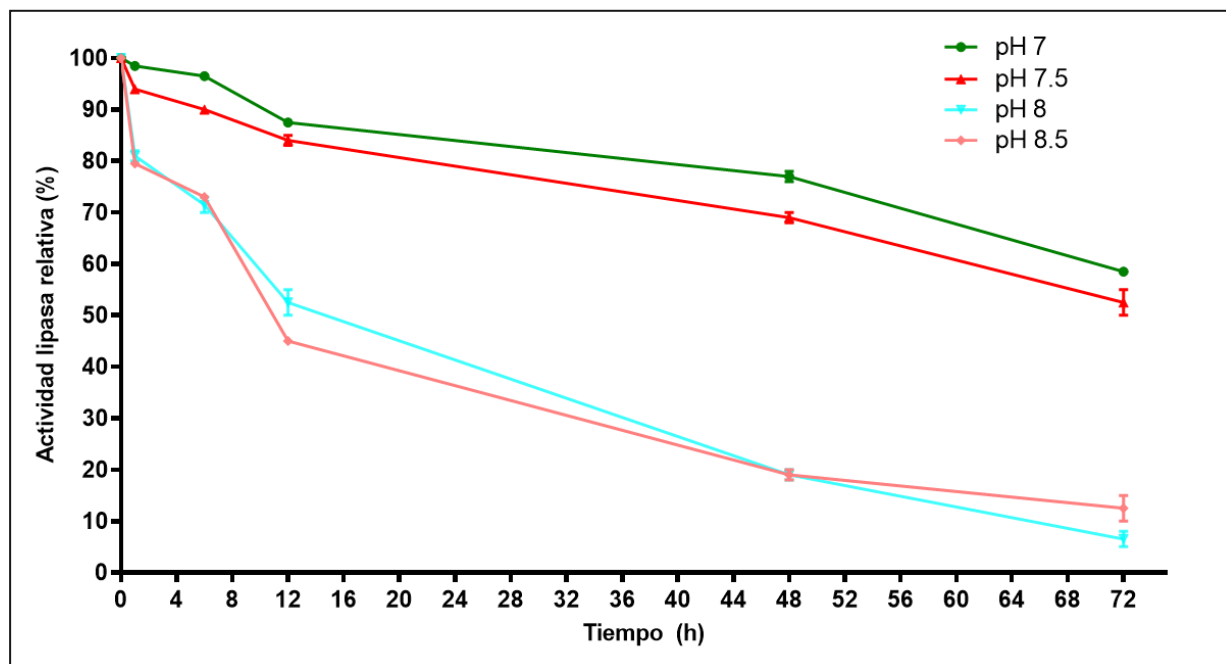


Figura 32. Estabilidad enzimática en el tiempo cuando el sobrenadante se incubó a pH 7; 7,5; 8 y 8,5. Los datos son la media \pm desviación estándar de duplicados.

5.5.5 Determinación del perfil de isoenzimas y peso molecular

Para verificar la existencia de isoenzimas de lipasa y su respuesta diferencial a la inducción con aceite de oliva al 4%, en el medio optimizado, se realizó el análisis en geles de SDS-PAGE con MUF-butilato como sustrato.

Para ello se utilizó el sobrenadante optimizado de *P. rubens* LBM 081 el gen fue realizado con el sobrenadante en el día 6 con la mejor actividad registrada y con el sobrenadante del día 8 por su buena actividad. En ambos solo se observó una única enzima con un peso de 42 kDa (**Figura 33**).

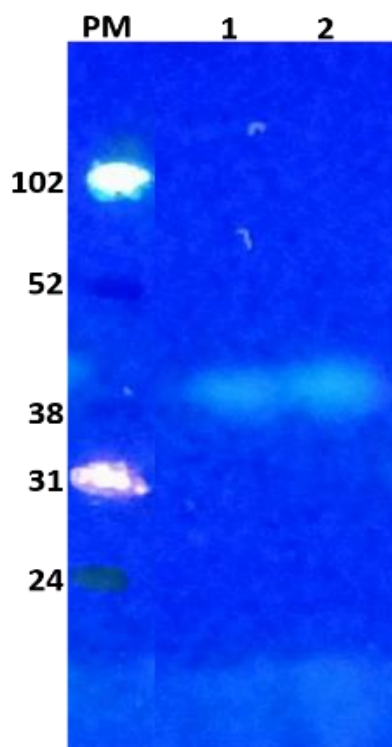


Figura 33. Detección de lipasa por zimogramas en geles SDS-PAGE. Las bandas de lipasas se detectaron por fluorescencia con MUF-butirato. Se observan las bandas correspondientes a los días 6 y 8 de cultivo del medio optimizado de *P. rubens* LBM 081.

5.6 Secreción de enzimas de *P. rubens* LBM 081 antes y después de la optimización del medio de cultivo

Se analizó el secretoma del sobrenadante de *P. rubens* LBM 081 crecido en el medio de cultivo luego de la optimización y como control se utilizó el sobrenadante obtenido antes de la optimización, mediante espectrometría de masas. Se lograron identificar un total de 74 proteínas en total. El mayor número de proteínas diferentes (71) se identificó en el secretoma de *P. rubens* LBM 081 crecido en el medio optimizado. Mientras que en el secretoma control antes de la optimización se lograron identificar un número menor (21) de proteínas diferentes (**Tabla 8**). Se identificaron 4 proteínas intracelulares en ambos secretomas analizados, las cuales no se tuvieron en cuenta para los próximos análisis.

Tabla 8. Proteínas identificadas en los secretomas de *P. rubens* LBM 081 crecido en medio optimizado con peptona al 2% y aceite de oliva 4% y de su sobrenadante control crecido en medio (PYE) con peptona 0,5%, extracto de levadura 0,3%, extracto de carne 0,3 % suplementados con 2 % de aceite de oliva. Las proteínas indicadas con (**x-negro**) son compartidas en ambos secretomas, las indicadas con (**x-celeste**) son exclusivas del secretoma control y las indicadas con (**x-rojo**) son exclusivas del secretoma del medio optimizado.

ID ¹ de la proteína	Nombre de la proteína	MM ² (kDa)	pI ³	Sobrenadante control	Sobrenadante optimizado
B6H9T9	Catalasa	79,9	5,63	x	x
B6GWX5	Fosfoesterasa	45,6	5,41		x
B6H4G0	Endo-1,3-β-glucanasa	34,4	5,19	x	x
B6HCL5	β-glucosidasa	94,2	5	x	x
B6GX22	Mutanasa	48,5	4,94	x	x
B6HC73	Oxidorreductasa	55,4	4,97	x	x
B6GZT2	Glucósido hidrolasa	75,9	5,4	x	x
B6HNC6	Oxidorreductasa ligada a FAD	50,3	5,49	x	x
B6HHM1	Amidasa	62,5	4,87		x
B6HRI4	Oxidorreductasa ligada a FAD	61,4	4,92	x	x
B6HEI0	Glutaminasa A	75,8	4,84	x	x
B6HVA8	β-glucosidasa	85,3	5,01		x
B6HHN9	Serina proteasa alcalina	40,3	6,24	x	x
B6HUK1	Fosfodiesterasa	35	4,74		x
B6HCF7	Proteasa	91,8	5,21	x	
B6HIN4	No identificada	58,6	5,62		x
B6HI97	Glicosidasa	36	4,88		x
B6H9K5	No identificada	81,2	4,51		x
B6HAK1	Endo-1,3-β-glucosidasa	100,1	5,45		x
B6HN90	Glutatióntasa	62,1	6,57		x
B6HVQ6	Endo-β-1,4-mananasa	51,5	4,82	x	x
B6HJD1	Carboxipeptidasa	62,7	4,77		x
B6H445	Penicilopepsina	43,4	5,27	x	x
B6HKM5	No identificada	20,1	4,41	x	x
B6HMT5	Glucosidasa	87,5	5,86	x	
B6HHG9	Hidrolasa peptídica	52,7	5,92		x

Tabla 8. (Continua)

ID ¹ de la proteína	Nombre de la proteína	MM ² (kDa)	pI ³	Sobrenadante control	Sobrenadante optimizado
B6H570	Lipasa	30	6,52	x	x
B6HB80	Glucosidasa	45,9	5,85	x	x
B6HV80	Carboxipeptidasa	61,8	4,84		x
B6HFI5	Metalocarboxipeptidasa inactiva	58,7	4,93	x	x
B6H6W4	Glucoamilasa	67,2	5,15	x	x
B6HTM2	Quitinosa	85,7	6,05	x	
B6HP34	Glucosidasa	85,8	5,69	x	x
B6HHM0	Pectina liasa	39	8,19		x
B6HFT0	No identificada	90,3	4,77		x
B6H6N2	No identificada	36,9	6,32		x
B6HB59	Lisofosfolipasa	68,2	4,67		x
B6HUH0	Fosfatasa ácida	54,7	5,01		x
B6HB85	No identificada	52,2	4,44		x
B6H6Z5	No identificada	15,9	4,74		x
B6HRD6	Fitasa A	57,8	4,93		x
B6H5K2	Carboxipeptidasa	62,1	5,17		x
B6HQU9	No identificada	30,2	5,25		x
B6HJD2	Mono-diacilglicerol lipasa	33,3	5,76		x
B6H102	Arabinano endo-1,5-alfa-L-arabinosidasa	35,8	6,68		x
B6GWV7	Tripeptidil-peptidasa	65,3	4,98		x
B6HUV0	Fosfogluconolactonasa	43,4	5,43		x
B6HBR0	Carboxipeptidasa	60	4,97		x
B6H6I9	Transferasa de fosfatidilglicerol	19,1	4,98		x
B6HRM9	Liasa	34,3	5,6		x
B6HE11	Peptidasa	70,3	4,98		x
B6HFN5	β-hexosaminidasa	66,5	5,59		x
B6HNT3	Carboxipeptidasa	67	5,29		x
B6HCF8	No identificada	15,1	5,2		x
B6HMF2	Proteína de burbuja	9,1	7,88		x
B6HTL1	Endo-1,6-β-D-glucanasa	51,8	4,97		x
B6HEB3	Quitinasa	48,3	4,98		x

Tabla 8. (Continua)

ID ¹ de la proteína	Nombre de la proteína	MM ² (kDa)	pI ³	Sobrenadante control	Sobrenadante optimizado
B6H1V0	Arabinogalactan endo- β -1,4-galactanasa	38,3	4,89		x
B6H9W4	α -1,2-manosidasa	56,4	5,25		x
B6HCY0	Fosfatasa ácida	50	5,2		x
B6HJS1	Solanapirona sintasa	53	4,79		x
B6HCY9	No identificada	25,4	4,63		x
B6H0R7	No identificada	25,4	5,97		x
B6H7P7	No identificada	49,5	4,67		x
B6HSI4	No identificada	11	8		x
B6HUN8	Oxidoreductasa	62,6	5,39		x
B6HTI4	No identificada	21,8	7,49		x
B6HGV0	No identificada	78,2	4,28		x
B6H7K7	Endopeptidasa	28,2	5,27		x
B6HU11	1,3- β -glucanosiltransferasa	56,9	5,06		x
B6HTP0	No identificada	40,9	4,83		x
B6HNB7	Glucosidasa	106,7	5,11		x
B6HPB5	1,4- α -D-glucano glucohidrolasa	52	5,17		x
B6GW32	Proteína TolB	74,1	5,31		x

¹ID, número de identidad de la proteína

²MM, masa molecular

³pI, punto isoeléctrico

Del análisis total de proteínas observadas en ambos secretomas se identificaron cinco enzimas lipolíticas, involucradas en la hidrólisis de ácidos grasos y sus enlaces ésteres: dos fosfoesterasas, una lisofosfolipasa, una lipasa y una mono-diacilglicerol lipasa. De las cuales una enzima lipasa (B6H570) se observó en ambos secretomas, mientras que las restantes enzimas fueron identificadas de forma exclusiva en el secretoma del hongo crecido en el medio optimizado.

Sus pesos moleculares rondan en el rango de 68,2-30 kDa. Los pI de todas las enzimas lipolíticas fueron ácidos, en el rango entre 4,67 a 6,52.

La presencia de un mayor número de enzimas lipolítica en el medio de cultivo optimizado puede considerarse que esta en concordancia con las mejores actividades enzimáticas cuantificadas en los ensayos anteriores.

En el secretoma del hongo crecido en el medio optimizado con peptona al 2 % y aceite de oliva 4 % se identificaron 53 proteínas exclusivas (71,6 %) en este secretoma. Compartiendo con el secretoma control (antes de la optimización) 18 proteínas (24,3 %) del total de proteínas identificadas (**Figura 34**).

Con respecto al medio control, se identificaron tres proteínas exclusivas correspondiendo al 4,05 % del total de proteínas identificadas.

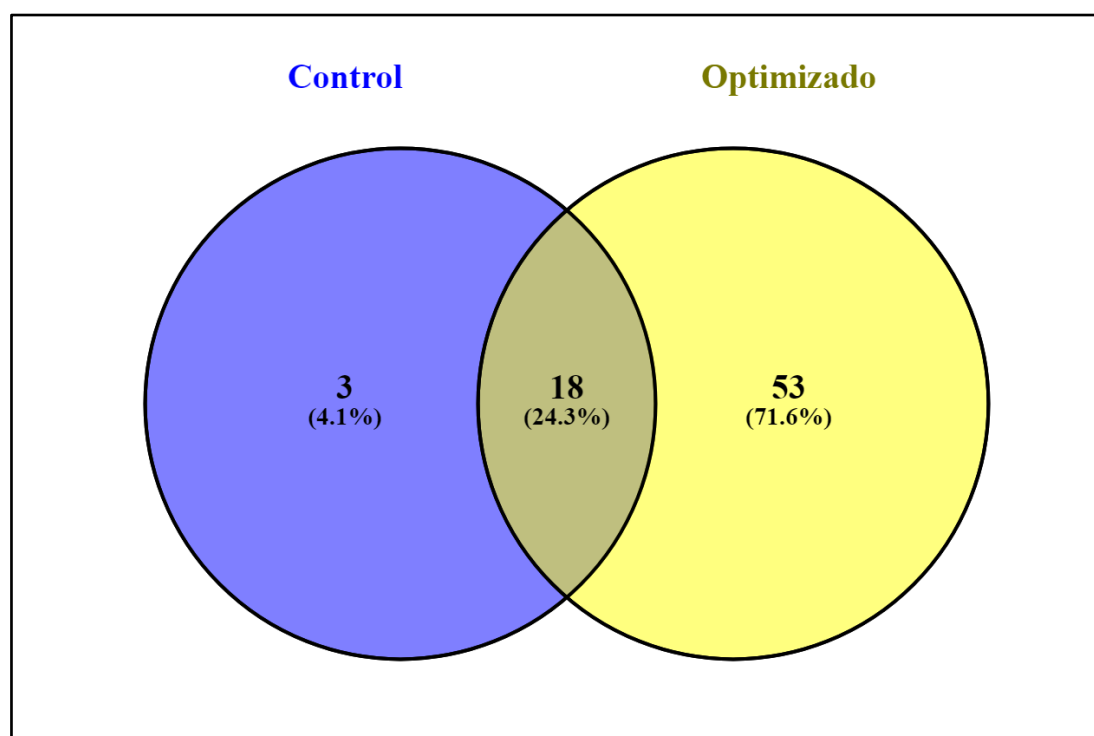


Figura 34. Diagrama de Venn de los dos secretomas de *P. rubens* LBM 081 crecido en los diferentes medios de cultivo. Distribución de las 74 proteínas identificadas en los dos secretomas del hongo crecido en los diferentes medios. El diagrama de Venn se elaboró utilizando la herramienta Venny (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>).

El set entero de proteínas en los dos secretomas tienen masas moleculares entre 9,1 y 106,7 Kda con puntos isoeléctricos entre 4,28 y 8,19 (**Figura 35**).

El pH es un factor muy importante tanto en la producción enzimática como en el proceso de bioconversión e hidrólisis de aceites y grasas. El pH óptimo de actividad enzimática para la mayoría de las enzimas hidrolíticas es ácido, cercano a 5. La distribución de los puntos observados mostró que en los dos sobrenadantes la mayoría de las proteínas identificadas presentaron puntos isoeléctricos cercanos a 4 y 5. Se detectaron muy pocas proteínas secretadas con puntos isoeléctricos superiores a 7. Por otro lado, las masas moleculares de la mayoría de las proteínas identificadas en los dos secretomas se concentraron entre los 25 y 70 kDa.

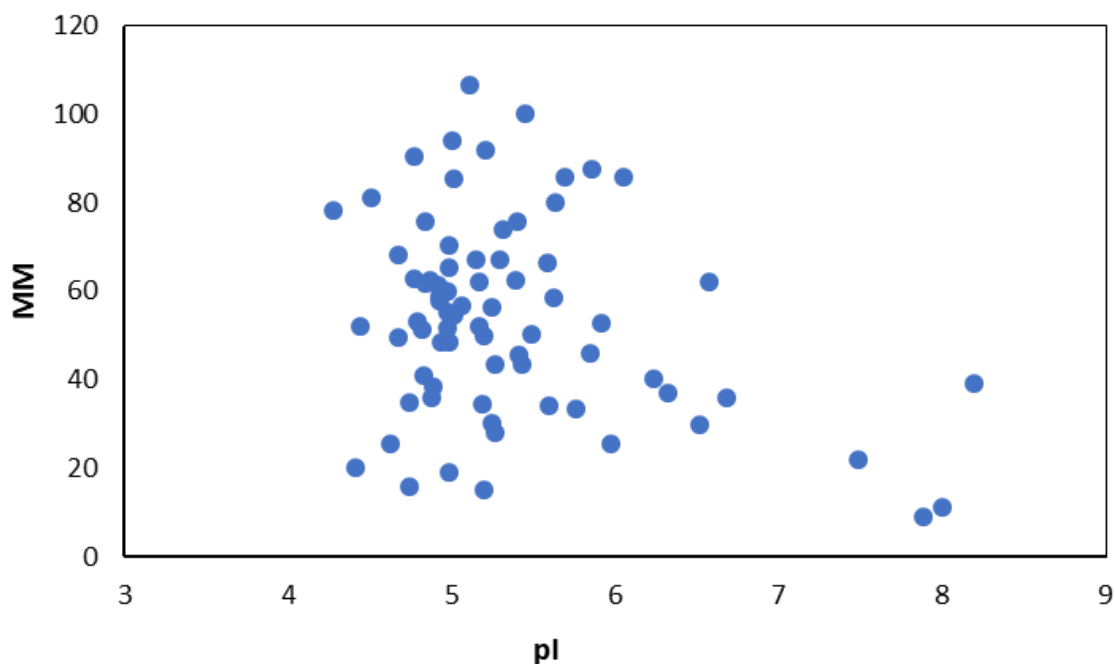


Figura 35. Dispersión de las proteínas identificadas en los dos secretomas según su masa molecular (MM) y punto isoeléctrico (pI). Los puntos azules corresponden a todas las proteínas presentes en los dos sobrenadantes analizados.

En los dos secretomas, se analizó la frecuencia relativa de las proteínas identificadas según su acción biológica, es decir, sobre qué actúan (**Figura 36**). La mayoría de las proteínas, en los dos secretomas, fueron enzimas con acción sobre los carbohidratos (CAZy), siendo el 52,4 % y el 33,8 % del total de las proteínas identificadas en los secretomas del hongo crecido en el medio control (no optimizado) y en el medio optimizado, respectivamente.

También se identificaron enzimas que actúan o potencialmente actúan sobre la lignina, (metales oxidasas y oxidorreductasas), llamadas conjuntamente ligninolíticas, en los dos secretomas, siendo mayor la frecuencia en el sobrenadante control (no optimizado) que en el medio optimizado, 14,3 y 7,03 %, respectivamente.

Enzimas proteolíticas y peptidasas se encontraron en los dos secretomas estudiados, sin embargo, su frecuencia fue mayor en el secretoma control (no optimizado) representando un 23,8 % mientras que en secretoma optimizado fue de un 21,12 %.

También enzimas que actúan en el metabolismo y transporte de los lípidos, las lipasas (esterasas y fosfolipasas), se identificaron en ambos secretomas del hongo crecido en el medio optimizado y en el secretoma control (no optimizado), representando un 9,85 % y un 4,7% respectivamente.

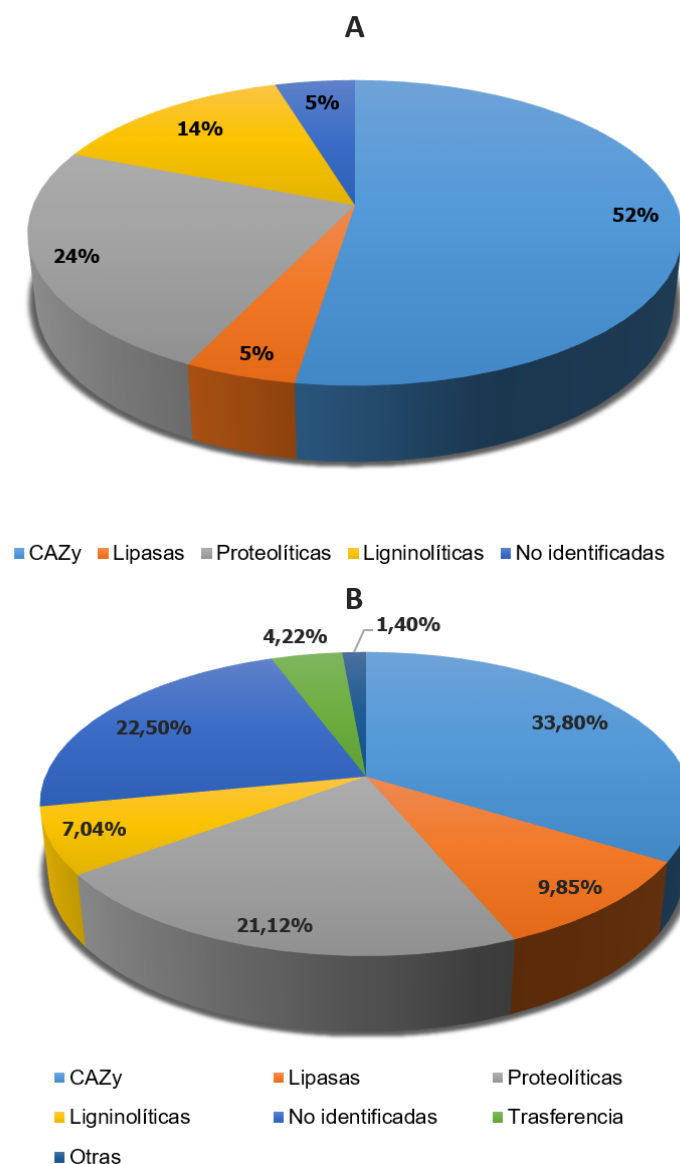


Figura 36. Cantidad de proteínas diferentes según su acción biológica identificadas en los dos secretomas de *P. rubens* LBM 081. Diferentes proteínas identificadas con actividad enzimática sobre los carbohidratos (CAZy), lípidos (lipasas), proteínas (proteolíticas) y lignina (ligninolíticas) del hongo crecido en los diferentes medios **A**) en medio no optimizado (crecido en medio PYE); **B**) en medio optimizado (peptona al 2% y aceite de oliva 4%).

En ésta instancia se evaluó también, la diferencia de las proteínas identificadas en ambos secretomas de los sobrenadantes obtenidos, en función del tipo de ataque enzimático (**Figura 37**). En ambos secretomas, la frecuencia relativa de las diferentes proteínas fue similar. La mayoría de las enzimas identificadas fueron hidrolasas, representando el 80,9 % de las proteínas totales del secretoma del hongo crecido en el medio control (no optimizado), mientras que para el secretoma del hongo crecido en el medio optimizado las hidrolasas representaron un 63,4% de las proteínas totales.

También se encontraron enzimas del tipo oxidorreductasas, que representaron un 14,2 y 7,04 % en los secretomas del hongo crecido en medio no optimizado y en medio luego de su optimización, respectivamente.

En el secretoma del hongo crecido en medio optimizado con peptona al 2% y aceite de oliva 4%, se identificaron enzimas transferasas, liasas que representaron un 4,22 % y un 2,8 % de las proteínas totales del secretoma del hongo.

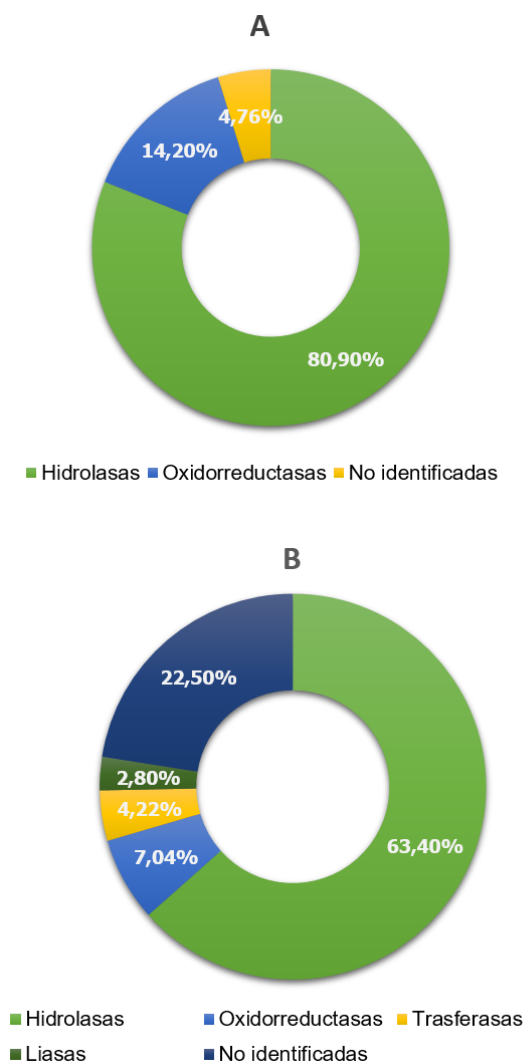


Figura 37. Cantidad de proteínas diferentes según su modo de acción enzimático, identificadas en los secretomas de *P. rubens* LBM 081. **A)** Crecido en medio control (no optimizado) y **B)** crecido en medio optimizado.

5.7 Aplicación del sobrenadante optimizado de *Penicillium rubens* LBM 081 en la hidrólisis de efluente domiciliario

Para la evaluación el efecto del sobrenadante obtenido de *P. rubens* LBM 081 sobre efluente domiciliario rico en aceites, se utilizaron dos tipos de efluentes uno rico en aceite de oliva y otro proveniente de residuos domiciliarios.

Para el inicio de los ensayos primeramente se evaluaron los parámetros pH, Temperatura, aceites y grasas totales, DQO (demanda química de oxígeno) en los efluentes recién colectados (**Tabla 9**).

Tabla 9. Caracterización de los efluentes originales.

Efluente	pH	Temperatura (°C)	DQO (mg/L)	Aceites y grasas totales (mg/L)
Aceite de oliva	7	27	4829,7	4500
Domiciliario	7,2	27,3	4924,4	5500

Posteriormente, se realizaron los tratamientos utilizando diferentes concentraciones de sobrenadante para el tratamiento de los efluentes caracterizados se realizaron ensayos utilizando 26 % (26 % de sobrenadante optimizado y 74 % del efluente domiciliario) y 44 % (44 % de sobrenadante optimizado y 56 % del efluente domiciliario). Cada ensayo se trató a 30°C a 140 rpm, por un periodo de 48 h, teniendo en cuenta las características obtenidas y analizadas a lo largo de todo el trabajo y en especial la vida media de la enzima lipasa. Para una mejor evaluación de la evolución del tratamiento se realizaron caracterizaciones en diferentes tiempos a las 6, 24 y 48 h para ambos efluentes (**Tablas 10 y 11**).

Tabla 10. Caracterización del efluente con aceite de oliva tratado con sobrenadante de *P. rubens* LBM 081 en diferentes intervalos de tiempo.

Tiempo de incubación	Efluente Aceite de oliva							
	0		6 h		24 h		48 h	
Porcentaje de sobrenadante	26 %	44 %	26 %	44 %	26 %	44 %	26 %	44 %
pH	7	7	7	7	6,9	6,9	7	7
Temperatura (°C)	27	27	30	30	29,8	29,8	30	30
DQO (mg/L)	4829,7	4829,7	4166	4072,1	4072,1	2178,1	3788	2651,6
Aceites y grasas totales (mg/L)	4500	4500	4255	3790	4050	2290	3790	3505

Tabla 11. Caracterización del efluente domiciliario tratado con sobrenadante de *P. rubens* LBM 081 en diferentes intervalos de tiempo.

Tiempo de incubación	Efluente Aceite domiciliario							
	0		6 h		24 h		48 h	
Porcentaje de sobrenadante	26 %	44 %	26 %	44 %	26 %	44 %	26 %	44 %
pH	7,2	7,2	7	7	6,92	6,92	7	7
Temperatura (°C)	27,3	27,3	30	30	29,9	30	30	30
DQO (mg/L)	4924,4	4924,4	4261,5	4356,2	4735	2841	4829,5	3977,1
Aceites y grasas totales (mg/L)	5500	5500	5000	4250	4500	3935	4237	3985

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos de DQO, grasas y aceites totales se realizó el cálculo del porcentaje de remoción obtenido de estos parámetros en los efluentes tratados con diferentes porcentajes de sobrenadante del hongo *P. rubens* LBM 081 (**Figura 38 y 39**).

Del análisis de los porcentajes de remoción se observó variación dependiendo de la concentración empleada y del tiempo transcurrido tanto del DQO como de la cantidad de aceites y grasas.

En el caso de la DQO en el efluente con aceite de oliva se observó que a las 6 h de incubación en el empleo del sobrenadante tanto al 26 o 44 % se obtuvo que el porcentaje de remoción rondó los 15 y 17 %. Mientras que a las 24 h se observó que con el empleo del sobrenadante al 44% el porcentaje de remoción del DQO ascendía a un 50 %, mientras que el empleo de 26 % de sobrenadante se obtuvo una remoción del 16 %.

Mientras que a las 48 h de incubación con un 44 % de sobrenadante se observó un porcentaje de remoción de 45 %, mientras que con un 26 % de sobrenadante se observó un porcentaje de remoción del 23 % (**Figura 38**)

En cuanto al DQO en el efluente domiciliario se observó que con un 26 % de sobrenadante se consiguió un 14 % de remoción y con un 44 % de sobrenadante se consiguió un 12 % de remoción a las 6 h de incubación.

A las 24 h se observaron porcentajes de remoción del 4 % y 44 % utilizando sobrenadante al 26 y 44 % respectivamente. A las 48 h de incubación se observaron porcentajes de remoción de un 2 % utilizando un 26 % de sobrenadante, y de un 20 % utilizando un 44 % de sobrenadante (**Figura 39**).

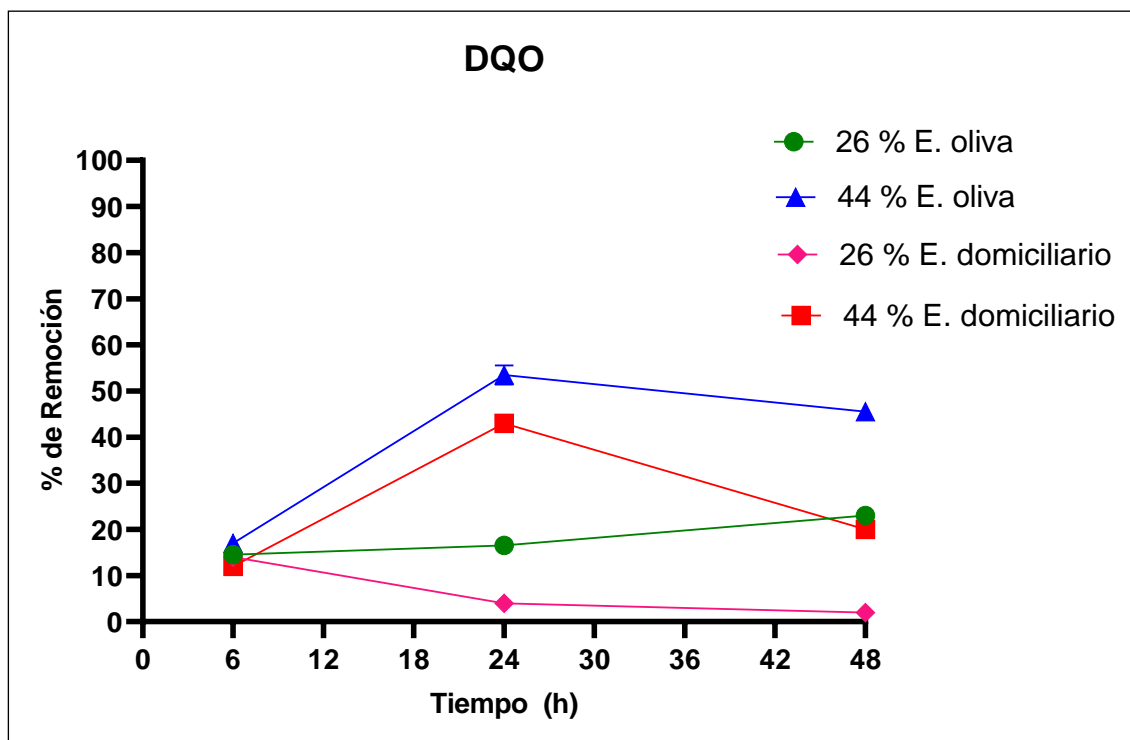


Figura 38. Gráfico de porcentaje de remoción DQO en efluente de aceite de oliva y domiciliario con sobrenadante obtenido de *P. rubens* LBM 081.

En el caso de la remoción de grasas y aceites totales para el efluente de aceite de oliva se observó un porcentaje de remoción de 4 % cuando se utilizó un 26 % de sobrenadante, y una remoción del 16 % cuando se empleó un 44 % de sobrenadante a las 6 h de incubación.

A las 24 h de incubación se observó una remoción del 10 % utilizando un 26 % de sobrenadante y una remoción del 50 % utilizando el un 44 % de sobrenadante (**Figura 39**).

A las 48 h de incubación, se observó una remoción de 16 % utilizando un 26 % de sobrenadante. Y una remoción de 24 % en el efluente tratado con un 44 % de sobrenadante (**Figura 39**).

Para el caso de la remoción de grasas y aceites totales para el efluente domiciliario se observó un porcentaje de remoción de 10 % utilizando un 26 % de sobrenadante y un 23 % cuando se utilizó un 44% de sobrenadante a la 6 h de incubación (**Figura 39**).

A las 24 h de incubación se observó un 20 % de remoción utilizando un 26 % de sobrenadante y un 29 % de remoción utilizando un 44 % de sobrenadante.

A las 48 h de incubación, se observó un 23 % de remoción utilizando un 26 % de sobrenadante y un 28 % de remoción utilizando un 44 % de sobrenadante (**Figura 39**).

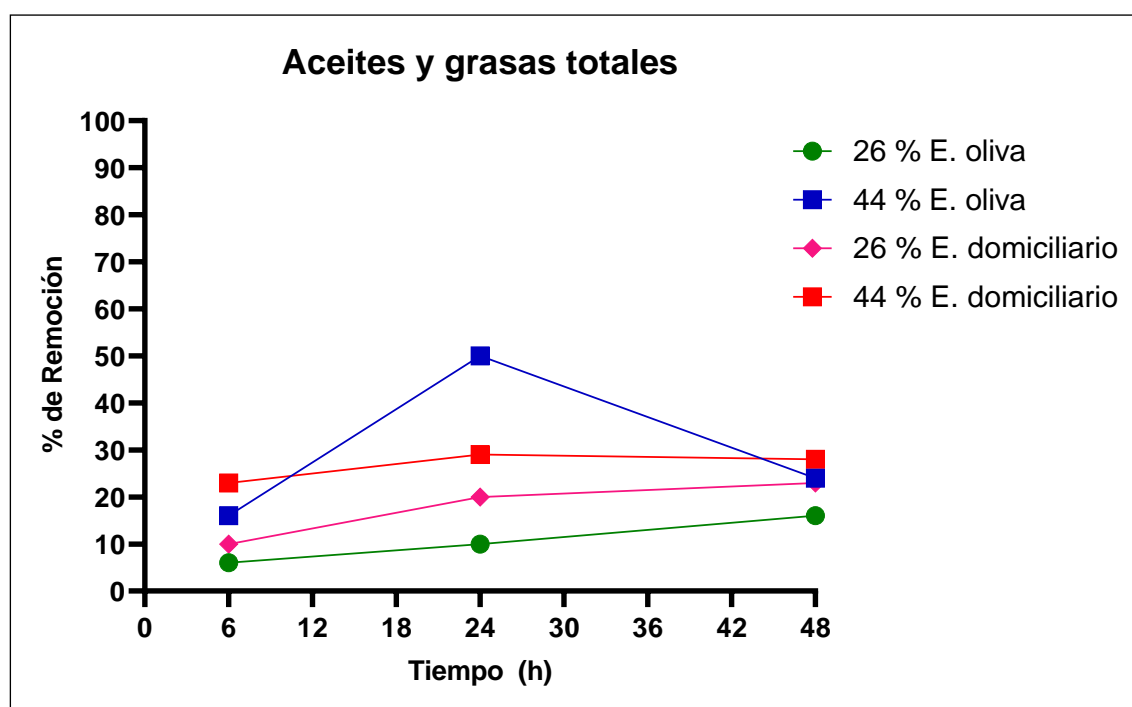


Figura 39. Gráfico de porcentaje de remoción aceites y grasas totales en efluente con aceite de oliva y domiciliario tratado con el sobrenadante obtenido de *P. rubens* LBM 081.

5.7.1 Ensayo de toxicidad con semillas de *Lactuca sativa*

Los ensayos de toxicidad fueron realizados con los tratamientos que mostraron mejor remoción tanto de DQO como de aceites y grasas en ambos efluentes ensayados (oliva, domiciliario a las 24 h).

La evaluación de la germinación y longitud radicular se realizó transcurridos los cinco días de incubación. Con estas mediciones fueron calculados los índices de crecimiento relativo y el índice de germinación, correspondientes de cada ensayo (**Tabla 12**).

Tabla 12. Índices de crecimiento relativo (ICR) e índice de germinación (IG) de *L. sativa* obtenidos con los tratamientos seleccionados con el sobrenadante de *P. rubens* LBM 081 sobre los efluentes de A. de oliva y domiciliario.

	ICR	IG (%)
Control Oliva	0,77	58,48
Tratamiento Oliva 44%	0,89	67,77
Control Domiciliario	0,73	65,32
Tratamiento Domiciliario 44%	0,98	87,85

Del cálculo de los índices de germinación se encontraron algunos los ensayos no estuvieron por debajo del 50 % (tratamiento con 44 % del efluente con oliva y del tratamiento con 44 % del efluente domiciliario) (**Tabla 12**), lo cual sugiere un efecto fitotóxico post-germinativo leve.

Con el cálculo de los índices de crecimiento relativo (ICR), se pudo observar que existieron índices inferiores a 0,8 en los controles, que denotan una leve inhibición de la elongación radicular (**Figura 40**). Mientras que se evidenciaron índices mayores a 0,8 en los tratamientos con 44 % de sobrenadante tanto sobre el efluente de aceite de oliva como en el efluente domiciliario indicando que no existen efectos negativos sobre la elongación radicular de *L.sativa* (**Figura 40**).

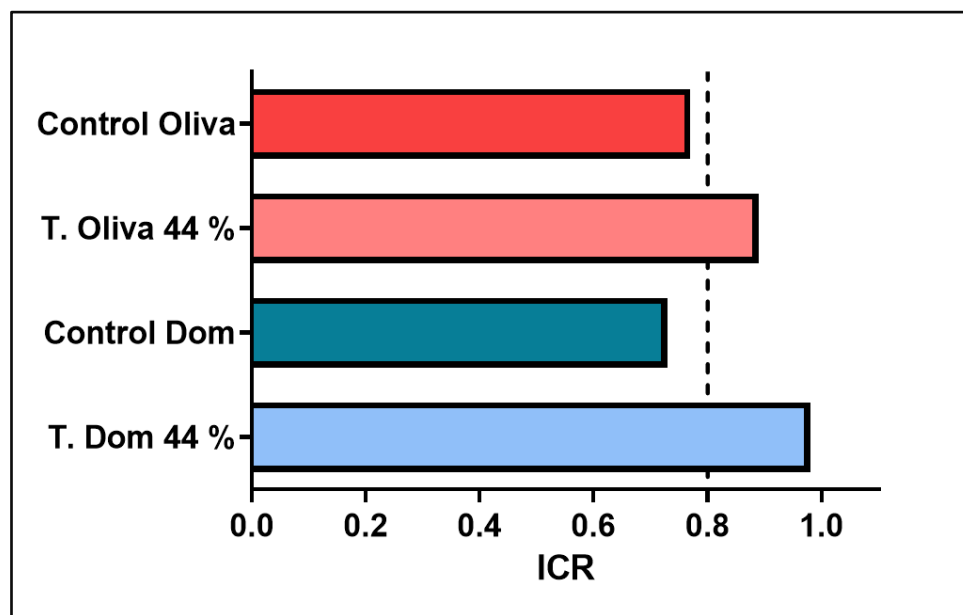


Figura 40. Índices de crecimiento relativo (ICR) de *L. sativa* obtenidos en los ensayos de toxicidad de los tratamientos en los efluentes de aceite de oliva y domiciliario y sus respectivos controles. La línea de puntos vertical indica el límite de 0,8 valores superiores a este indican un desarrollo sin efectos negativos de la elongación radicular.

6. DISCUSIÓN

6.1 Evaluación de la habilidad lipolítica de aislamientos del género *Penicillium* aislados de la Provincia de Misiones

La selva subtropical Paranaense del noreste Argentino se caracteriza por su enorme biodiversidad, proporcionando un ambiente propicio donde se puede aislar una gran cantidad de organismos (Fonseca *et al.*, 2010; Coniglio *et al.*, 2017). Este trabajo se focalizó en la búsqueda de hongos del género *Penicillium*. Este género es reconocido por su capacidad para secretar varias enzimas extracelulares y, por lo tanto, es de interés explorar el potencial de cada aislado.

Existe una gran variedad de árboles frutales en la selva de Misiones, donde la humedad característica ofrece condiciones óptimas para la proliferación de hongos de este género en frutos en descomposición y otros lugares. Dado su gran potencial para aplicaciones biotecnológicas, se evaluó la capacidad de producción de la enzima lipasa en el género *Penicillium*. Esta evaluación permite además evidenciar si existen diferencias entre los aislamientos ya que es muy común que diferentes aislamientos de una misma especie puedan tener diferentes comportamientos, por ello se hace necesario investigar nuevos aislamientos fúngicos a el fin de encontrar enzimas novedosas y explotaras biotecnológicamente (Fonseca *et al.*, 2016; Chylenski *et al.*, 2017). Esta es una de las estrategias que se han aplicado para dar solución a la demanda de enzimas de alta *performance* con características específicas para procesos industriales (Bertrand *et al.*, 2017).

El uso de ensayos en placa de agar con diversos sustratos adecuados para la detección de ciertas enzimas se ha convertido en una técnica fácil y directa para analizar organismos y evidenciar el potencial para una buena producción enzimática (Geoffry & Achur, 2018). Este procedimiento reduce los costos y el tiempo involucrados en la búsqueda de nuevos aislamientos para avanzar rápidamente con la evaluación adicional de su potencial para aplicaciones biotecnológicas.

Se han utilizado el Tween 20 y 80 como sustratos para las lipasas y se lo considera el método principal para determinar la actividad lipolítica. Si se emplea en placa de agar, la actividad hidrolítica se manifiesta por la formación de una zona opaca que flanquea las colonias debido a la deposición de cristales de sal de calcio formados por el ácido graso liberado. En caso de que no haya una zona clara, se combina con compuestos cromogénicos como el azul Victoria B o el rojo de metilo como indicadores, lo que da una coloración distintiva con ácidos grasos

formados alrededor de la colonia en presencia de enzimas lipolíticas. De cualquiera de las dos maneras, la técnica es eficaz y puede emplearse con éxito (Nwaguma *et al.*, 2016; Singh & Mukhopadhyay, 2012).

Empleando esta técnica se logró detectar 34 especies de hongos silvestres aisladas de los desechos de un molino de aceite comestible demostrando que *Aspergillus fumigatus*, *A. nidulans* y *Mucor racemosus* exhibieron la mayor actividad lipolítica (Gopinath *et al.*, 2005, Houbraken *et al.*, 2012)

El ensayo en placa de agar con rodamina B y aceite de oliva como sustrato fue elegido para realizar el *screening* en el presente trabajo por tratarse de un método muy sensible y eficaz para identificar lipasas activas y verdaderas (Geoffry & Achur, 2018). Este método ha actuado como técnica de confirmación frente a otras técnicas, como las que utilizan tributirina como sustrato. En estas últimas, se pueden producir áreas claras e inespecíficas que ocurren en respuesta a esterazas que actúan sobre triglicéridos de cadena corta y pueden tener poca o ninguna actividad contra los triglicéridos de cadena larga, a diferencia de las lipasas verdaderas (Rajeswari *et al.*, (2011), Abrunhosa *et al.*, (2013), Geoffry & Achur, 2018).

Cuando los microorganismos tienen una producción de la enzima lipasa, se observa un halo naranja bajo luz ultravioleta debido a la interacción de la rodamina B con los ácidos grasos liberados durante la hidrólisis enzimática de los triglicéridos. Varios autores han utilizado este método con rodamina B para informar sus resultados. Savitha *et al.*, 2007 utilizaron esta técnica en la selección de 32 cepas de hongos aisladas de tres géneros diferentes, en los que tres *Aspergillus* sp. y *Mucor* sp. exhibió una actividad de lipasa máxima. De manera similar, se confirmó que *Penicillium aurantiogriseum* aislado de aceite de soja tiene actividad lipolítica (Lima *et al.*, 2003). Además, Kumar *et al.*, 2012 detectaron hongos productores de lipasa aislados de muestras de suelo, en las que *P. chrysogenum* mostró el mejor halo de hidrólisis que coincidía con una mayor actividad lipolítica. Utilizando la misma técnica, analizamos la actividad de la enzima lipasa de veinte cepas aisladas de frutos de la selva Paranaense de Misiones. El uso de aceite de oliva y rodamina B permitió cuantificar los diferentes I_{AL} en las cepas analizadas.

6.2 Identificación molecular de los aislamientos seleccionados por su actividad lipolítica

La identificación de un aislamiento particular es un paso importante en la investigación biológica. Nombrar de forma correcta los aislamientos es de vital importancia para una comunicación óptima y, a menudo, es el vínculo entre estudios de varios campos. Por tanto, es importante que la taxonomía sea clara y estable. Idealmente, la identificación debe ser

inequívoca, precisa, simple e inmutable. Debido a su importancia económica, *Penicillium* atrajo mucha atención y esto está marcado por los estudios taxonómicos pioneros de Dierckx, (1901); Thom, (1910); Westling, (1911); Biourge, (1923); Thom y Church, (1926). La clasificación de *Penicillium* fue el tema en varias monografías (Thom, 1930; Raper y Thom, 1949; Pitt, 1980; Ramírez, 1982) y aunque existen monografías más recientes, estas todavía forman la base de muchos estudios sobre *Penicillium* hoy en día. Después de Pitt, (1980); se utilizaron varios enfoques nuevos, como patrones de isoenzimas, sistemas de ubiquinona, perfiles de extrolitos, hasta llegar a las técnicas basadas en ADN (secuenciación, RAPD, AFLP) para aclarar la taxonomía de *Penicillium* (Houbraken *et al.*, 2012).

En la última década, nuevos conocimientos han dado como resultado que ciertas especies bien conocidas pertenecientes al género *Penicillium* parecen ser en realidad complejos de especies. Esto podría generar (inicialmente) confusión; sin embargo, una identificación correcta tiene como función evitar estos inconvenientes.

En el pasado, la identificación de *Aspergillus* y *Penicillium* se basaba principalmente en caracteres fenotípicos y fisiológicos. Sin embargo este tipo de identificación suele ser difícil y requiere de personal bien capacitado. Por lo tanto, la identificación en laboratorios de rutina basada únicamente en caracteres fenotípicos se está volviendo difícil, por este motivo en la actualidad, las técnicas con base molecular, especialmente la secuenciación de marcadores moleculares específicos, son utilizadas con mayor frecuencia como complemento para la correcta identificación. La región ITS fue aceptada como el principal código de barras para hongos (Schochet *et al.*, 2012); sin embargo, varios estudios mostraron que este locus no se puede utilizar como único marcador para la identificación de especies de *Aspergillus* y *Penicillium* ya que algunos hongos y plantas tienen copias parálogas. Los genes que codifican para proteínas se utilizan ampliamente en micología para la identificación y generalmente tienen una mayor variabilidad entre especies que la región ITS. Los requisitos para un marcador de identificación secundario son claros. Debe ser fácil de amplificar, distinguir entre especies estrechamente relacionadas y, lo que es más importante, el conjunto de datos de referencia debe estar completo. Las secuencias de β -tubulina (BenA) y calmodulina (CMD) o los genes de la segunda subunidad más grande de la ARN polimerasa II (RPB2) se utilizan con frecuencia para la identificación de especies del género *Aspergillus* y *Penicillium* y pueden ser hasta mejores marcadores de especies que ITS (Samson *et al.*, 2004; Geiser *et al.*, 2007; Houbraken *et al.*, 2012).

Este análisis de secuencias multilocus es una técnica que permite resolver diferentes problemas filogenéticos en los diversos grupos de los seres vivos (Vinuesa, 2010). En los hongos al inicio se utilizó para el reconocimiento de especies debido a que superó a los métodos tradicionales

de fenotipificación (Taylor & Fisher, 2003). Para las especies del género *Penicillium*, Visagie *et al.*, (2014) recomiendan el uso de los genes de la β -tubulina (BenA), calmodulina (CMD) o la segunda subunidad larga de la ARN polimesa II (RPB2), adicionalmente al ITS.

Algunos casos excepcionales se han reportado problemas en la amplificación del genes de la segunda subunidad más grande de la ARN polimerasa II (RPB2) y calmodulina (CAM), debido a su carácter de cebador degenerado, su amplificación requiere de una correcta puesta punto de las condiciones de amplificación (Houbraken *et al.*, 2011, Houbraken *et al.*, 2012). Por lo cual, se requiere de una exhaustiva instancia de análisis de los parámetros de amplificación.

Esta particularidad fue reflejada en los resultados obtenidos en este trabajo ya que para el caso del aislamiento del hongo *Penicillium* LBM 081 y LBM 088, no se logró la amplificación del gen calmadulina por lo cual se recurrió al empleo de la amplificación de la segunda subunidad más grande de la ARN polimerasa II (RPB2) como marcador molecular complementaria para una identificación más precisa.

Los arboles concatenados con tres marcadores moleculares construidos en este trabajo, permitieron la identificación de los aislamientos obtenidos de la selva Paranaense de la Provincia de Misiones como *Penicillium crustosum* LBM 068, *Penicillium crustosum* LBM 069, *Penicillium crustosum* LBM 070, *Penicillium crustosum* LBM 073, *Penicillium discolor* LBM 079, *Penicillium rubens* LBM 081, *Penicillium chrysogenum* LBM 088, aportando estas secuencias a la base de datos *Genbank* del *NCBI*.

6.3 Screening cuantitativo de los hongos seleccionados productores de lipasas en medio líquido

El cultivo de hongos en medios líquidos suplementados con diferentes sustratos inductores de la actividadlipolítica se ha utilizado ampliamente para la selección de potenciales productores de lipasa. Esta técnica ha ayudado a complementar los métodos con agar sólido en placa para la detección de aquellos hongos que se presenten como mejores productores de la enzima lipasa. Además, ha permitido cuantificar mejor la actividad lipasa que se logró evidenciar con el método de placa en agar sólido, ya que en algunas cepas que poseen un crecimiento intensivo y sus halos producidos por la lipólisis de los sustratos podrían estar cubiertos por micelio (Kotogán *et al.*, 2014).

El proceso de fermentación sumergida es un proceso de cultivo de organismos microbianos en un medio líquido. Ha mostrado algunas ventajas como ser una mayor homogeneidad del medio

de cultivo y una mayor facilidad para controlar parámetros variables como la temperatura y el pH (Pandey *et al.*, 2000).

Esta selección de los aislamientos empleando métodos cuantitativos ha demostrado ser eficaz para la identificación de hongos que producen lipasa y otras enzimas de interés industrial o biotecnológico, de manera confiable según lo informado por Rodríguez *et al.*, (2016) quienes evaluaron la actividad de la lipasa extracelular de veinte hongos filamentosos aislados que se cultivaron en medio de fermentación líquida (SMF); los resultados mostraron que *Penicillium* sp. ECGF 02 presentaba la actividad lipasa más alta de $1800,06 \pm 0,36$ U/mL. De manera similar, la evaluación cuantitativa de la producción de lipasa de nueve organismos fúngicos cultivados en fermentación sumergida líquida con aceite de soja y glicerol como inductores, determinó que *Botryosphaeria ribis* fue el que obtuvo la mayor actividad lipasa (Messias *et al.*, 2009). Además, se encontró que éste hongo que no había mostrado actividad cualitativamente mediante el uso del método de placa producía una actividad de lipasa en medio líquido suplementado con aceite de soja (Messias *et al.*, 2009).

Además, se evaluaron doce cepas que se cribaron en el método de fermentación sumergida, lo que arrojó a *Aspergillus niger* como el mejor productor de lipasa (Toscano *et al.*, 2011). Es por ello, que los diferentes autores han utilizado en gran medida esta estrategia de combinar resultados semicuantitativos con una cuantificación en medios líquidos obteniendo resultados que han mostrado un impacto positivo en la industria de las enzimas.

En coherencia con la bibliografía, en este trabajo se realizaron los ensayos en medios de cultivo semicuantitativo y cuantitativo para la selección del mejor productor de la enzima lipasa. La producción diferencial de la actividad con la adición de aceite de oliva fue evidente en los siete aislamientos.

Siete cepas mostraron el mejor I_{AL} y por lo tanto una actividad lipolítica prometedora, por lo que fueron seleccionadas para realizar cultivos en medio líquido y cuantificar su actividad en diferentes días de incubación bajo las mismas condiciones de cultivo. Investigaciones anteriores han demostrado que el aceite de oliva sirve como uno de los mejores inductores de la actividad lipolítica (Sharma *et al.*, 2001), por lo que analizamos su efecto sobre los diferentes aislamientos en un cribado cuantitativo. Todos los hongos seleccionados y analizados en este trabajo incrementaron efectivamente su actividad en presencia de aceite de oliva y el tiempo de respuesta fue diferencial en cada caso, en concordancia con los trabajos de otros autores.

La mayor actividad en el período más corto (día 6) se obtuvo con *Penicillium rubens* LBM 081 (1224 U/mL) con la adición de aceite de oliva al medio de cultivo. Este nivel de actividad es comparable al informado por D'Annibale *et al.*, 2006 en *Penicillium citrinum*, que mostró una

actividad máxima de 1230 U/mL y a la evidenciada en *Penicillium. chrysogenum* (207 U/mL) (Shafei & Allam, 2010), así como las reportadas en otras especies de hongos como *Aspergillus niger* con 58-150 U/mL (Roberts *et al.*, 1987, Mehta *et al.*, 2018), *Trichoderma harzianum*, en el que la actividad de la lipasa extracelular aumentó gradualmente, alcanzando un máximo de 205 U/mL en el octavo día (Canseco-Pérez *et al.*, 2018), y *Rhizomucor oryzae*, que mostró una actividad de 120 U/mL en aceite de palma (Hiol *et al.*, 2000).

6.4 Caracterización bioquímica de la actividad lipolítica presente en los sobrenadantes de los hongos seleccionados

Todas las enzimas tienen una temperatura óptima de actuación, en la cual por debajo o por encima de ésta, la enzima ralentiza su velocidad de reacción enzimática. El aumento en la velocidad de reacción se produce porque con temperaturas más altas, existen más moléculas de sustrato con suficiente energía para reaccionar; mientras que la disminución de la velocidad de la reacción generalmente es debida a la desnaturalización de la enzima (Lehninger *et al.*, 2006). La mayoría de las proteínas lipasas se desnaturalizan por encima de los 45°C y aún más en temperaturas superiores a los 60°C (Li & Zong, 2010)

El pH y la temperatura afectan en gran medida a la estabilidad enzimática, por lo que su estudio es muy importante para lograr una aplicación eficiente. Por este motivo es que en este trabajo se evaluó el efecto de la temperatura y del pH sobre la estabilidad de la actividad a lo largo del tiempo de los siete aislamientos que demostraron mejor actividad lipasa tanto en los ensayos semicuantitativos como cuantitativo.

En este trabajo se detectaron que los pH óptimos para la actividad lipasa en estos aislamientos estuvieron en el rango de 7 y 7,5. En tanto que la temperaturas óptimas rondaron los 25, 30 y 40°C, coincidiendo con datos recopilados en el trabajo de Li & Zong, 2010, Oliveira *et al.*, 2016 donde se observan variaciones en la temperaturas óptimas que va desde los 25 a 50°C y pH que rondaron entre 6-9 en diferentes lipasas de hongos del género *Penicillium* (Rigo *et al.*, 2012). Así como la estabilidad en pH que rondó entre los 7 y 8, y la estabilidad en la temperaturas entre 30 y 40°C coincidiendo con las observadas en *P. abeanum*, *P. cyclopium* y *P. chrysogenum* (Li & Zong, 2010, Shafei & Allam, 2010, Rajeswari *et al.*, 2011).

La electroforesis desnaturalizante con sulfato duodecílico de sodio (SDS-PAGE), es el método más utilizado para estimar el peso molecular aparente de las enzimas (Li & Zong, 2010; Singh & Mukhopadhyay, 2012). Las lipasas son hidrolasas con masas moleculares típicamente entre 25 y 95 kDa, en el género *Penicillium* (Li & Zong, 2010; Geoffry & Achur, 2018). La masa molecular de las enzimas lipasas de los *Penicillium* varía de 25 a 80 kDa. Las enzimas que

presentan mayores masas moleculares (≥ 40 kDa) tienen la potencialidad de ser mejores para diversas aplicaciones biotecnológicas (Yang *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2016). En este trabajo, la mayor parte de las bandas observadas para los hongos seleccionados estaban en el rango de 29 a 42 kDa. Sin embargo, también se detectó una isoenzima con peso 26 kDa. Cabe señalar que las lipasas observadas en el zimograma mostraron una mayor afinidad por los ácidos grasos de cadena corta, debido a que se utilizó MUF-butirato. Por tanto, puede haber otras lipasas con afinidad por otros ácidos grasos, como las lipasas de cadena media y larga, que también pueden utilizarse para aplicaciones biotecnológicas.

Basados en los resultados obtenidos en este trabajo, en cuanto a la actividad lipasa y su caracterización fisicoquímica se decidió continuar con el hongo *Penicillium rubens* LBM 081 por poseer mejor potencialidad en vistas a su aplicación.

6.5 Evaluación del efecto de diferentes variables nutricionales y físicas sobre la actividad lipasa del hongo seleccionado *Penicillium rubens* LBM 081

Una misma enzima puede poseer distintas propiedades bioquímicas si se aplican diversas condiciones de producción al mismo organismo fúngico (Rodríguez *et al.*, 2006).

Aunque se han identificado numerosos factores que influyen en la producción de la enzima lipasa fúngica en un medio de cultivo, la presencia de un inductor particularmente aceites (utilizados al mismo tiempo como fuentes de carbono) así como fuentes de nitrógeno y parámetros fisiológicos apropiados como pH, temperatura, agitación y niveles de oxígeno son los factores que mayormente son considerados (Treichel *et al.*, 2010).

El factor principal requerido para la expresión de la actividad de la enzima lipasa siempre han sido las diversas fuentes de carbono de los aceites (aceite de oliva, tweens, aceite de maíz, aceite de girasol, aceite de canola, aceite de maní) (Li & Zong, 2010). Entre los diversos artículos reportados se destaca que la secreción extracelular de las lipasas fúngicas son estimuladas por sustratos lipídicos como el aceite de oliva (Darvishi & Hosseini, 2015), triacilglicerol (Gupta *et al.*, 2004), Tweens (Boekema *et al.*, 2007), aceite de palma, aceite de canola, aceite de maíz (Yong *et al.*, 2016), aceite de coco (Darvishi & Hosseini, 2015) en combinación con variables fisicoquímicas.

Los aceites vegetales son considerablemente baratos y fácilmente disponibles y, por tanto, se han utilizado mucho para reducir el coste de producción de las lipasas fúngicas.

Esta mejora en la producción de la enzima lipasa se ha observado en organismos fúngicos tales como *Fusarium oxysporum*, *Antrodia canela*, *Rhizopus homothalicus*, *Penicillium chrysogenum* 9', *Aspergillus niger* NCIM 1207 (Shu *et al.*, 2006, Rodríguez *et al.*, 2006, Rifaat

et al., 2010). Sin embargo, el efecto inductivo de los aceites como sustratos varía considerablemente de una especie de hongo a otra, con más informes que muestran que el aceite de oliva es el que mejores efectos inductivos ha demostrado (Wang *et al.*, 2008). Concordando con los resultados que hemos obtenido luego de los ensayos realizados con los aceites de maíz (Mazola AGD), maní (Maní King), girasol (Parafarm), chía (Tecno botánica), canola (Krol), oliva (Cocinero extra virgen), hígado de bacalao (Parafarm) realizados en *Penicillium rubens* LBM 081 se observó que el aceite de oliva al 4% tenía el mejor efecto inductivo. Este fenómeno inductivo fue observado por Lima *et al.*, (2003) en su estudio en cual se compararon los efectos de los sustratos oleosos sobre la producción de lipasa de *Penicillium aurantiogriseum* en el cual observaron que el aceite de oliva era el mejor inductor de lipasa en comparación con el aceite de girasol, soja, girasol y maíz. Similares resultados ya lo habían reportado Pinheiro *et al.*, (2008), Contesini *et al.*, (2010), en *Penicillium verrucosum* y *Penicillium citrinum* NRRL 1841 respectivamente donde el medio suplementado con aceite de oliva tiene una mayor actividad de lipasa en comparación con otros aceites.

Encontrar la concentración adecuada también es fundamental como lo ha demostrado Das *et al.*, 2016 donde una variación relativa en la actividad de la lipasa en el medio suplementado con aceite de coco al 0,1-1,5% (v/v), registraron la actividad más alta al 2,5% (v/v). Por el contrario, una concentración más alta por encima del nivel óptimo interfiere con la velocidad de difusión y aireación del oxígeno, lo que, en consecuencia, afecta el crecimiento de hongos y la producción de lipasa (Das *et al.*, 2016). Del mismo modo en este trabajo se observó que entre las concentraciones de aceite de oliva al 1; 1,5; 3; 3,5; 4; 4,5% en *Penicillium rubens* LBM 081 la actividad más alta se registró al 4%.

Adicionalmente, Ohnishi *et al.*, (1994) determinaron que una fuente de nitrógeno es indispensable para la producción de lipasa fúngica. Y posteriormente numerosos estudios han demostrado la importancia de la fuente de nitrógeno orgánico e inorgánico en la producción de lipasa fúngica (Colla *et al.*, 2016). Las fuentes de nitrógeno orgánicas presentan un gran efecto potenciador. Esto se corrobora con el hecho de que la síntesis de la lipasa fúngica requiere factores esenciales como vitaminas y aminoácidos (Bapiraju *et al.*, 2005). Además, los organismos fúngicos expresan una actividad lipasa variada en presencia de varios tipos de fuentes de nitrógeno y para una mayor mejora de la actividad de la lipasa, teniendo en cuenta la naturaleza de la fuente de nitrógeno y la concentración son de suma importancia (Lima *et al.*, 2003).

Por ello en este trabajo se evaluó cuan significativa son la adición de diferentes fuentes de nitrógeno sobre la actividad lipasa de *Penicillium rubens* LBM 081. De las fuentes de

nitrógenos empleadas extracto de carne, sulfato de amonio, peptona de carne, peptona de soja, extracto de levadura en tres concentraciones 0,3 %; 1 %; 2 %, se observó que la peptona de carne ejercía mejor influencia sobre la actividad, tal como lo reportaron Gombert *et al.*, 1999; Das *et al.*, 2016 en sus respectivos trabajos en *Penicillium restrictum* y *Aspergillus tamarii*.

La agitación es una de las variables significativas que mejora el crecimiento y la producción de lipasa fúngica posiblemente al aumentar la tasa de transferencia de oxígeno y, por lo tanto, contribuyendo a un aumento de la dispersión de las micelas de aceite para una mayor superficie de contacto con las células de los hongos, lo que mejora en gran medida la absorción de aceite y, en consecuencia, induce la secreción de lipasa (Peberdy, 1994; Teng *et al.*, 2008).

Se evidencio que la agitación influía positivamente en la actividad lipasa de *Penicillium rubens* LBM 081 cuando se lo sometía a una agitación de 140 rpm en comparación a la obtenida con 100 rpm. Concordando con los resultados obtenidos por Teng y Xu, (2008) y recopilados por Colla *et al.*, 2016, se evidenció que la agitación también influyó sobre la morfología de los micelios productores de lipasa, al producirse la formación de grupos de grumos a una velocidad de agitación mayor lo cual es importante para la síntesis de lipasa. Por el contrario, con una menor agitación, se obtuvieron los micelios dispersos.

6.6 Caracterización bioquímica de la actividad lipolítica presente el sobrenadante optimizado de *Penicillium rubens* LBM 081

Dado que temperatura y pH óptimo para una enzima depende del sustrato con el que se trabaje, ya que los ligando ejercen un efecto protector frente a la desnaturalización térmica fue necesario realizar una revisión luego de la optimización realizada (González Baceiro *et al.*, 2010).

El comportamiento de la actividad enzima lipasa del sobrenadante optimizado de *Penicillium rubens* LBM 081 fue de tipo mesófilo, la actividad óptima se registró a una temperatura de 30°C y a pH cercano a neutro. Los resultados obtenidos en este trabajo están en concordancia con los obtenidos en varios trabajos de la bibliografía, donde se reportan óptimos de temperatura y pH que se encuentran en los 30-40°C y pH de 6-7 en *P. roqueforti* IAM 7268, *P. cyclopium* y *P. chrysogenum* (Li & Zong, 2010).

Y cercanos a los reportados por Silva *et al.*, 2019 en su trabajo realizado con *P. roqueforti* donde obtuvieron un pH óptimo y una temperatura de 6,8 y 35,5 ° C.

En cuanto a la estabilidad, se observó que la actividad lipasa de *P. rubens* LBM 081 presento actividad en todas las temperaturas analizadas (desde 4°C hasta 40°C). Sin embargo, se revelo una mayor estabilidad a 30°C. Estos resultados concuerdan con los reportados por Bancercz *et*

al., 2005 en *P. chrysogenum* 9' y en *P. cyclopium* PG37 (Li & Zong, 2010), quienes también observaron un 100 % y 50% de actividad enzimática residual durante 60 min a 25 y 40°C. En general, se conoce que las lipasas fúngicas no suelen ser estables a temperaturas superiores a 40°C (Lima *et al.*, 2004). Se han registrado pocos informes relacionados con lipasas termoestables a temperaturas muy elevadas.

6.7 Secreción de enzimas de *P. rubens* LBM 081 antes y después de la optimización del medio de cultivo

El secretoma se define como el conjunto de proteínas secretadas por una célula o un organismo en un momento dado. Hay dos puntos de vista que deben tenerse en cuenta en este contexto. En primer lugar, en un sentido amplio el secretoma incluye tanto las proteínas que se liberan en el medio circundante como las que permanecen unidas a la membrana o a la pared celular o que son proteínas integrales de membrana. En segundo lugar, el secretoma, como el transcriptoma, es muy variable dependiendo de las condiciones ambientales incluyendo el sustrato de crecimiento, la temperatura y la fase de crecimiento. Aunque el número de estudios transcriptómicos fúngicos está aumentando constantemente, no es suficientemente grande aún para explicar cómo un secretoma se modula en respuesta a las condiciones ambientales en diferentes especies (Alfaro *et al.*, 2014).

La identificación de proteínas y péptidos en los análisis secretómicos se basan en la espectrometría de masas y permiten la medición precisa de la masa molecular de una proteína o péptido y su identificación buscando su masa en el conjunto completo de las masas moleculares de las proteínas o péptidos producidos por un organismo cuya secuencia genómica es conocida (Alfaro *et al.*, 2014).

Las proteínas secretadas siguen el esquema clásico de síntesis de proteínas, pero se diferenciarán de otras por la adición de un péptido señal en las secuencias codificantes que permite su direccionamiento a un orgánulo o al exterior en el medio a través de vesículas secretoras. Sin embargo, existen rutas alternativas, ya que las proteínas sin secuencia señal se encuentran en el exterior de la célula, a través de la exocitosis por vesículas recubiertas, lisosomas secretores, microvesículas o transportadores de cassettes de unión a ATP (Geoffry & Achur, 2018, Filiatrault *et al.*, 2021). Es por ello que la implementación y las constantes actualizaciones de herramientas bioinformáticas como los programas UniProt, Signal P, Secretome P y DeepLoc - 1.0 son grandes aliados en el análisis de los resultados obtenidos con la espectrofotometría de masas.

La hidrólisis enzimática de aceites y grasas además de las enzimas lipasas específicas también pueden estar acoplada a un gran complejo de enzimas hidrolíticas (Goswami *et al.*, 2013).

La hidrólisis de aceites y grasas a través de vías enzimáticas es un proceso de ahorro de energía en comparación con los procesos convencionales de alta temperatura y alta presión, y los ácidos grasos insaturados se pueden producir sin oxidación.

La lipasa posee una mayor eficiencia catalítica debido a una energía de activación mucho menor. Por lo tanto, necesita condiciones de reacción suaves de temperatura y pH que conducen a requisitos de energía mucho más bajos y la degradación térmica de los productos de reacción sigue siendo baja. La especificidad del sustrato, la especificidad posicional y la estereoespecificidad de la lipasa conducen a menos reacciones secundarias y, en última instancia, se obtienen productos de excelente pureza.

El aceite de oliva como fuente de carbono y potenciador de la actividad de la enzima lipasa ha sido ampliamente estudiado (Ganapathy *et al.*, 2019). Es por ello que nos centramos en el estudio del secretoma de *P. rubens* LBM 081 antes y después de la optimización realizada para potenciar la actividad de esta enzima.

Se identificaron en total 78 proteínas diferentes en los secretomas de *P. rubens* LBM 081, cuatro de las cuales fueron intracelulares debido quizás a una lisis celular durante la división celular o muerte celular al procesamiento de la muestra (Adav *et al.*, 2010). Las masas moleculares de la mayoría de las proteínas identificadas en los dos secretomas se concentró entre los 25 kDa y 70 kDa y los puntos isoeléctricos, entre 4 y 5, coincidiendo con las masas moleculares y puntos isoeléctricos de las enzimas hidrolíticas (Adav *et al.*, 2010).

La mayor cantidad de enzimas extracelulares encontradas en ambos secretomas de *P. rubens* LBM 081 analizados pertenecieron al grupo de las CAZy las cuales pueden degradar o modificar polisacáridos como la celulosa, las hemicelulosas y el almidón. Se descubrió que la mayoría de estas enzimas, que han sido objeto de numerosos estudios durante décadas debido a su interés industrial, rompen los enlaces glucosídicos mediante un mecanismo hidrolítico y forman parte del metabolismo basal de los hongos (Adav *et al.*, 2010).

Por otro lado al analizar el secretoma del medio optimizado se puede observar una mayor cantidad de proteínas con diferentes funciones encontrándose enzimas para el metabolismo de: lípidos (lipasas), proteínas (proteolíticas) y lignina (ligninolíticas) demostrando que el cultivo en el sistema SMF con sustratos adecuados mejora la secreción de proteínas coincidiendo con los resultados obtenidos por Yang *et al.*, 2018 en *P. chrysogenum* P33.

En cuanto a las enzimas lipasas de interés para este trabajo, del análisis de ambos secretomas podemos diferenciar un claro aumento en las enzimas presentes, es así que la presencia de

enzimas lipolíticas represento un 4,7 % en el medio control y un 9,85 % en el medio optimizado destacándose la presencia de una Mono-diacilglicerol lipasa, una lipasa y dos fosfoesterasas; obteniéndose así un perfil enzimático más rico en enzimas capaces de participar en la hidrólisis de aceites y grasas. En este sentido el peso molecular de estas lipasas estuvo entre 45-30 kDa por lo cual la acción conjunta sobre la cadena carbonada de muf-butirato ($C_{14}H_{14}O_4$) pudo llevar a una baja resolución por lo que se observo una sola banda en los zimogramas realizados. Estos hallazgos indican la importancia de seleccionar cuidadosamente el sustrato para la producción de enzimas y analizarlas para aplicarlas en el proceso biotecnológico adecuado.

6.8 Aplicación del sobrenadante optimizado de *P. rubens* LBM 081 en la hidrólisis de efluente domiciliario

El uso de aceite vegetal resulta muy necesario en las cocinas de la gran mayoría de las viviendas y negocios de comidas, por lo que su consumo es continuo y se obtienen grandes cantidades de los residuos contaminantes, los aceites procedentes de frituras ocasionan alteraciones químicas en su estructura y también alteraciones en los alimentos por lo cual estos aceites son desechados después de un cierto tiempo de haber sido utilizados (López Vargas, 2017)

La centrales cloacales al no contar con un gestor adecuado para la disposición final de los aceites vegetales proveniente del proceso de frituras se ve en la necesidad de implementar un método efectivo y económico para tratar dichos aceites a través de técnicas biológicas que utilizan la capacidad de los microorganismos para degradar, remover o transformarlos a compuestos más inocuos para el ambiente.

Por este motivo surge la necesidad de emplear el tratamiento biológico que beneficie a los recursos hídricos y promueva la conservación de la flora, fauna acuáticas mejorando el medio ambiente y la calidad de vida de su toda la población. De este modo se pueda contribuir con una nueva alternativa en el tratamiento para eliminar o reducir su potencial peligrosidad y los centros de comida empezarán a dar un adecuado tratamiento de los aceites vegetales usados (López Vargas, 2017).

En la actualidad, existe un crecimiento en el uso de lipasas en las industrias. La búsqueda extensa y persistente de nuevos microorganismos y su perfil de enzimas lipolíticas ha generado caminos novedosos y diversos para los procesos tecnológicos y también ha proporcionado una ruta ecológica alternativa para resolver problemas ambientales (Liew *et al.*, 2014).

La degradación del aceite en los efluentes se produce como resultado de la hidrólisis del aceite realizada por lipasas fúngicas, que degrada el aceite en ácidos orgánicos y ácidos grasos

volátiles (AGV) a través de la vía de degradación de los ácidos grasos, donde finalmente el aceite se descompone en dióxido de carbono y agua (Ganapathy *et al.*, 2019).

En esta tesis se realizaron los ensayos de hidrolisis de dos efluentes con diferentes características en su contenido de aceites, un efluente que contenía solo aceite de oliva y un efluente con una mezcla de aceites proveniente de residuos domiciliarios. El análisis de la hidrolisis se realizó empleando el sobrenadante obtenido de *Penicillium rubens* LBM 081 en dos porcentajes diferentes al 26 % (26 % de sobrenadante optimizado y 74 % del efluente domiciliario) y 44 % (44 % de sobrenadante optimizado y 56 % del efluente domiciliario); de los ensayos realizados, cada ensayo fue realizado en agitación a 140 rpm, para lograr una exposición homogénea del sobrenadante a los aceites presentes en el efluente.

En el análisis de estos ensayos se observó una mejor remoción de los aceites de oliva y en menor medida en el aceite obtenido de un domicilio, utilizando una concentración del 44% a las 24 h, estos resultados concordaron con los obtenidos en Posso Mendoza *et al.*, 2020 en *Yarrowia Lipolytica*, quienes reportaron que la remoción dependía mucho del porcentaje de sobrenadante empleado. Estos autores demostraron que la capacidad lipolítica expuesta por el extracto enzimático crudo de *Yarrowia lipolytica* ATCC 9773 fue influida por los parámetros (pH, concentración de inóculo 8%, 12% y 16%). Los mejores resultados fueron obtenidos cuando se sometió al efluente por un periodo de 32 h de cultivo a una temperatura de 27 ° C y un pH de 5,0 y una concentración del inóculo del 16 %.

Por otra parte se comprobó que el uso de los ensayos de toxicidad con plantas vasculares permiten detectar los efectos biológicos de los tóxicos contenidos en los efluentes, tal como lo indica Yong *et al.*, 2012.

7. CONCLUSIONES

- ❖ El *screening* inicial utilizando métodos fluorométricos permitió seleccionar siete aislamientos del género *Penicillium* con capacidad lipolítica de manera rápida y eficiente.
- ❖ Los aislamientos seleccionados se identificaron como: *Penicillium crustosum* LBM 068, *Penicillium crustosum* LBM 069, *Penicillium crustosum* LBM 070, *Penicillium crustosum* LBM 073, *Penicillium discolor* LBM 079, *Penicillium rubens* LBM 081, *Penicillium chrysogenum* LBM 088.
- ❖ La adición de aceite de oliva en los medios de cultivo mostró una marcada influencia potenciando la actividad lipasa en los siete hongos. Los hongos *Penicillium crustosum* LBM 070, *Penicillium crustosum* LBM 073 y *Penicillium rubens* LBM 081 presentaron los mejores niveles de actividad lipasa.
- ❖ La temperatura óptima para la actividad lipasa rondó los 25, 30 y 40 °C y los pH óptimos en el rango de 7 y 7,5. La actividad lipasa en los sobrenadantes mostró ser más estable a los 30 °C y en el rango de pH 7 y 7,5. Los hongos presentaron un perfil diferencial de isoenzimas relacionado a la presencia o ausencia de aceite de oliva en el medio de cultivo.
- ❖ *Penicillium rubens* LBM 081 presentó los títulos más altos de actividad lipasa en menor tiempo, una temperatura óptima de 30 °C, pH 7 y alta estabilidad a 30 °C y a pH 7 y 7,5; emergiendo cómo el mejor candidato para generar lipasas que pudieran ser aplicadas en la hidrólisis de aceites y grasas.
- ❖ La actividad lipasa de *P. rubens* LBM 081, al igual que otras lipasas fúngicas, depende en gran medida de las fuentes de carbono y de nitrógeno presentes en el medio. La máxima actividad enzimática (2780 U/mL) se logró cuando el hongo creció en el medio de cultivo optimizado suplementado con peptona 2%, aceite de oliva 4% y se inoculó con una concentración de esporas 1×10^6 e incubó a 30 °C 140 rpm.
- ❖ *P. rubens* LBM 081 presentó una enzima de 42 kDa en el medio optimizado. La actividad óptima de la lipasa estuvo dentro del rango encontrado para la mayoría de las lipasas fúngicas 30°C. La termoestabilidad fue mayor a 30 °C seguida de 25 °C, disminuyendo a temperaturas más elevadas probablemente por desnaturalización de la estructura enzimática. El pH óptimo de la lipasa de *P. rubens* LBM 081 también estuvo dentro del rango encontrado para las lipasas fúngicas: 7. La actividad enzimática fue más estable a los pHs 7; 7,5.
- ❖ El secretoma de *P. rubens* LBM 081 en los sobrenadantes analizados, presentó una expresión diferencial de las enzimas implicadas en degradar los compuestos lipídicos

presentes en el medio. El medio optimizado con peptona 2%, aceite de oliva 4% demostró un incremento en la cantidad de enzimas lipolíticas secretadas.

- ❖ El sobrenadante enzimático optimizado con altos títulos de actividad lipasa de *P. rubens* LBM 081 disminuyó la concentración de DQO, de aceites y grasas totales y la toxicidad demostrando un potencial en la remediación de los efluentes utilizados.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.

- Abada, Emad, A. (2019).** Application of Microbial Enzymes in the Dairy Industry. *Enzymes in Food Biotechnology. Elsevier Inc*, 61-72.
- Abo, M. (1990).** Method of purifying dry-cleaning solvent by decomposing liquid contaminants with a lipase. *World Organization Patent* 9,007,606.
- Abrunhosa, L.,** Oliveira, F., Dantas, D., Gonçalves, C. & Belo, I. (2013). Producción de lipasa por *Aspergillus ibericus* utilizando aguas residuales de almazara. *Ingeniería de bioprocesos y biosistemas*, 36 (3), 285-291.
- Adav, S.S.,** Li, A.A., Manavalan, A., Punt, P., Sze, S.K. (2010). Quantitative iTRAQ secretome analysis of *Aspergillus niger* reveals novel hydrolytic enzymes. *Journal of proteome research* 9(8), 3932-3940.
- Adrio, J. L., & Demain, A. L. (2014).** Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, 4(1), 117–139. <https://doi.org/10.3390/biom4010117>
- Alfaro, M.,** Oguiza, J. A., Ramírez, L., & Pisabarro, A. G. (2014). Comparative analysis of secretomes in basidiomycete fungi. *Journal of Proteomics*, 102, 28-43.
- Andualema, B., & Gessesse, A. (2012).** Microbial Lipases and Their Industrial Applications: Review. *Biotechnology (faisalabad)*, 11, 100-118.
- Anobom, C. D.,** Pinheiro, A. S., De-Andrade, R. A., Aguiéiras, E. C. G., Andrade, G. C., Moura, M. V., Almeida, R. V., & Freire, D. M. (2014). From structure to catalysis: Recent developments in the biotechnological applications of lipases. *BioMed Research International*, 2014, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/684506>
- Aouf C.,** Durand E., Lecomte J., Figueroa Espinoza M. C., Dubreucq E., Fulcrand, H. *et al* (2014) The use of lipases as biocatalysts for the epoxidation of fatty acids and phenolic compounds. *Green Chemistry* 16(4):1740–1754. <https://doi.org/10.1039/C3GC42143K>
- Arpigny, J. L. & Jaeger, K. E. (1999).** Bacterial lipolytic enzymes: Classification and properties. *Biochemical Journal*, 343, 177–183.

B.

- Balaji, L.,** Chittoor, J. T., & Jayaraman, G. (2020). Optimization of extracellular lipase production by halotolerant *Bacillus* sp. VITL8 using factorial design and applicability of enzyme in pretreatment of food industry effluents. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 50 (7), 708–716.
- Bancerz, R.,** Ginalska, G., Fiedurek, J., & Gromada, A. (2005). Cultivation conditions and properties of extracellular crude lipase from the psychrotrophic fungus *Penicillium chrysogenum* 9'. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32(6), 253-260.

- Bancerz, R.**, Ginalska, G., Fiedurek, J., & Gromada, A. (2005). Cultivation conditions and properties of extracellular crude lipase from the psychrotrophic fungus *Penicillium chrysogenum* 9'. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 32, 253–260.
- Bapiraju, K. V.**, Sujatha, P., Ellaiah, P., & Ramana, T. (2005). Sequential parametric optimization of lipase production by a mutant strain *Rhizopus* sp. BTNT-2. *Journal of basic microbiology*, 45(4), 257–273. <https://doi.org/10.1002/jobm.200410548>.
- Barchuk, M. L.** (2017). Caracterización bioquímica y genética de endoxilasas secretadas por *Trichoderma* sp. nativos de Misiones para su utilización en el proceso de pretratamiento. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Misiones. Argentina.
- Bertrand B.**, Martínez-Morales F., & Trejo-Hernández M. R. (2017). Upgrading Laccase Production and Biochemical Properties: Strategies and Challenges. *Biotechnology Progress*, 33(4), 1015-1034.
- Bhatia R. P.** (1990). Contact lens cleaning composition containing an enzyme and a carboxylvinyl polymer, *United States Patent* 4,921,630.
- Bian, C.**, Yuan, C., Chen, L., Meehan, E. J., Jiang, L., Huang, Z., Lin, L., & Huang, M. (2010). Crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Penicillium expansum* at 1.3 Å determined by sulfur SAD. *Proteins*, 78(6), 1601–1605. <https://doi.org/10.1002/prot.22676>.
- Bindiya, P. A.** & Ramana, T. (2014). Optimization of lipase production from an indigenously isolated marine *Aspergillus sydowii* of Bay of Bengal. *Journal of Biochemistry and Biotechnology* 3, 198–202.
- Biourge, P.** (1923). Les moisissures du groupe *Penicillium* Link. *Cellule*, 33, 7–331.
- Blanco, A.**, & Blanco, G. (2017). Enzymes. *Medical Biochemistry* (153-175). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803550-4.00008-2>
- Boekema, B. K.**, Beselin, A., Breuer, M., Hauer, B., Koster, M., Rosenau, F., Jaeger, K. E., & Tommassen, J. (2007). Hexadecane and Tween 80 stimulate lipase production in *Burkholderia glumae* by different mechanisms. *Applied Environmental Microbiology* 73, 3838–3844.
- Bora, L.**, Gohain, D., & Das, R. (2013). Recent advances in production and biotechnological applications of thermostable and alkaline bacterial lipases. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 88 (11):1959–1970. <https://doi.org/10.1002/jctb.4170>.
- Borrelli, G. M.**, & Trono, D. (2015). Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9), 20774–20840. <https://doi.org/10.3390/ijms160920774>.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Buisman, G. J. H.**; Van-Helteren, C. T. W.; Kramer, G. F. H.; Veldsnek, J. W.; Derksen, J. T. P.; & Cuperus, F. P. (1998). Enzymatic esterifications of functionalized phenols for the synthesis of lipophilic antioxidants. *Biotechnology Letters* 20: 131-136.

C.

- Canseco-Pérez, M. A.,** Castillo-Ávila, G. M., Chi-Manzanero, B., Islas-Flores, I., Apolinar-Hernández, M. M., Rivera-Muñoz, G., Gamboa-Angulo, M., Sanchez-Teyer, F., Couoh-Uicab, Y., & Canto-Canché, B. (2018). Fungal Screening on Olive Oil for Extracellular Triacylglycerol Lipases: Selection of a *Trichoderma harzianum* Strain and Genome Wide Search for the Genes. *Genes*, 9(2), 62. <https://doi.org/10.3390/genes9020062>.
- Carbohydrate** Active Enzymes Database, (<http://www.cazy.org>) [Consulta: marzo de 2022].
- Carrillo, L. (2003).** *Los Hongos de los alimentos y forrajes*. Salta, Argentina: Universidad Nacional de Salta.
- Casas-Godoy L.,** Gasteazoro F., Duquesne S., Bordes F., Marty A., & Sandoval G. (2018) Lipases: An Overview. In: Sandoval G. (eds) Lipases and Phospholipases. *Methods in Molecular Biology*, vol 1835. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8672-9_1.
- Castillo, Edmundo;** Casas-Godoy, Leticia & Sandoval, Georgina. (2016). Medium engineering: a useful tool for modulating lipase activity and selectivity. *Biocatalysis*. 1. 10.1515/boca-2015-0013.
- Cesário, L. M.,** Pires, G. P., Pereira, R., Fantuzzi, E., da Silva Xavier, A., Cassini, S., & de Oliveira, J. P. (2021). Optimization of lipase production using fungal isolates from oily residues. *BMC biotechnology*, 21(1), 65. <https://doi.org/10.1186/s12896-021-00724-4>.
- Chandra, P.,** Enespa, Singh, R., & Arora, P. K. (2020). Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. *Microbial cell factories*, 19(1), 169. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01428-8>.
- Choi, J. M.;** Han, S. S., & Kim, H. S. (2015). Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnology advances*, 33(7), 1443-1454.
- Chylenski P.,** Forsberg Z., Ståhlberg J., Várnai A., Lersch M., Bengtsson O., & Eijsink V. G. (2017). Development of minimal enzyme cocktails for hydrolysis of sulfite-pulped lignocellulosic biomass. *Journal of biotechnology*, 246, 16-23
- Colla, L. M.,** Primaz, A. L., Benedetti, S., Loss, R. A., de Lima, M., Reinehr, C. O., Bertolin, T. E., & Costa, J. A. (2016). Surface response methodology for the optimization of lipase production under submerged fermentation by filamentous fungi. *Brazilian Journal of Microbiology* 47, 461–467.
- Coniglio, R. O. (2017).** Aspectos bioquímicos y moleculares de celobiohidrolasas fúngicas con potencial aplicación en el proceso de sacarificación. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Misiones. Argentina.
- Contesini, F.J.,** Lopes, D. B., Macedo, G. A., da Graça Nascimento, M., & de Oliveira Carvalho, P. (2010). *Aspergillus* sp. lipase: potential biocatalyst for industrial use. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 67, 163–171.
- Cotten, S. W. (2020).** Evaluation of exocrine pancreatic function. In *Contemporary Practice in Clinical Chemistry*, 573-585. *Academic Press*. <https://doi.org/10.1016/C2017-0-03060-4>.

D.

- Darvishi, F. & Hosseini, B. (2015).** Investigation the effect of olive oil feeding strategies on yarrowia lipolytica lipase production. *Journal of Molecular Biology* 4, 1–8.
- Das, A., Bhattacharya, S., Shivakumar, S., Shakya, S., & Sogane, S. S. (2016).** Coconut oil induced production of a surfactant-compatible lipase from *Aspergillus tamarii* under submerged fermentation. *Journal of Basic Microbiology* 57, 114–120.
- Dauber S. R. & Boehnke B. (1993).** German Patent DE-4141832.
- DeepLoc - 1.0,** <https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?DeepLoc-1.0> [Consulta: marzo 2022].
- Delgado, Clarissa, Prado, Debora, Facanili, Roselaine, Marques, Marcia, Nascimento, Augusto, Zambuzzi, W. F. & Fleuri, Luciana. (2017).** Bioremediation of cooking oil waste using lipases from wastes. *PLoS ONE*. 12. 10.1371/journal.pone.0186246.
- Demjanová, S., Jevinová, P., Pipová, M., & Regecová, I. (2020).** Identification of *Penicillium verrucosum*, *Penicillium commune*, and *Penicillium crustosum* Isolated from Chicken Eggs. *Processes*.
- Di Luccio, M., Capra, F., Ribeiro, N. P., Vargas, G. D., Freire, D. M., & de Oliveira, D. (2004).** Effect of temperature, moisture, and carbon supplementation on lipase production by solid-state fermentation of soy cake by *Penicillium simplicissimum*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 113(1), 173-180.
- Díaz, Gabriela V. (2019).** Producción de xilanasas a partir de *aspergillus* nativos de Misiones (Argentina) y su potencial aplicación en la hidrólisis de residuos agroindustriales. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Misiones. Argentina.
- Diaz, Pilar; Prim, Núria & Pastor, Francisco. (1999).** Direct Fluorescence-Based Lipase Activity Assay. *BioTechniques*. 27. 696-8, 700. 10.2144/99274bm14.
- Dierckx, R. P. (1901).** Un essai de revision du genre *Penicillium* Link. In *Annales de la Société Scientifique Bruxelles* (Vol. 25, pp. 83-89).
- Dietzen, Dennis J. (2018).** Amino Acids, Peptides, and Proteins. En Nader Rifai, Andrea Rita Horvath, Carl T. Wittwer (Ed.), *Principles and Applications of Molecular Diagnostics* (345-380). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816061-9.00013-8>.
- Doriya, K., Jose, N., Gowda, M., & Kumar, D. S. (2016).** Solid-State Fermentation vs Submerged Fermentation for the Production of l-Asparaginase. *Advances in food and nutrition research*, 78, 115–135. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.05.003>.

E.

- Eryilmaz, T, Kadir M, Cesur C, & Gokdogan O. (2016).** Biodiesel production potential from oil seeds in Turkey. *Renew Sustain Energy Rev*. 58: 842-851.

F.

- Fan, X.,** Niehus, X., & Sandoval, G. (2012). Lipases as biocatalyst for biodiesel production. *Method in Molecular Biology* 861: 471-483.
- Farahat, S. M.;** Rabie, A. M., & Faras, A. A. (1990). Evaluation of the Proteolytic and Lipolytic Activity of Different *Penicillium roqueforti* Strains. *Food Chemistry* 36: 169-180.
- Ferrer Polo, J.,** Seco Torrecillas, A., & Robles Martínez, Á. (2018). Tratamientos biológicos de aguas residuales. Editorial **Universitat Politècnica de València**.
- Filiatrault-Chastel, C.,** Heiss-Blanquet, S., Margeot, A., Berrin, JG. (2021). From fungal secretomes to enzymes cocktails: The path forward to bioeconomy. *Biotechnology Advances* Vol 52,107833,<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107833>.
- Fonseca M. I.,** Fariña J. I, Sadañoski M. A., D'Errico R., Villalba L. L. & Zapata P. D. (2015). Decolorization of Kraft liquor effluents and biochemical characterization of laccases from *Phlebia brevispora* BAFC 633. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 104, 443-451.
- Fonseca M. I.,** Tejerina M. R., Sawostjanik-Afanasiuk S. S., Giorgio E. M., Barchuk M. L., Zapata P. D. & Villalba L. L. (2016). Preliminary studies of new strains of *Trametes* sp. from Argentina for laccase production ability. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(2), 287-297.

G.

- Ganapathy, B.,** Yahya, A., & Ibrahim, N. (2019). Bioremediation of palm oil mill effluent (POME) using indigenous *Meyerozyma guilliermondii*. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(11), 11113-11125.
- Gardes, M.,** Fortin, J., White, T. J., Bruns, T. D. & Taylor, J. W. (1991). Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in mycorrhizae by amplification of the internal transcribed spacer. *Canadian Journal of Botany* 69:180–190.
- Gashaw, A.;** Getachew T, & Teshita A. (2015). A Review on biodiesel production as alternative fuel. *Journal of forest Products & Industries* 4: 80-85.
- Geiser, D. M.,** Klich, M. A., Frisvad, J. C., Peterson, S. W., Varga, J., & Samson, R. A. (2007). The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in mycology*, 59, 1–10. <https://doi.org/10.3114/sim.2007.59.01>.
- Geoffry, K.,** & Achur, R. N. (2018). Screening and production of lipase from fungal organisms. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 14, 241-253.
- Gillis A. (1988).** Research discovers new roles for lipases. *Journal of the American Oil Chemists Society* 65: 849-852.

- Glass N.L., & Donaldson G.C (1995).** Development of premier sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61:1323-1330.
- Golaki, B. P.,** Aminzadeh, S., Karkhane, A. A., Yakhchali, B., Farrokh, P., Khaleghinejad, S. H., Tehrani, A. A., & Mehrpooyan, S. (2015). Cloning, expression, purification, and characterization of lipase 3646 from thermophilic indigenous *Cohnella* sp. A01. *Protein Expression and Purification*, 109 (October), 120–126.
- Gombert, A. K.,** Pinto, A. L., Castilho, L. R., & Freire, D. M. (1999). Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. *Process Biochemistry* 35, 85–90.
- González Baceiro, J.,** Rodríguez Hernández, J., & del Monte Martínez, A. (2010). Las lipasas: enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(1), 124–140.
- Gopinath S,** Hilda A, & Ramesh VM. (1998). Detection of biodegradability of oils and related substances. *Journal of Environmental Biology* 19(2): 157-165.
- Gopinath, S. C.,** Anbu, P. & Hilda, A. (2005). Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. *Mycoscience* 46, 119–126.
- Gopinath, Subash;** Anbu, Priyanka; LakshmiPriya, Thangavel; & Hilda, Azariah. (2013). Strategies to Characterize Fungal Lipases for Applications. Medicine and Dairy Industry. *BioMed research international*.
- Goswami, D.,** Basu, J.K., De., S. (2013). Lipase applications in oil hydrolysis with a case study on castor oil: a review. *Critical Reviews in Biotechnology* 33(1):81-96. doi:10.3109/07388551.2012.672319.
- Gupta R.,** Rathi P., & Bradoo S. (2003). Lipase mediated upgradation of dietary fats and oils. *Critical Reviews in Food Science Nutrition* 43(6): 635-644.
- Gupta, R.,** Gupta, N., & Rathi, P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64, 763–781.
- Gupta, R.;** Kumari, A.; Syal, P.; & Singh, Y. (2015). Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology. *Progress in Lipid Research* 57, 40–54.
- Gurung, N.,** Ray, S., Bose, S., & Rai, V. (2013). A broader view: Microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed Research International*, 2013, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2013/329121>.

H.

- Hasan F.,** Shah A. A., & Hameed A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology* 39(2): 235–251.

- Hatice, Paluzar;** Didem, Tuncay; & Halide, Aydogdu (2021) Production and characterization of lipase from *Penicillium aurantiogriseum* under solid-state fermentation using sunflower pulp. *Biocatalysis and Biotransformation* 39:4, 333-342, DOI: 10.1080/10242422.2021.1901888.
- Healy, R. A.;** Kumar, T. K.; Hewitt, D. A.; & McLaughlin, D. L. (2013) Functional and phylogenetic implications of septal pore ultrastructure in the ascoma of *Neolecta vitellina*. *Mycologia* 105: 802–813
- Hibbett, D. S.,** Blackwell, M., James, T. Y., Spatafora, J. W., Taylor, J. W., & Vilgalys, R. (2018). Phylogenetic taxon definitions for Fungi, Dikarya, Ascomycota and Basidiomycota. *IMA fungus*, 9, 291–298. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2018.09.02.05>
- Hiol, A.,** Jonzo, M. D., Rugani, N., Druet, D., Sarda, L., & Comeau, L.C. (2000). Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *Enzyme and Microbial Technology* 26, 421–430.
- Hiraishi, T.,** & Taguchi, S. (2009). Enzyme-catalyzed synthesis and degradation of biopolymers. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 6(1), 44-54.
- Hong, S.B.,** Go, S.J., Shin, H. D., Frisvad, J.C., Samson R.A. (2005). Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia*, 97(6), 1316-1329.
- Horchani, H.;** Aissa, I.; Ouertani, S.; Zarai, Z.; Gargouri, Y.; & Sayari, A. (2012). Staphylococcal lipases: Biotechnological applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 76: 125-132.
- Houbraken, J.,** & Samson, R. A. (2011). Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families. *Studies in mycology*, 70(1), 1–51. <https://doi.org/10.3114/sim.2011.70.01>.
- Houbraken, J.,** de Vries, R. P., & Samson, R. A. (2014). Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Advances in applied microbiology*, 86, 199–249. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800262-9.00004-4>.
- Houbraken, J.,** Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2011). Taxonomy of *Penicillium* section Citrina. *Studies in Mycology*, 70, 53–138.
- Houbraken, J.,** Frisvad, J. C., Seifert, K. A., Overy, D. P., Tuthill, D. M., Valdez, J. G. & Samson, R. A. (2012). New penicillin-producing *Penicillium* species and an overview of section Chrysogena. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 29(1), 78-100.
- Houbraken, J.,** Kocsubé, S., Visagie, C. M., Yilmaz, N., Wang, X. C., Meijer, M., Kraak, B., Hubka, V., Bensch, K., Samson, R. A., & Frisvad, J. C. (2020). Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (*Eurotiales*): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Studies in mycology*, 95, 5–169. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.05.002>.
- Hubka, V.,** & Kolarik, M. (2012). β -tubulin paralogue tubC is frequently misidentified as the BenA gene in *Aspergillus* section Nigri taxonomy: primer specificity testing and taxonomic consequences. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 29(1), 1-10.

I.

INTI. Instituto Nacional de Tecnología Industrial. 10º Jornadas de Desarrollo e Innovación 1-4, 2014.

Islam, R. & Datta, B. (2015). Fungal diversity and its potential in environmental cleanup. *International Journal of Research* 2: 815-825.

Izumi, T.; Tamura, F.; Akutsu, M.; Katou, R.; & Murakami, S. (1997). Enzymatic Transesterification of 3, 7-Dimethyl-4,7- octadien-1-ol using lipases. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 68(1): 57-64.

J.

Javed, S., Azeem, F., Hussain, S., Rasul, I., Siddique, M. H., Riaz, M., Afzal, M., Kouser, A., & Nadeem, H. (2018). Bacterial lipases: A review on purification and characterization. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 132, 23–34.

Jecu, L.; Gheorghe, A.; Rosu, A.; Raut, .I; Grosu, E.; & Ghuirea, M. (2010). Ability of fungal strains to degrade PVA based materials. *Journal of Polymers and the Environment* 18: 284-290.

K.

Kadokawa, J. I., & Kobayashi, S. (2010). Polymer synthesis by enzymatic catalysis. *Current opinion in chemical biology*, 14(2), 145-153.

Kapoor, M., & Gupta, M. N. (2012). Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry*, 47(4), 555-569.

Kato, K.; Nakamura, S.; Sakugi, T.; Kitai, K.; Yone, K.; Suzuki, J.; & Ichikawa, Y. (1989). Tumor necrosis factor and its activators for the treatment of malignant tumors, Japanese Patent 1,186,820.

Kinsella, J. E. & Hwang, D. (1976). Biosynthesis of flavors by *Penicillium roqueforti*. *Biotechnology and Bioengineering* 18(2): 927-938.

Kobayashi, H. (1989). Liquid leather cleaners, Japanese Patent 1,225,700.

Kotogán, A., Németh, B., Vágvölgyi, C., Papp, T., & Takó, M. (2014). Screening for extracellular lipase enzymes with transesterification capacity in Mucoromycotina strains. *Food Technology and Biotechnology* 52, 73–82.

Kouker, G., & Jaeger, K. (1987). Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 211 - 213.

- Kruger, J.;** Grabowski, P.J.; Zaug, A.J.; Sands; Gottschling, D.E.; & Cech, T.R. (1982). Self-splicing RNA: Auto-excision and auto-cyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell* 31: 147-157.
- Ktata, A.,** Krayem, N., Aloulou, A., Bezzine, S., Sayari, S., Chamkha, M., Karray, A. (2020). Purification, biochemical and molecular study of lipase producing from a newly thermophilic alkaliphilic *Aeribacillus pallidus* for oily wastewater treatment. *Journal of Biochemistry* 167 (1) 89–99.
- Kuhad, R. C.,** Gupta, R., & Singh, A. (2011). Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme research*, 2011 10 pag. <https://doi.org/10.4061/2011/280696>.
- Kumar, N. Vinod;** Rani, Mary Esther; Gunaseeli, R. & Kannan, N. D. (2016). Utilization of Medicinal Oil Effluent for Lipase Production by *Penicillium citrinum* MKF3. In: Prashanthi, M., Sundaram, R. (eds) Integrated Waste Management in India. *Environmental Science and Engineering*. Springer, Cham. 10.1007/978-3-319-27228-3_12.
- Kumar, Sunil,** Hammer, Anisha, Singh, Varsha, Nandy, Suchismita, Khare, Sunil & Negi, Sangeeta. (2012). Bioremediation of waste cooking oil using a novel lipase produced by *Penicillium chrysogenum* SNP5 grown in solid medium containing waste grease. *Bioresource technology*. 120. 300-4. 10.1016/j.biortech.2012.06.018.
- Kumar, T. K. A.;** Crow, J. A.; Wennblom, T. J.; Abril, M., Letcher, P. M; *et al.* (2011). An ontology of fungal subcellular traits. *American Journal of Botany* 98: 1504–1510.

L.

- Laemmli, U. K. (1979).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680- 685.
- Lehninger, A.,** Nelson, D., & Cox, M. (2006). Principios de Bioquímica 4ª Edición, Ed. Omega, Barcelona, pp. 211-212.
- Lequette, Yannick;** Boels, Gauthier; Clarisse, Martine; & Faille, Christine. (2010). Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry. *Biofouling*, Vol. 26, No. 4, 421–43
- Li, N., & Zong, M. H. (2010).** Lipases from the genus *Penicillium*: production, purification, characterization and applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 66(1-2), 43-54.
- Li, S.,** Yang, X., Yang, S., Zhu, M., & Wang, X. (2012). Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. *Computational and structural biotechnology journal*, 2(3), e201209017.
- Liew, W. L.,** Kassim, M. A., Muda, K., Loh, S. K., & Affam, A. C. (2015). Conventional methods and emerging wastewater polishing technologies for palm oil mill effluent treatment: a review. *Journal of environmental management*, 149, 222-235.

- Lima, V. M. G.,** Krieger, N., Mitchell, D. A., & Fontana, J. D. (2004). Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. *Biochemical Engineering Journal*, 18(1), 65-71.
- Lima, V. M.,** Krieger, N., Sarquis, M. I., Mitchell, D. A., Ramos, L. P., Fontana, J. D., (2003). Effect of nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. *Food Technology and Biotechnology* 41, 105–110
- Link, H. F. (1809).** Observationes in Ordines plantarum naturales, Dissertatio 1 ma (Berlin Ges. NatKde 3: 1–42). *Berlin, Germany*.
- Liu, L.,** Yang, H., Shin, H. D., Chen, R. R., Li, J., Du, G., & Chen, J. (2013). How to achieve high-level expression of microbial enzymes: strategies and perspectives. *Bioengineered*, 4(4), 212–223. <https://doi.org/10.4161/bioe.24761>
- Liu, R.,** Tang, Y., & Bai, F. (2019). *Sheng wu gong cheng xue bao. Chinese journal of biotechnology*, 35(5), 749–758. <https://doi.org/10.13345/j.cjb.180394>.
- Liu, X. & Kokare, C. (2017).** Microbial Enzymes of Use in Industry. In *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00011-X>
- Liu, Y. J.,** Whelen, S., & Hall, B. D. (1999). Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular biology and evolution*, 16(12), 1799-1808.
- Loli, H.;** Narwal, S. K.; Saun, N. K.; Gupta, R. (2015). Lipases in Medicine: An Overview. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 15(14): 1209-1216.
- López Vargas, Karina Ximena. (2017).** Evaluación comparativa en la biodegradación de aceites vegetales generados en el proceso de frituras mediante el hongo *Aspergillus niger* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba.

M.

- Mahmoud, G. A.;** Koutb, M. M. M.; Morsy, F. M.; & Bagy, M. M. K. (2015). Characterization of lipase enzyme produced by hydrocarbons utilizing fungus *Aspergillus terreus*. *European Journal of Biological Research* 5(3): 70-77.
- Mane, Pajakta & Tale, Vidya. (2015).** Overview of microbial therapeutic enzymes. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science* 4(4), 17-26.
- Mase, T.,** Matsumiya, Y., & Matsuura, A. (1995). Purification and characterization of *Penicillium roqueforti* IAM 7268 lipase. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 59(2), 329-330.
- Mauti, G. O.;** Onguso, J.; Kowanga, D. K.; & Mauti, E. M. (2016). Biodegradation activity of *Aspergillus niger* lipase isolates from a tropical country garage. *Journal of Scientific and Innovative Research* 5: 15-18.

- Mehta, A.,** Bodh, U., & Gupta, R. (2018). Isolation of a novel lipase producing fungal isolate *Aspergillus fumigatus* and production optimization of enzyme. *Biocatalysis and Biotransformation*, 36(6), 450–457 10.1080/10242422.2018.1447565.
- Melani, N. B.,** Tambourgi, E. B., & Silveira, E. (2020). Lipases: From Production to Applications. *Separation and Purification Reviews*, 49(2), 143–158.
- Messias, J. M.,** da Costa, B. Z., de Lima, V. M., Dekker, R. F., Rezende, M. I., Krieger, N., & Barbosa, A. M. (2009). Screening *Botryosphaeria* species for lipases: production of lipase by *Botryosphaeria ribis* EC-01 grown on soybean oil and other carbon sources. *Enzyme and Microbial Technology* 45, 426–431.
- Metzger, J. O.;** & Bornscheuer, U. (2006). Lipids as renewable resources: current state of chemical and biotechnological conversion and diversification. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71(1): 13-22.
- Mouad, A. M.;** Taupin, D.; Lehr, L.; Yvergnaux, F.; & Porto, A. L. M. (2016). Aminolysis of linoleic and salicylic acid derivatives with *Candida antarctica* lipase B: A solvent-free process to obtain amphiphilic amides for cosmetic application. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 126: 64-68.
- Moussavou Mounguengui,** R.W.; Brunschwig, C.; Baréa, B.; Villeneuve, P.; & Blin, J. (2013). Are plant lipases a promising alternative to catalyze transesterification for biodiesel production. *Progress in Energy and Combustion Science* 39, 441–456.
- Murray, P. R.,** Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2021). *Medical microbiology* (9° Edición). Philadelphia: Elsevier/Saunders.

N.

- Nagodawithana, T.;** & Reed, G. (1993) Enzymes in food processing. 3rd edition. Edited by Nagodawithana T, Reed G. San Diego: *Academic Press*; 1993; 1-480.
- Nakamura, K.,** & Nasu, T. (1990). Enzyme containing bleaching composition, Japanese Patent 2,208,400.
- Narwal, S.K. &** Gupta, R. (2013). Biodiesel production by transesterification using immobilized lipase. *Biotechnology Letters* 35(4): 479-490.
- Navarro González, I.,** & Periago, M. J. (2012). Enzimas lipolíticas bacterianas: propiedades, clasificación, estructura, aplicaciones tecnológicas y aspectos legales. *Anales de Veterinaria de Murcia*, 28, 45–65.
- Nelson, J. H. (1970).** Production of blue cheese flavor via submerged fermentation by *Penicillium roqueforti*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 18(4): 567-569.
- Nimkande, Vijay &** Bafana, Amit. (2022). A review on the utility of microbial lipases in wastewater treatment. *Journal of Water Process Engineering* 46. 102591. 10.1016/j.jwpe.2022.102591.

Nwaguma, Ijeoma, Chikere, Chioma & Okpokwasili, Gideon. (2016). Isolation, characterization, and application of biosurfactant by *Klebsiella pneumoniae* strain IVN51 isolated from hydrocarbon-polluted soil in Ogoniland, Nigeria. *Bioresources and Bioprocessing* 3. 10.1186/s40643-016-0118-4.

O.

Ohnishi, K., Yoshida, Y., & Sekiguchi, J. (1994). Lipase production of *Aspergillus oryzae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 77, 490–495.

Okafor, N. (2007) Biocatalysis: Immobilized enzymes and immobilized cells. *Modern Industrial Microbiology and Biotechnology*, p 398. ISBN978-1-57808-434-0 (HC).

Oliveira, F., Moreira, C., Salgado, J. M., Abrunhosa, L., Venâncio, A., & Belo, I. (2016). Olive pomace valorization by *Aspergillus* species: lipase production using solid-state fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96, 3583–3589.

Oliveros, J.C. (2007-2015) Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.

Ortellado, L. E., Lisowiec, L. A., Quiroga-Zingaretti, A. E., Villalba, L. L., Zapata, P. D., & Fonseca, M. I. (2020). Exploring novel *Penicillium* lipolytic activity from the Paranaense rainforest. *Environmental technology*, 42(27), 4372–4379. <https://doi.org/10.1080/09593330.2020.1759697>.

Ouedraogo, Jean-Paul & Tsang, Adrian. (2021). Production of Native and Recombinant Enzymes by Fungi for Industrial Applications. *Encyclopedia of Mycology*, Pag. 222-232 Doi: 10.1016/B978-0-12-819990-9.00046-9.

Ozatay, S. (2020). Recent Applications of Enzymes in Food Industry. *Journal of Current Research on Engineering, Science and Technology*, 6 (1), 17-30.

P.

Pandey, A., Soccol, C.R., & Mitchell, D. (2000). New developments in solid state fermentation: i-bioprocesses and products. *Process Biochemistry* 35, 1153–1169.

Paques, F.W. & Macedo, G.A. (2006) Plant lipases from latex: Properties and industrial applications. *Quimica Nova*. 29, 93–99

Park, S. Y., & Rew, J. S. (2015). Is Lipase Supplementation before a High Fat Meal Helpful to Patients with Functional Dyspepsia. *Gut and liver*, 9(4), 433–434. <https://doi.org/10.5009/gnl15206>.

Patel, N., Rai, D., Shivam, Shahane, S., & Mishra, U. (2019). Lipases: Sources, Production, Purification, and Applications. *Recent patents on biotechnology*, 13(1), 45–56. <https://doi.org/10.2174/1872208312666181029093333>

- Peberdy, J. F. (1994).** Protein secretion in filamentous fungi—trying to understand a highly productive black box. *Trends Biotechnology* 12, 50–57.
- Pereira, A. da S., de Souza, A. H., Fraga, J. L., Villeneuve, P., Torres, A. G., & Amaral, P. F. F. (2022).** Lipases as Effective Green Biocatalysts for Phytosterol Esters' Production: A Review. *Catalysts*, 12(1), 88. doi:10.3390/catal12010088.
- Perrone G. & Susca A. (2017)** *Penicillium* Species and Their Associated Mycotoxins. In: Moretti A., Susca A. (eds) *Mycotoxigenic Fungi. Methods in Molecular Biology*, vol 1542. *Humana Press*, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6707-0_5
- Peyravi, Farzad; Latif, Alimohammad; & Moshtaghioun, Seyed. (2019).** Protein Tertiary Structure Prediction using Hidden Markov Model based on Lattice. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*. 17. 10.1142/S0219720019500070.
- Pinheiro, T. D., Menoncin, S., Domingues, N. M., Oliveira, D. D., Treichel, H., Di Luccio, M., & Freire, D. M. (2008).** Production and partial characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* obtained by submerged fermentation of conventional and industrial media. *Journal of Food Science and Technology* 28, 444–450.
- Pitt J. I., & Hocking A. D. (1997).** *Fungi and Food Spoilage*. 2° ed. Blackie Academic & Professional, Londres.
- Pitt, J. I. (1980).** The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. London: Academic Press.
- Pollack S.J., Jacobs J.W., & Schultz P.G. (1986).** Selective chemical catalysis by an antibody. The first reports of antibody proteins that demonstrate catalytic activity. *Science* 234:1570–1573.
- Posso Mendoza H. et al. (2020)** Evaluación del extracto enzimático con actividad lipasa de *Yarrowia Lipolytica*. Una aplicación de minería de datos para el tratamiento de aguas residuales de la industria alimentaria. En: Yang CN., Peng SL., Jain L. (eds) *Seguridad con Computación Inteligente y Servicios de Big Data*. SICBS 2018. Avances en Computación y Sistemas Inteligentes, vol 895. *Springer Cham*. https://doi.org/10.1007/978-3-030-16946-6_24.
- Prieto, Maria; Etayo, Javier & Olariaga, Ibai. (2021).** A new lineage of mazaediate fungi in the *Eurotiomycetes: Cryptocaliciomycetidae* subclass. nov., based on the new species *Cryptocalicium blascoi* and the revision of the ascoma evolution. *Mycological Progress*. 20. 889-904. DOI: 10.1007/s11557-021-01710-y.

R.

- Rajeswari, J., Palaniswamy, M., Pinky Raphy, Padmapriya, B. (2011).** Utilization of mixed agro industrial by - products for alkaline lipase production from *Penicillium chrysogenum*. *International Journal of Pharmaceutical and Biological science Archive* 2, 682–691
- Ramadan, Mohamed Fawzy (2019),** Enzymes in Fruit Juice Processing. *Enzymes in Food Biotechnology. Elsevier Inc*, 45-59.
- Ramalho, R. S. (2021).** *Tratamiento de aguas residuales*. Reverté.

- Ramírez, C. (1982).** Manual and atlas of the Penicillia. Amsterdam: *Elsevier Biomedical Press*.
- Raper, K. B., & Thom, C. (1949).** A manual of the Penicillia. Baltimore: Williams & Wilkins co.
- Rastogi, Hita & Bhatia, Sugandha (2019).** Future Prospectives for Enzyme, Technologies in the Food Industry. *Enzymes in Food Biotechnology, Elsevier Inc*, 845-860.
- Ray, S. (2015).** Application of extracellular microbial lipase- a review. *International Journal of of Biotech Trends and Technology*. 5(1): 6-12.
- Rehm, F. B., Chen, S., & Rehm, B. H. (2016).** Enzyme Engineering for In Situ Immobilization. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(10), 1370. <https://doi.org/10.3390/molecules21101370>
- Ribeiro, B.D., Castro, A.M.D., Coelho M.A.Z., Freire D.M.G. (2011).** Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. *Enzyme Research* 1–16.
- Rifaat, H. M., El-Mahalawy, A. A., El-Menofy, H. A., & Donia, S. A. (2010).** Production, optimization and partial purification of lipase from *Fusarium oxysporum*. *Journal of Applied Sciences in Environmental Sanitation* 5, 39–53.
- Rigo, E., Ninow, J. L., Tsai, S. M., Durrer, A., Foltran, L. L., Remonato, D., & Di Luccio, M. (2012).** Preliminary characterization of novel extra-cellular lipase from *Penicillium 22 crustosum* under solid-state fermentation and its potential application for triglycerides hydrolysis. *Food and Bioprocess technology* 5 (5), 1592-1600.
- Ríos-Fránquez, F. J., Rojas-Rejón, O. A., & Escamilla-Alvarado, C. (2019).** Microbial Enzyme Applications in Bioethanol Producing Biorefineries: Overview. *Bioethanol Production from Food Crops. Elsevier Inc*, 249-266.
- Roberts, R.G., Morrison, W. H., Robertson, J. A., & Hanlin, R. T. (1987).** Extracellular lipase production by fungi from sunflower seed. *Mycologia* 79, 265–273.
- Robinson, P. K. (2015).** Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in biochemistry*, 59, 1–41. <https://doi.org/10.1042/bse0590001>.
- Rodriguez, J. A., Mateos, J. C., Nungaray, J., González, V., Bhagnagar, T., Roussos, S., Cordova, J., & Baratti, J. (2006).** Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. *Process Biochemistry* 41, 2264–2269.
- Romdhane, I. B. B., Fendri, A.; Gargouri, Y.; Gargouri, A.; & Belghith, H. (2010).** A novel thermoactive and alkaline lipase from *Talaromyces thermophilus* fungus for use in laundry detergents. *Biochemical Engineering Journal* 53(1): 112-120.
- Rowe, H. D. (2001).** Biotechnology in the textile/clothing industry: a review. *Journal of Consumer Studies and Home Economics* 23: 53-61.
- Roy Choudhury, A. K. (2020).** Introduction to enzymes. In *Sustainable Technologies for Fashion and Textiles. Elsevier Ltd*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-102867-4.00004-9>.

S.

- Saif, F. A.,** Yaseen, S. A., Alameen, A. S., Mane, S. B., & Undre, P. B. (2020). Identification of *Penicillium* species of fruits using morphology and spectroscopic methods. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1644, No. 1, p. 012019). IOP Publishing.
- Samson R. A.,** Houbraken J. A. M. P., Kuijpers A. F. A., Frank J. M., Frisvad J. C. (2004). New ochratoxin or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology* 50: 45-61
- Samson, R. A.;** Houbraken, J.; Thrane, U.; Frisvad, J. C.; & Andersen, B. (2019). *Food and indoor fungi*. Westerdijk Fungal Biodiversity Institute.
- Savitha, J.,** Srividya, S., Jagat, R., Payal, P., Priyanki, S., Rashmi, G. & Shantala, Y. (2007). Identification of potencial fungal strain(s) for the production of inducible, extracellular and alkalophilic lipase. *African Journal of Biotechnology* 6, 564-568.
- Schoch, C. L.,** Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A. *et al.*, & Fungal Barcoding Consortium. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241-6246.
- SecretomeP**, <http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/> [Consulta: marzo de 2022].
- Shafei, M. S., & Allam, R. F. (2010)** Production and immobilization of partially purified lipase from *Penicillium chrysogenum*. *Malaysian Journal of Microbiology* 6: 196-202.
- Shamim, S.;** Liaqat, U.; & Rehman, A. (2018). Microbial lipases and their application- a review. *Abasyn Journal of Life Sciences*, 1(2), 54–76.
- Sharma, R.,** Chisti, Y., & Banerjee, U.C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances* 19, 627–662.
- Sharma, Reetika;** Oberoi, Harinder; & Dhillon, Garry. (2016). Chapter 2: Fruit and Vegetable Processing Waste: renewable feeds stocks for feedstock for enzyme production. Dhillon GS, Kaur S, eds. San Diego: *Academic Press* pag 23-59. 10.1016/B978-0-12-802392-1.00002-2.
- Shu, C. H.,** Xu, C. J., & Lin, G. C. (2006). Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea*. *Process Biochemistry*. 3, 734–738.
- SignalP 6.0**, <https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP> [Consulta: marzo 2022].
- Silva, N.,** Vilela, C., Marrucho, I., Freire, C., Pascoal Neto, C., & Silvestre, A. (2014). Protein-based materials: from sources to innovative sustainable materials for biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(24), 3715. doi: 10.1039/c4tb00168k.
- Silva, T.,** Souza, L., Reis, N., Assis, S., Ferreira, M., Oliveira, J., Aguiar Oliveira, E., & Franco, M. (2019). Cultivation of *Penicillium roqueforti* in cocoa shell to produce and characterize its lipase extract. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 16(3), 745-756. Retrieved from <http://rmiq.org/ojs311/index.php/rmiq/article/view/731>.

- Singh A. K.** & Mukhopadhyay M. (2012). Overview of fungal lipase: a review. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 166, 486–520.
- Singh, R.,** Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, P. K. (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, 6(2), 174. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0485-8>.
- Sobrero, M. C.,** & Ronco, A. (2004). Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. *IDRC/IMTA*. Canadá, Capítulo 4, 71-79.
- Stollar, E.,** & Smith, D. (2020). Uncovering protein structure. *Essays in Biochemistry*, 64(4), 649-680. doi: 10.1042/ebc20190042.

T.

- Tao, Z.,** Dong, B., Teng, Z., & Zhao, Y. (2020). The classification of enzymes by deep learning. *IEEE Access*, 8, 89802–89811. <https://doi.org/10.1109/ACCESS.2020.2992468>
- Taylor, J. W.,** & Fisher, M. C. (2003). Fungal multilocus sequence typing - It's not just for bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 6(4), 351–356.
- Taylor, J. W.,** Jacobson, D. J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D. M., Hibbett, D. S., & Fisher, M. C. (2000). Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal genetics and biology*, 31(1), 21-32.
- Teng, Y.** & Xu, Y. (2008). Culture condition improvement for whole-cell lipase production in submerged fermentation by *Rhizopus chinensis* using statistical method. *Bioresource Technology* 99, 3900–3907.
- Thakur, S.** (2012). Lipases, its sources, properties and applications: A Review. *International Journal of Scientific and Engineering Research* 3(7): 1-29.
- Thom, C.** (1910). Cultural studies of *Penicillium* (Vol. 118, pp. 1–109). Washington: Government Printing Office: Bureau of Animal Industry, US Department of Agriculture.
- Thom, C.** (1930). The Penicillia. Baltimore: Williams & Wilkins, 1–644.
- Thom, C.,** & Church, M. B. (1926). The Aspergilli. Baltimore: Williams & Wilkins Co., 1–272.
- Toscano, L.,** Gochev, V., Montero, G., & Stoytcheva, M. (2011). Enhanced production of extracellular lipase by novel mutant strain of *Aspergillus niger*. *Biotechnology Biotechnological Equipment* 25, 2243–2247.
- Treichel, H.,** De Oliveira, D., Mazutti, M. A., Di Luccio, M., & Oliveira, J.V. (2010). A review on microbial lipases production. *Food and Bioprocess Technology* 3, 182–196.
- Tsuji, M.,** Yokota, Y., Shimohara, K., Kudoh, S., Hoshino, T. (2013). An application of wastewater treatment in a cold environment and stable lipase production of Antarctic basidiomycetous yeast *Mrakia blollopis*, *PLoS One* 8 (3).

U.

Ugo, A. K.; Vivian Amara, A. C. N, I.; & Kenechuwku, U. (2017). Microbial Lipases: A Prospect for Biotechnological Industrial Catalysis for Green Products: A Review. *Fermentation Technology*, 6(2). <https://doi.org/10.4172/2167-7972.1000144>

United States Environmental Protection Agency (1996). Ecological Effects Test Guidelines (OPPTS850.4200): Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test.

V.

Valero, F.; Ferreira-Dias, S.; Sandoval, G.; & Plou, F. (2013). The potential use of lipases in the production of fatty acid derivatives for the food and nutraceutical industries. *Electronic Journal of Biotechnology* 16(3): 1-39.

Villeneuve, P. (2003). Plant lipases and their applications in oils and fats modification. *European Journal of Lipid Science and Technology* 105, 308–317.

Vinuesa, P. (2010). Multilocus sequence analysis and bacterial species phylogeny estimation. In A. Oren & P. Thane (Eds.), *Molecular Phylogeny of Microorganisms* (First, p. 219). Norfolk, U.K.: Caister Academic Press.

Visagie, C. M., Houbraeken, J., Frisvad, J. C., Hong, S. B., Klaassen, C. H., Perrone, G., Seifert, K. A., Varga, J., Yaguchi, T., & Samson, R. A. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in mycology* 78, 343–371. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.001>

Vishnoi, Neha; Dixit, Sonal; & Mishra, Jitendra. (2020). Microbial Lipases and Their Versatile Applications. In: Arora, N., Mishra, J., Mishra, V. (eds) *Microbial Enzymes: Roles and Applications in Industries. Microorganisms for Sustainability*, vol 11. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1710-5_8.

W.

Wang, D., Xu, Y., & Shan, T. (2008). Effects of oils and oil-related substrates on the synthetic activity of membrane-bound lipase from *Rhizopus chinensis* and optimization of the lipase fermentation media. *Biochemical Engineering Journal* 41, 30–37.

Westling, R. (1911). Über die Grünen Spezies der Gattung *Penicillium*. *Arkiv för Botanik*, 11, 1–156.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., Taylor, J., Innis, M. A., Gelfand, D. H., & Sninsky, J. J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. *Academic Press*, San Diego, 315-322.

Widmann, M., Juhl, P. B., & Pleiss, J. (2010). Structural classification by the Lipase Engineering Database: a case study of *Candida antarctica* lipase A. *BMC genomics* 11, 123. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-123>.

Y.

- Yaacob, N.;** Mohamad, Ali, M. S.; Salleh, A. B.; Rahman, R. N. Z. R. A.; & Leow, A. T. C. (2016). Toluene promotes lid 2 interfacial activation of cold active solvent tolerant lipase from *Pseudomonas fluorescens* strain AMS8. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 68, 224–235. <https://doi.org/10.1016/j.jmglm.2016.07.003>.
- Yadav, R. P.;** Saxena, R. K., Gupta, R., & Davidson, S. (1998). Lipase production by *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Folia microbiologica* 43(4), 373-378.
- Yang, F.;** Weber, T. W.; Gainer, J. L.; & Carta, G. (1997). Synthesis of lovastatin with immobilized *Candida rugosa* lipase in organic solvents: Effects of reaction conditions on initial rates. *Biotechnology and Bioengineering* 56(6): 671-680.
- Yong, S. K.;** Lim, B. H., Saleh, S., & Tey, L. H. (2016). Optimisation, purification and characterisation of extracellular lipase from *Botryococcus sudeticus* (UTEX 2629). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 126, 99–105.
- Young, B.J.;** Riera, N.I., Beily, M.E., Bres, P.A., Crespo, D.C., Ronco, A.E. (2012). Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 76 (2):182-6. doi: 10.1016/j.ecoenv.2011.09.019.

Z.

- Zini, P. L. (2013).** Aislamiento e identificación de cepas nativas de *Aspergillus* y *Penicillium* con capacidad de secretar enzimas celulolíticas. Universidad Nacional de Misiones, Argentina.
- Zorn, K.;** Guinea, I. O.; Brundiek, H.; & Bornscheuer, U. T. (2016). Engineering and application of enzymes for lipid modification, an update. *Progress in Lipid Research* 63: 153-164.

PROYECTOS CIENTÍFICO-TECNOLÓGICOS DENTRO DE LOS CUALES SE DESARROLLÓ LA TESIS DOCTORAL

Investigadora del proyecto “**Tratamiento de efluentes que contienen contaminantes orgánicos persistentes (COPS) utilizando enzimas fúngicas inmovilizadas sobre nanopartículas magnéticas y nanofibras de celulosa**”. Director: Zapata Pedro Dario. PICT-2020- SERIE A-03105 Monto \$ 6319710.00. Área científicas consolidadas. Periodo 2022-2025. Res. N° 003/2022.

Investigadora del proyecto “**Bioadsorción y micorremediación como estrategias combinadas para el tratamiento de efluentes de la industria citrícola**”. Tipo de proyecto: PICT TIPO D Grupos de reciente formación. Temas abiertos. Res.310-18-PICT-2017- 1697. Período: 2018-2021. Directora: Fonseca Maria Isabel. Monto \$ 465000.00. Acreditado como PDTS en UNaM Resolución HCD N° 388-19.

Investigadora del Proyecto de Investigación Incentivado “**Cambios transcriptómicos y proteómicos durante la degradación de bifenilpoliclorados por *Pleurotus sajor caju* LBM 105 nativo de Misiones (Argentina)**” (Resolución CD N° 601/18).Directora: Fonseca María Isabel. Código: 16Q660 PI Periodo 2018-2019.

Investigadora del Proyecto “**Inmovilización de lipasas producidas por *Penicillium Sp.* autóctono de Misiones. Potencial aplicación biotecnológica en la producción de ésteres**”. Directora: Rodriguez María Daniela. Tipo de Proyecto: PICT-2016- 4075. Monto: \$ 178500.00. Temas Abiertos. Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), a través del Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCyT) Res. 285/17.

TRABAJOS PUBLICADOS

Ortellado L E, Villalba L L, Zapata P D, Fonseca M I. **Chapter 18: Mycoremediation method with fungal lipases in wastewater**. Mycoremediation Protocols. (2021). Springer Protocols Handbooks. ISBN 978-1-0716-2005-2.

Sadañoski M, Ortellado LE, Fonseca MI, Benítez SF, Zapata PD. **Chapter 14: Two Dimensional Gel Electrophoresis: Discovering Isoenzymes for Mycoremediation**. Mycoremediation Protocols. (2021). ISBN 978-1-0716-2005-2.

Laura E. ORTELLADO, Leandro A. LISOWIEC, Adriana E. QUIROGA ZINGARETTI, Laura L. VILLALBA, Pedro D. ZAPATA and María I. FONSECA (2020). **Exploring novel *Penicillium* lipolytic activity from the Paranaense rainforest. Environmental Technology**. DOI: 10.1080/09593330.2020.1759697 ISSN: 0959-3330 (Print) 1479-487X (Online).

Ortellado, Laura E.; Fonseca, María L.; Barchuk, Mónica L.; Sawostjanik Afanasiuk, Silvana S.; Villalba, Laura L.; Zapata, Pedro D. (2016). “**Efecto de iones metálicos y compuestos aromáticos sobre la actividad Lacasa en Trametes sp. Nativo de Misiones**”. Revista de Ciencia y Tecnología N°26 pag. 4-10 ISSN: 1851-7587.

PRESENTACIONES A CONGRESOS

ORTELLADO LE., VILLALBA LL. ZAPATA PD, FONSECA MI. **Producción de lipasas de *Penicillium rubens* LBM 081**. 6° Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos SAPROBIO 2021. ISBN 978-950-766-183-9.

ORTELLADO, Laura E; LISOWIEC, Leandro; FONSECA, María I; ZAPATA, Pedro D. **Influencia de diferentes fuentes de carbono sobre la actividad lipasa de *Penicillium rubens***. II Jornada Internacional de Biotecnología para el desarrollo sostenible. 2019.

ORTELLADO, Laura E; LISOWIEC, Leandro; FONSECA, María I; ZAPATA, Pedro D. **Identificación de una cepa fúngica del género *Penicillium* nativa de la Provincia de Misiones productora de actividad lipasa**. XV Congreso Argentino de Microbiología - CAM 2019. V Congreso Argentino de Microbiología de Alimentos - V CAMA. V Congreso Latinoamericano de Microbiología de Medicamentos y Cosméticos - CLAMME 2019. ISBN 978-987-46701-5-1 pag 523.

ORTELLADO Laura Ester; FONSECA María Isabel; VILLALBA Laura Lidia; ZAPATA Pedro Darío. **Empleo de Rodamina B para la determinación de lipasas en aislamientos fúngicos del Género *Penicillium* nativos de Misiones**. Jornadas Científico Tecnológicas realizadas en el marco del 45° Aniversario de la Universidad Nacional de Misiones. 2018. ISBN 978-950-579-495-9.

ORTELLADO Laura Ester; FONSECA María Isabel; VILLALBA Laura Lidia; ZAPATA Pedro Darío. **Evaluación y selección de cepas fúngicas del género *Aspergillus* y *Penicillium* nativas de la Provincia de Misiones secretoras de lipasas**. IX Jornadas Científico-Tecnológicas de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones. 2015. IBSN 978-950-766-112-9.

**Formulario de autorización de depósito de tesis/trabajo final integrador en la
 Comunidad _____ del RIDUNaM
 (Repositorio Institucional Digital de la UNaM)**

Por intermedio de la presente, el abajo firmante, AUTOR de la Tesis/TFI (Trabajo Final Integrador) titulada/o

Aplicación de Lipasas de Penicillium sp. en la Biodegradación de Aguas residuales ricas en lípidos.

Da FE de la autoría y originalidad de la obra mencionada, que fue dirigida por

Dra. Fonseca María Isabel

Dr Zapata Pedro Dario

presentada y defendida en la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones (FCEQyN-UNaM), el 28.10.7.2022, Acta N° 40, con el fin de obtener el título de

Tildar según corresponda

- Tesis de Posgrado
 Doctorado Maestría Trabajo Final Integrador
 Otra

Derechos patrimoniales

Como autor, expreso mi conformidad en cuanto a la cesión gratuita de los derechos de reproducción y circulación de esta obra, en forma NO EXCLUSIVA, a la FXX-UNaM. Dicha reproducción y circulación se podrá realizar, una o varias veces, en cualquier soporte, para todo el mundo, con fines sociales, educativos y científicos.




En virtud del carácter no exclusivo de esta cesión, el autor podrá reproducir y comunicar libremente la tesis o trabajo final integrador, a través de los medios que estime oportunos.


Condiciones de acceso en línea

- Autorizo el depósito de la tesis o trabajo final integrador en forma inmediata
 Autorizo el depósito del documento con embargo por el plazo de _____ meses a partir de la defensa de la misma.

Condiciones de uso de la tesis/TFI

Será puesta a disposición pública bajo las siguientes condiciones de uso:

	(BY) Atribución — Debe reconocer los créditos de la obra de la manera especificada por el autor o el licenciante (pero no de una manera que sugiera que tiene su apoyo o que apoyan el uso que hace de su obra).
	(NC) No Comercial — No puede utilizar esta obra para fines comerciales.
	(SA) Permite trabajos derivados — Siempre que se mantenga la misma licencia.

 <p>BY NC SA</p>	<p>Reconocimiento – NoComercial – CompartirIgual (by-nc-sa): No se permite un uso comercial de la obra original ni de las posibles obras derivadas, la distribución de las cuales se debe hacer con una licencia igual a la que regula la obra original.</p>
---	--

Referencias:
 CC (Licencias Creative Commons).
 BY (Atribución).
 NC (No comercial).
 SA (Compartir igual).

Dados personales (llenar un cuadro por cada autor)

Apellido y Nombres	Ortellido Laura Ester
Teléfono/Celular	03764652379
Correo electrónico	ortellido.lauraester@gmail.com

Apellido y Nombres	
Teléfono/Celular	
Correo electrónico	

Apellido y Nombres	
Teléfono/Celular	
Correo electrónico	

Se firma la presente en la Ciudad de Posadas a los... 28 días del mes de... Julio de... 2022 ..-

 <hr style="border: 0; border-top: 1px solid black;"/>	<u>Ortellido Laura Ester</u> <hr style="border: 0; border-top: 1px solid black;"/>	<u>32329293</u> <hr style="border: 0; border-top: 1px solid black;"/>
<hr style="border: 0; border-top: 1px solid black;"/>	<hr style="border: 0; border-top: 1px solid black;"/>	<hr style="border: 0; border-top: 1px solid black;"/>
<hr style="border: 0; border-top: 1px solid black;"/>	<hr style="border: 0; border-top: 1px solid black;"/>	<hr style="border: 0; border-top: 1px solid black;"/>