UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

LICENCIATURA EN INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

TESIS DE LICENCIATURA

Análisis estructura-función de enzimas lignocelulolíticas producidas por hongos filamentosos

Para obtener el grado de
Licenciado(a) en Ingeniería en Biotecnología

PRESENTA

Sofia Tamara Gutierrez Trejo

Director (a)
Dra. Silvia Armenta Jaime

Codirector (a)
Dr. Oscar Arce Cervantes

Asesores
Dr. Armando Peláez Acero
Dr. Sergio Soto Pimentel

Santiago Tulantepec de Lugo Guerrero, Hgo., México. 02 de Junio de 2025

Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
Instituto de Ciencias Agropecuarias
Institute of Agricultural Sciences

Santiago Tulantepec de Lugo Guerrero, Hidalgo., a 11 de Abril de 2025
Numero de Control: IBT-001-2025
Asunto: Autorización de impresión

Mtra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado
Directora de Administración Escolar de la UAEH

Por este conducto y con fundamento en el Título Cuarto, Capítulo I, Artículo 40 del Reglamento de Titulación, le comunico que el jurado que le fue asignado al pasante de Licenciatura en Ingeniería en Biotecnología, **Sofia Tamara Gutierrez Trejo**, quien presenta el trabajo de Tesis denominado **"Análisis estructura-función de enzimas lignocelulolíticas producidas por hongos filamentosos"**, que después de revisarlo en reunión de sinodales, ha decidido autorizar la impresión de este, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación, se anotan las firmas de conformidad de los miembros del jurado:

PRESIDENTE	Dr. Armando Peláez Acero
SECRETARIO	Dr. Oscar Arce Cervantes
VOCAL 1	Dr. Sergio Soto Simental
VOCAL 2	Dra. Silvia Armenta Jaime

Sin otro particular por el momento, me despido de usted.

Atentamente
"Amor, Orden y Progreso"

Dr. Paul Misael Garza López
Coordinador del Ingeniería en Biotecnología

Dr. Armando Peláez Acero
Director del Instituto de Ciencias Agropecuarias

Avenida Universidad #133, Col. San Miguel Huatengo. C.P. 43775. Santiago Tulantepec de Lugo Guerrero, Hidalgo. México.
Teléfono: 7717172000 Ext. 42000
pelaeza@uaeh.edu.mx

Agradecimientos

A mi directora, la Dra. Silvia Armenta Jaime, por guiarme en el largo camino de la elaboración de esta tesis, por compartir su conocimiento conmigo y apoyarme no solo académicamente, tambien moralmente. Por darme la oportunidad y aceptarme como su tesista.

A mi familia, por creer en mí y apoyarme a lo largo de mi formación académica. A mi papá, por brindarme la oportunidad de crecer lejos de casa y aun así nunca dejarme sola. A mi mamá, por sus bendiciones y cariño inmensurable que me acompañó siempre. A mi hermana, por ser el mejor ejemplo a seguir y siempre estar para mí.

A Belén, por su amistad y por ahora compartir recuerdos como compañeras de cuarto, de salón y de laboratorio, por ser mi primera amiga y hacer más amena y memorable mi universidad.

A Tomas, por todas las veces que me acompañó hasta tarde mientras escribía esta tesis. Su esencia, compañía y amor quedarán por siempre entre estas letras.

Dedicatoria

A Ricardo

Por su amor, comprensión y apoyo incondicional durante este proceso, por ser mi fuente de inspiración y motivación. Por siempre impulsarme a soñar, crear y cumplir todo lo que haga feliz a mi corazón.

A mi abuelo

Quien espero este orgulloso de que su apellido se escriba después de un “Ingeniera”.

Índice

Índice **5**
Resumen **7**
Introducción **8**
Marco Teórico **9**
Lignocelulosa: componentes estructurales 10
Basidiomicetos, productores de enzimáticas lignocelulolíticas 11
Pleurotus ostreatus 12
Hericium erinaceus 13
Enzimas lignocelulolíticas producidas por hongos filamentosos: tipos y características estructurales 14
Celulasas 15
Xilanasas 18
Lacasas 19
Aplicaciones generales de las enzimas lignocelulolíticas en la industria biotecnológica **21**
Antecedentes **23**
Pregunta de Investigación **26**
Hipótesis **26**
Objetivos **26**
General 26
Específicos 26
Materiales y Métodos **27**
Análisis *In Silico* de secuencias de enzimas putativas de *H. erinaceus* y *P. ostreatus*. 27
Formulación de sustratos utilizados para el crecimiento de *H. erinaceus* y *P. ostreatus.* 28
Obtención del Extracto Crudo Enzimático 29
Cuantificación de proteína soluble 29
Determinación de la actividad enzimática de celulasas, xilanasas y lacasas. 31
Resultados **32**
Análisis *In Silico* de secuencia primaria y secundaria de enzimas lignocelulolíticas de *H. erinaceus* y *P. ostreatus*. 32
Determinación de la actividad enzimática de celulasas, xilanasas y lacasas a partir de sustrato agotado de los basidiomicetos *P. ostreatus* y *H. erinaceus* 58
Actividad enzimática de enzimas lignocelulolíticas en *H. erinaceus* y *P. ostreatus*. 58
Discusión **64**
Conclusiones **68**
Perspectivas **69**
Referencias **70**

Anexo 1..... **78**
Anexo 2..... **80**

Resumen

La degradación de biomasa lignocelulósica mediante enzimas producidas por hongos filamentosos representa una alternativa sostenible para aplicaciones biotecnológicas, como la producción de biocombustibles y el aprovechamiento de residuos agrícolas. Hongos como *Hericium erinaceus* y *Pleurotus ostreatus* destacan por su capacidad para secretar enzimas lignocelulolíticas, incluyendo celulasas, xilanasas y lacasas, que actúan sinérgicamente en la despolimerización de componentes vegetales complejos. Sin embargo, la eficiencia de estos sistemas enzimáticos varía según la especie fúngica, las condiciones de cultivo y los mecanismos de regulación metabólica.

Aunque estudios previos han caracterizado parcialmente estas enzimas, persisten vacíos en la comprensión de su diversidad estructural, su actividad catalítica en diferentes etapas de crecimiento y su optimización para procesos industriales. En este contexto, la combinación de herramientas bioinformáticas (*in silico*) y enfoques experimentales permite una exploración integral de sus propiedades. Por lo que en este trabajo se realizó un análisis estructural y funcional de enzimas lignocelulolíticas producidas por hongos filamentosos a través de un análisis *in silico* y la determinación de actividades catalíticas de celulasas, xilanasas y lacasas a partir del extracto crudo enzimático obtenido de sustratos agotados. Los resultados obtenidos aportan información sobre el potencial de *H. erinaceus* y *P. ostreatus* en la valorización de biomasa, sentando bases para futuros estudios orientados a optimizar su producción enzimática.

Introducción

La degradación de la lignocelulosa, principal componente de la biomasa vegetal es un proceso complejo que requiere la acción coordinada de enzimas especializadas. Los basidiomicetos, son reconocidos por su especial capacidad para producir enzimas lignocelulolíticas, las cuales cuentan con diversas aplicaciones prometedoras en la industria biotecnológica.

Las enzimas más importantes que producen los hongos filamentosos son; las celulasas, incluyendo a las endo- y exoglucanasas y beta-glucosidasas, que degradan la celulosa, las hemicelulasas, incluyendo las xilanasas, manasas y arabinofuranosidasas, que degradan la hemicelulosa y las ligninasas, incluyendo a las lacasas y peroxidasas, que oxidan la lignina.

Sin embargo, la comprensión de la diversidad y características estructurales de estas enzimas es aún limitada, especialmente de aquellas que son producidas por hongos filamentosos de los que no se conoce su genoma. Además, no se conoce cómo los hongos filamentosos coordinan la expresión de estos grupos enzimáticos para maximizar la degradación, es decir, no se conocen los mecanismos que regulan la producción secuencial o simultánea de diferentes enzimas dependiendo de la composición del sustrato.

Por lo tanto, en este estudio se analizó la diversidad y características estructurales de enzimas lignocelulolíticas producidas por dos hongos filamentosos, *Pleurotus ostreatus* y *Hericeum erinaceus* mediante análisis *in silico*, así como la determinación de actividad catalítica de enzimas celulasas, hemicelulasas como las xilanasas y ligninasas como las lacasas a partir de extractos enzimáticos obtenidos de sustrato agotado aportando conocimiento para futuros estudios sobre mecanismos de regulación en la producción de enzimas lignocelulolíticas y el diseño de nuevas proteínas.

Marco Teórico

El interés científico por los hongos y su importancia biotecnológica es profundo ya que, al ser organismos heterótrofos, han desarrollado estrategias de supervivencia y dispersión efectivas y múltiples convirtiéndose en un grupo megadiverso cuya distribución se extiende en prácticamente todos los ecosistemas de nuestro planeta (Heredia-Abarca, 2020). México es considerado el cuarto país con mayor diversidad, y de manera análoga, la diversidad de hongos no es una excepción, pues México alberga alrededor de 200,000 especies, de las cuales solo se conoce el 5% (Aguirre-Acosta et al., 2014).

Actualmente, son los organismos de mayor distribución en la naturaleza, y son considerados los principales degradadores de materia orgánica de nuestro planeta. Poseen gran capacidad de adaptación, por lo que sobreviven y se reproducen en diferentes sustratos, temperaturas y condiciones atmosféricas (Funes, 2019). Convirtiéndose en un grupo tan vasto que existe una gran cantidad de hongos no reportados, cuyas funciones son de interés para múltiples aplicaciones biotecnológicas, y de los cuales aún se desconocen las propiedades estructurales de aquellas enzimas que son capaces de producir.

Los hongos son reconocidos por ser una prometedora fuente de nuevas enzimas, ya que se ha reportado que son grandes productores de enzimas lignocelulolíticas (Deepalakshmi & Mirunalini, 2014). Sin embargo, son los basidiomicetos los que cuentan con mayor número de registros con presencia de estas enzimas. Los basidiomicetos exhiben una gran degradabilidad en sus entornos naturales, alimentándose en gran medida de materiales muertos, por lo que se los considera hongos saprofitos (Bentil, 2021). Además, son capaces de expresar diversas enzimas que degradan la lignocelulosa, por lo que son utilizados con frecuencia en diversas áreas de la biotecnología (Sergentani et al., 2016).

Lignocelulosa: componentes estructurales

La lignocelulosa es el mayor componente de la biomasa, puede ser biológicamente convertida a biocombustibles y otros bio-compuestos a través de numerosos microorganismos como bacterias y hongos. Generalmente, las grandes cantidades de biomasa se consideran "residuos", sin embargo, pueden ser potencialmente convertidos en diferentes productos de valor agregado, existiendo grandes posibilidades para su uso en la biotecnología incluyendo biocombustibles, biomateriales y fuentes de carbono para fermentación (Lange, 2007).

Como se muestra en la **Figura 1**, el componente principal de la lignocelulosa es la celulosa presente en un porcentaje del 35-50%, el cual es un polímero lineal compuesto por unidades de D-glucosa unidas por enlaces 1,4- β-glucosídicos. Le sigue la hemicelulosa en un porcentaje de 20-35%, el cual es un polímero heterogéneo de pentosas (xilosa, arabinosa), hexosas (manosa, glucosa, galactosa) y azúcares ácidos (Figura 1, 3A). Finalmente la lignina comprende el 10-25% de la lignocelulosa, el cual es un polímero fenólico de diversa composición (Figura 1, 2A) (Saha & Hayashi, 2004).

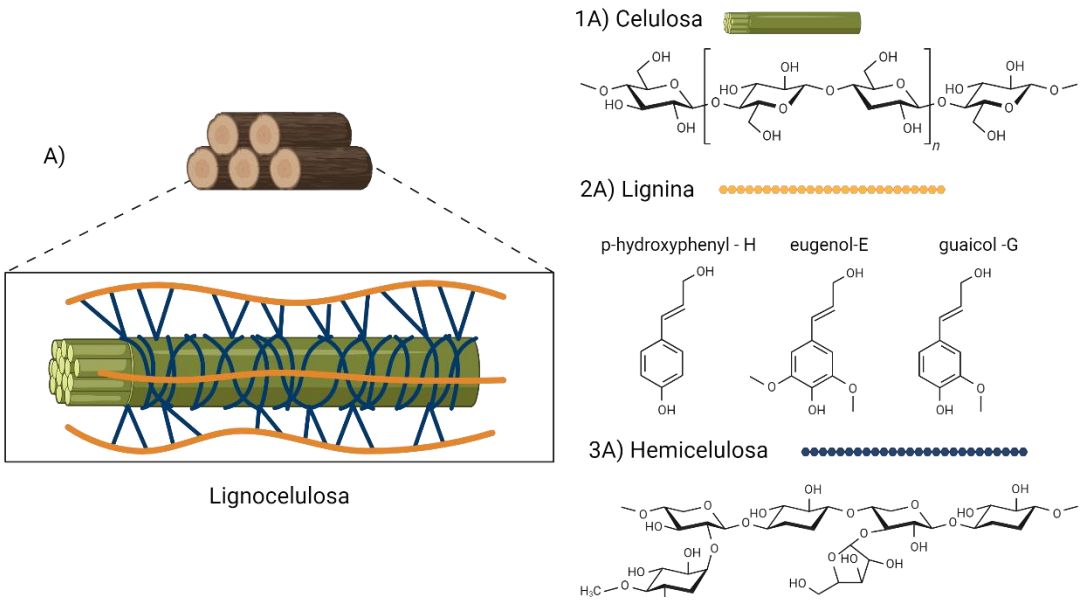


Figura 1. Composición de la lignocelulosa. 1A) Estructura de la celulosa; compuesta por unidades de D-glucosa unidas por enlaces 1,4- β-glucosídicos. 2A) Estructura de la lignina: con composición fenólica diversa 3A)

Estructura de la hemicelulosa; compuesta por pentosas (xilosa, arabinosa), hexosas (manosa, glucosa, galactosa) y azúcares ácidos. Creada con Biorender (www.biorender.com).

Es debido a la combinación de la acción protectora de la lignina, la acción cementante de la hemicelulosa y la estructura cristalina de la celulosa, que la lignocelulosa es recalcitrante a la degradación por microorganismos y acción enzimática de las enzimas que producen. Sin embargo, los hongos juegan un papel importante al secretar una gran cantidad de enzimas degradadoras de lignocelulosa (Alfaro Sánchez, 2017)

Basidiomicetos, productores de enzimáticas lignocelulolíticas

Actualmente los hongos se clasifican en cinco divisiones: 1) Quitridiomicetes (división Chytridiomycota), en la que se incluye a todos aquellos hongos microscópicos, con zoosporas o gametos flagelados. 2) Zigomicetos (división Zygomycota), en donde se encuentran los comúnmente conocidos mohos. 3) Glomeromicetes (división Glomeromycota), los hongos pertenecientes a este grupo generalmente forman micorrizas estableciendo una relación interespecífica de simbiosis con plantas. 4) Ascomicetes (división Ascomycota), con ascosporas dentro de las estructuras reproductoras denominadas ascas. 5) Basidiomicetes (división Basidiomycota) hongos con basidiósporas, con cuerpo fructífero en forma de seta y una especial habilidad para descomponer materia orgánica, siendo esta característica la principal fuente de clasificación (Schwarze, 2007).

Según Alfaro Sánchez (2017) los basidiomicetos son clasificados según su proceso de descomposición de la lignina. Los de pudrición blanca atacan a la lignina mediante el uso de enzimas oxidativas clasificadas como manganeso peroxidasas, versátil peroxidasa, lignina peroxidasas y fenol oxidasas.

Sin embargo, no todos los basidiomicetos de pudrición blanca contienen todas estas enzimas, por ejemplo *Phanerochaete chrysosporium* no produce lacasas, mientras que

Pleurotus ostreatus no produce lignina peroxidasas (Alfaro Sánchez, 2017) Además, los registros actuales no informan sobre cómo es que los basidiomicetos producen estos complejos enzimáticos, y si estos se expresan en función de los sustratos donde crecen y desarrollan. Hasta el momento se sabe que uno de los basidiomicetos más importantes es el género de *Pleurotus sp.,* (Peláez-Acero et al., 2011; Deepalakshmi & Mirunalini, 2014), no obstante, otros hongos basidiomicetos han sido poco explorados, como lo es el caso de *Peniophora albobadia*, *Subulicystidium perlongisporum* y *Hericium sp*.

Pleurotus ostreatus

Pleurotus ostreatus (Figura 2) es un hongo filamentoso comúnmente conocido como "hongo ostra". Es el segundo hongo comestible a nivel mundial y un hongo modelo para aplicaciones de deslignificación, con la ventaja de crecer en materias primas leñosas y no leñosas, (Fernández-Fueyo et al., 2016).

Reino :	Fungi
Filum :	Basidiomycota
Clase :	Agaricomycetes
Orden :	Agaricales
Familia :	Pleurotaceae
Genero :	*Pleurotus*
Especie :	*P. ostreatus*

Figura 2. Cuerpo fructífero y clasificación científica del hongo *Pleurotus ostreatus.* Obtenido de: (De Vega Luttmann, 2021)

En la mayoría de los estudios al utilizar a *P. ostreatus*, el interés es obtener una alta producción de setas comestibles, siendo este tipo de experimentos ordinarios en el género, no obstante también hay investigaciones que utilizan los sustratos biodegradados con diferentes

fines, que van desde la biodegradación de compuestos recalcitrantes y xenobióticos, hasta la obtención de alimento animal, biorremediación de suelos, obtención de fertilizantes y otros, por ello es importante conocer el grado de biodegradación ocurrida (Bermúdez-Savón et al., 2022).

Pleurotus spp. es capaz de utilizar diversos desechos agroindustriales como sustrato y fuente de energía, degradando la lignina de las paredes celulares a carbohidratos más simples durante la colonización del sustrato por el hongo (Bermúdez-Savón et al., 2022). Además, *Pleurotus sp*. lleva a cabo el proceso de degradación de la lignocelulosa mediante dos tipos de sistemas enzimáticos extracelulares que le permiten degradar selectivamente lignina, hidrolizar celulosa, e incrementar la digestibilidad de los sustratos (Cárdenas, 2012). El primero es el sistema de hidrólisis, que produce hidrolasas que son responsables de la degradación de polisacáridos, y el segundo un sistema ligninolítico oxidativo único, que degrada lignina y abre los anillos de fenilo. El sistema enzimático ligninolítico es poco específico, ya que las peroxidasas y oxidasas actúan al azar sobre la molécula de lignina, generando radicales libres que son inestables y tienden a polimerizarse (Sánchez, 2009).

Hericium erinaceus

Hericium erinaceus (Figura 3) es un hongo filamentoso comúnmente conocido como "Melena de león". Considerado un hongo comestible y de sabor agradable, con distribución por China, Europa, Japón y Norteamérica. Al igual que *P. ostreatus*, es un hongo saprotrófico, que crece en árboles en proceso de descomposición.

Reino: Fungi
Filum: Basidiomycota
Clase: Agaricomycetes
Orden: Agaricales
Familia: Hericiaceae
Genero: *Hericium*
Especie: *H. erinaceus*

Figura 3. Cuerpo fructífero y clasificación científica de *Hericium erinaceus.* Obtenido de: (De Vega Luttmann, 2021).

H. erinaceus ha destacado por su uso medicinal en la medicina tradicional China durante siglos, en el que el extracto se utiliza en la prevención y el tratamiento de algunas enfermedades. Sin embargo, es su habilidad de crecer en materia orgánica lo que ha llamado la atención para su uso en estudios de evaluación enzimática lignocelulolítica.

Enzimas lignocelulolíticas producidas por hongos filamentosos: tipos y características estructurales

Las enzimas lignocelulolíticas constituyen un grupo de enzimas capaces de degradar eficientemente la biomasa lignocelulósica a unidades monoméricas. La expresión de estas enzimas en hongos filamentosos está estrechamente regulada por el tipo de sustrato disponible, ya que es necesario ajustar la producción enzimática para optimizar la degradación de sus componentes. Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos moleculares que regulan la expresión de estos complejos enzimáticos. Hasta el momento, este proceso involucra la interacción intrínseca de diversas enzimas siendo las más importantes las celulasas, xilanasas y lacasas (Benatti & Polizeli, 2023).

Celulasas

Las celulasas son glicosil-hidrolasas (E. C. 3. 2. 1. 4) que catalizan la hidrolisis en los enlaces β-1,4-glucosídicos de la celulosa. Se componen de tres partes: el dominio de unión y el dominio catalítico, unidos por una cadena de aminoácidos conocida como bisagra (Figura 4A). El dominio estructural de las celulasas permite que se adhiera a la superficie del sustrato, y la cantidad de adsorción afectará directamente la eficiencia de la hidrólisis de la celulasa (Ejaz et al., 2021).

La degradación de la celulosa requiere de un grupo de enzimas que incluye: endoglucanasas, celobiohidrolasas y β-glucosidasas (Figura 4B), las cuales actúan de forma secuencial y sinergista (Sánchez-Ramírez et al., 2014). La endoglucanasa rompe aleatoriamente el enlace β-1,4-glicosídico en la región interna no cristalina de la cadena de polisacárido de celulosa, lo que da como resultado nuevos extremos. Posteriormente, las celobiohidrolasas actúan sobre los extremos reductores y no reductores para producir celobiosa, después de lo cual, las β – glucosidasas hidrolizan la celobiosa a glucosa (Ejaz et al., 2021).

- Endoglucanasas

Las endoglucanasas pertenecen a las familias de las glucósido hidrolasas 5 y 6, de acuerdo a la base de datos CAZy (Carbohydrate-Active enZYmes; Drula et al., 2022). Las endoglucanasas fúngicas, contienen un dominio catalítico con o sin dominio de unión a carbohidratos, mediante el cual hidrolizan los enlaces β-1,4-glicosídicos de manera aleatoria dentro de la cadena de celulosa. Permanecen adheridas al sustrato y se deslizan a lo largo de la cadena para que ocurra la siguiente escisión. Si bien comúnmente hidrolizan las regiones amorfas de la celulosa, hay reportes que indican la acción procesiva de estas enzimas para hidrolizar la celulosa cristalina y generar productos finales (Panchapakesan, 2016).

- Celobiohidrolasas

Las celobiohidrolasas fúngicas pertenecen a la familia GH 6 y 7, que actúan de forma progresiva degradando la extremos reductores y no reductores de la cadena de polisacárido de celulosa para liberar celobiosa como producto principal, que se actúa sobre la β-glucosidasa (Panchapakesan, 2016).

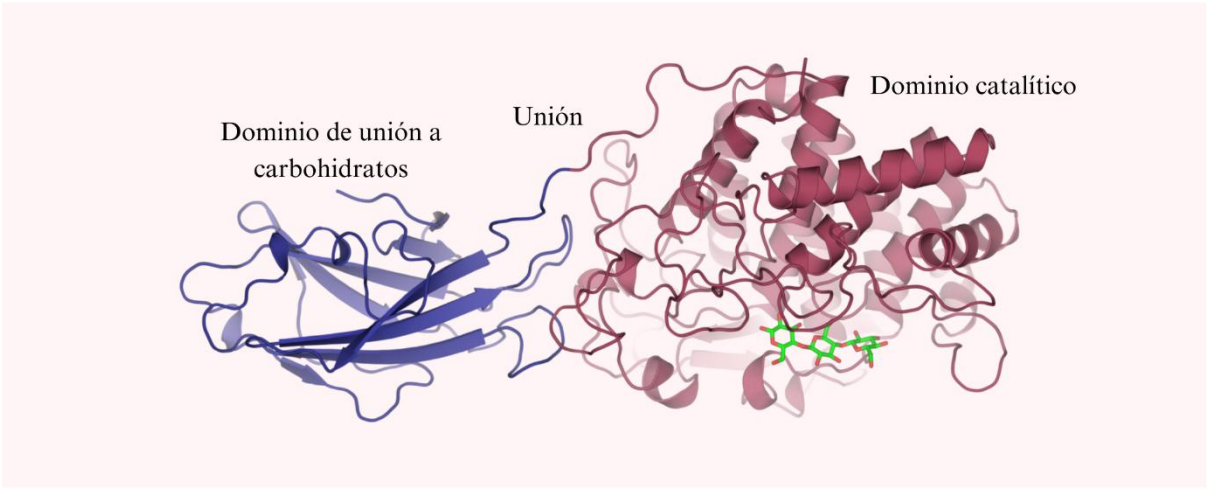
Las celobiohidrolasas y endocelulasas constan de un péptido señal que media la secreción, una región bisagra rica en residuos de Pro, Thr y Ser, un dominio de unión a celulosa y un dominio catalítico (Ejaz et al., 2021).

- β – Glucosidasas

Las β-glucosidasas son, por tanto, cruciales para la descomposición eficiente de la celulosa, ya que completan la sacarificación por hidrólisis de celobiosa y pequeños celo-oligosacáridos en moléculas de glucosa. Según la homología de secuencia de aminoácidos y la similitud estructural, las β -glucosidasas fúngicas se agrupan en dos familias de glucósidos hidrolasas, las pertenecientes a la familia 1 (GHF1) y las pertenecientes a la familia 3 (GHF3), según la base de datos CAZy (Carbohydrate-Active enZYmes) (Drula et al., 2022; Panchapakesan, 2016).

Celulasas

A)



B)

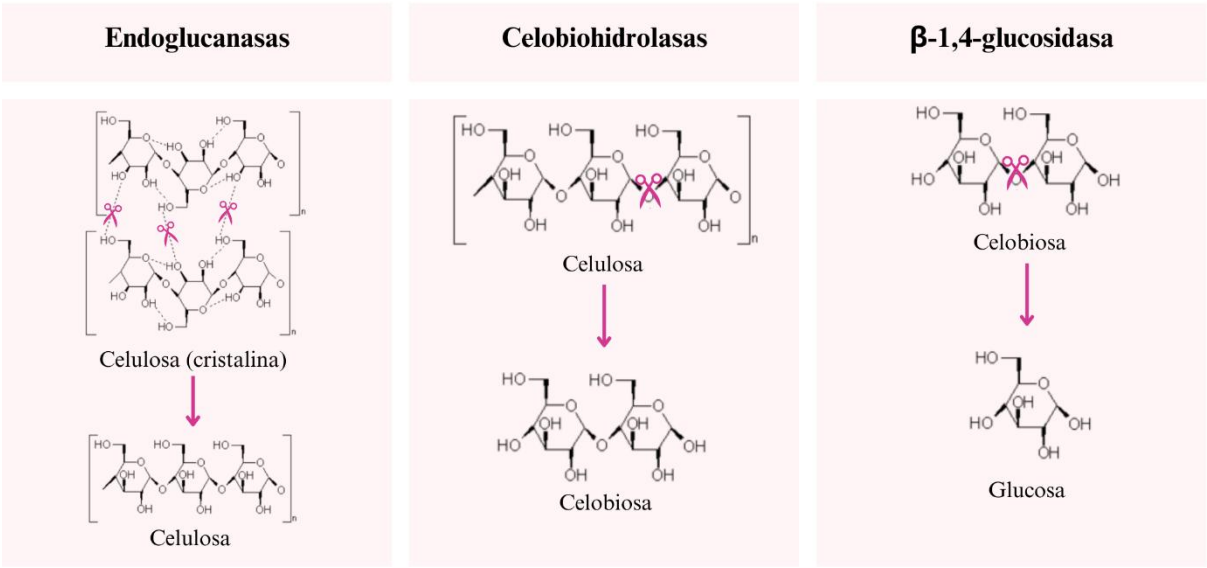


Figura 4. A) Estructura general de una celulasa compuesta por un dominio catalítico y un dominio de unión a carbohidratos unidos mediante una bisagra. Adaptado de: Sajith et al., 2016. **B)** Sitio de hidrólisis de grupos de celulasas, y el sustrato sobre el que actúa.

Xilanasas

Las xilanasas pertenecen a la familia de las glicosido-hidrolasas (EC 3.2.1.8) y según la base de datos CAZy (Drula et al., 2022) a la familia GH11. Pueden utilizar xilano de abedul, xilano de avena y espelta, xilano de madera de haya como sustratos (Ping et al., 2018). Su función es catalizar la endohidrólisis de los enlaces 1,4-β-D-xilosídicos del xilano. Según Polizeli et al., (2005), la degradación del xilano necesita un complejo enzimático, compuesto por Endo- 1,4 β – xilanasas y β – xilosidasas (Figura 5B).

- Endo- 1,4 β – xilanasas

Llevan a cabo el rompimiento de los enlaces glucosídicos de la estructura del xilano, resultando una reducción en el grado de polimerización del sustrato. Se clasifican según hidrolicen o no las ramas laterales desramificantes y no desramificantes, respectivamente. Sin embargo, algunos hongos son capaces de producir ambos tipos de xilanasas, resultando en una hidrólisis eficiente del xilano.

- β - xilosidasas

Las β – xilosidasas fúngicas, usualmente son glicoproteínas monoméricas, pero se han reportado algunas que poseen dos o tres subunidades, son exo-enzimas encargadas de hidrolizar el xilano presente en la pared celular vegetal, liberando residuos de β-D-xilosa. Generalmente, estas proteínas tienen pesos relativos entre los 60 y 360 kDa, con un amplio rango de pH óptimo de 4.0 y 5.0, y una temperatura óptima entre 40 y 80°C.

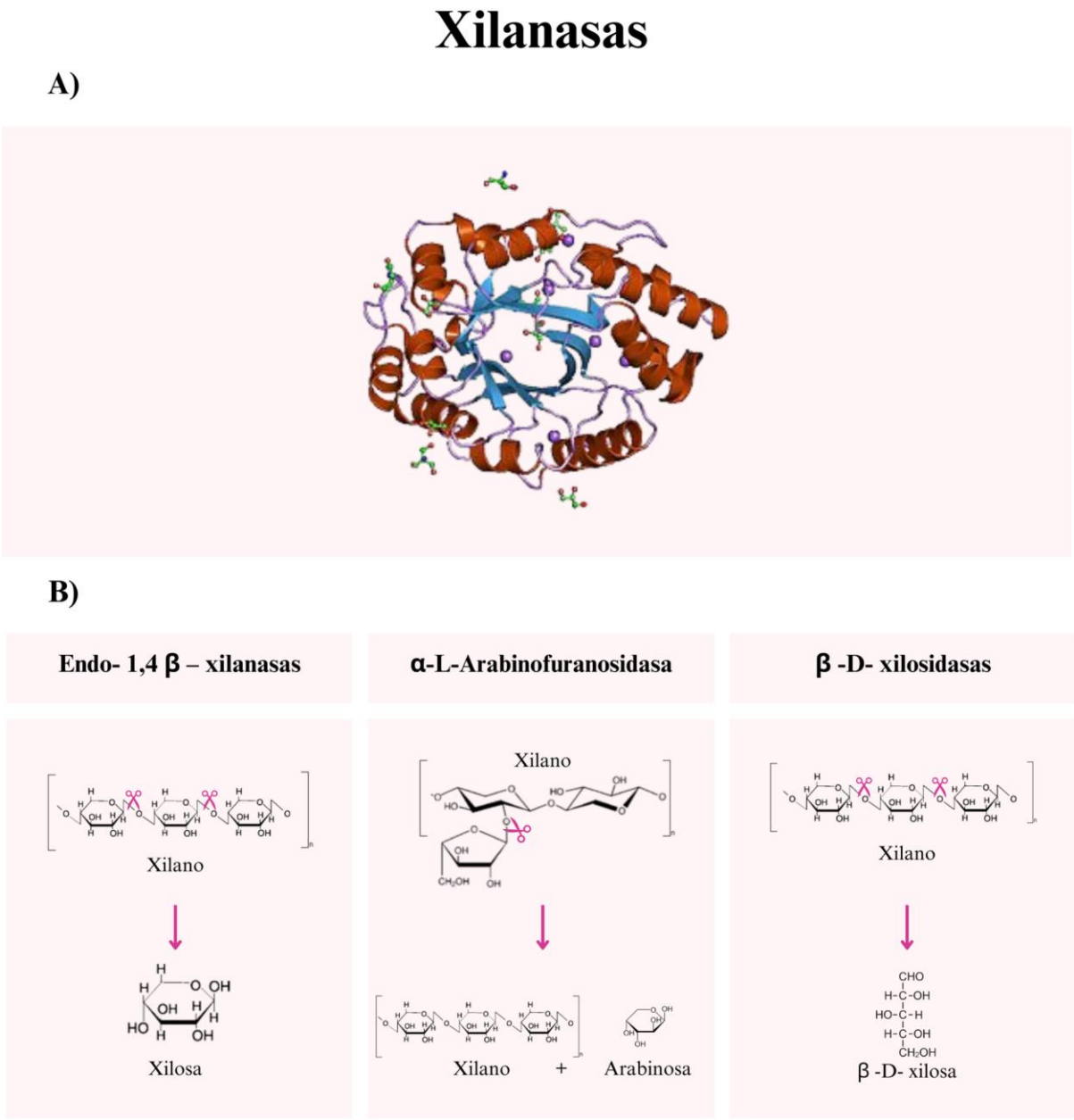


Figura 5. A) Estructura general de una xilanasa. **B)** Sitio activo de las xilanasas, en donde se muestra el sustrato en el que cada grupo actúa y las hidrólisis que realizan. Adaptado de: Schmidt et al., (1998)

Lacasas

Las lacasas pertenecen a la familia de las oxidorreductasas (EC 1.10.3.2), su mecanismo de acción implica la transferencia de hidrógeno y átomos de oxígeno desde el sustrato a otra molécula, catalizando la oxidación de compuestos tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos, reduciendo el oxígeno molecular a agua. Su rol biológico está relacionado con la degradación de lignina y de xenobióticos orgánicos (Sánchez-Ramírez et al., 2014).

Existen en una variedad estructural, la mayoría de ellas monoméricas, pero algunas de ellas también están presentes en formas homodiméricas, heterodiméricas y multiméricas. Su peso molecular se encuentra entre los 50 a 140 kDa, dependiendo el organismo, aunque una lacasa fúngica típica, varía entre los 60 a los 70 kDa con un punto isoeléctrico alrededor del pH 4.0 (Baldrian, 2006; Rivera-Hoyos et al., 2013).

Estructuralmente, el sitio activo contiene 4 átomos de cobre, coordinados de manera covalente al centro de la proteína mediante 10 residuos de histidina y un residuo de cisteína, necesarios para la actividad catalítica enzimática. Estos átomos, se agrupan en tres sitios de óxido-reducción, denominados centros de cobre T1, T2 y T3, que se clasifican basándose en sus características espectroscópica (Aza & Camarero, 2023).

De acuerdo a Sahay (2020) las lacasas fúngicas el ligando axial del T1 es coordinado por dos histidinas y un residuo de cisteina. El T2 es coordinado por dos residuos de histidinas y es estratégicamente posicionado cerca del cobre tipo 3. Y finalmente, el T3 es regulado por 6 histidinas. Los cobres tipo 2 y 3 forman un conjunto trinuclear en donde el oxígeno molecular es reducido liberando agua.

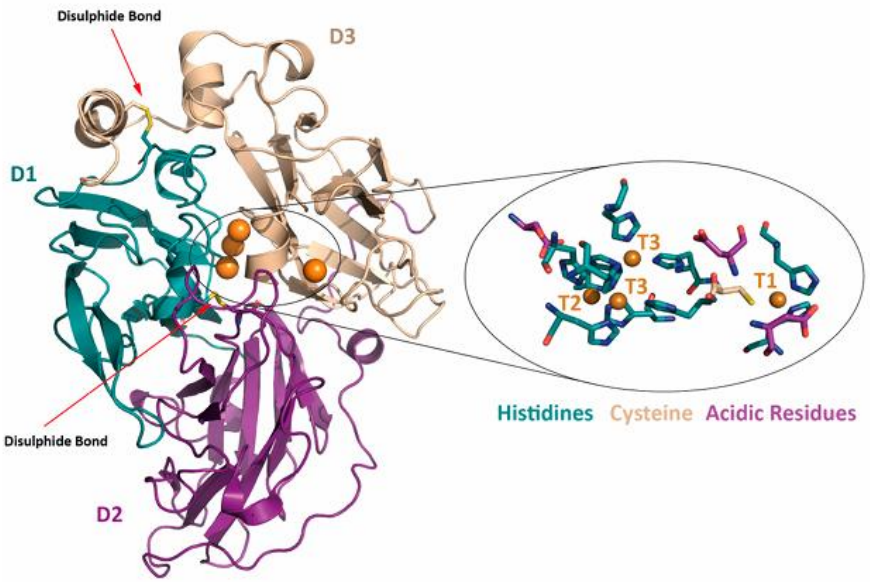


Figura 6. Representación del sitio catalítico de una lacasa de un basidiomiceto (PDB 5ANH) resaltando los sitios de cobre en naranja y mostrando un zoom del sitio activo mostrando las histidinas (azul) y cisteínas (beige) que coordinan los cuatro cobres catalíticos y los residuos conservados que ayudan a la catálisis (morado). Adaptado de: Aza & Camarero, 2023.

Referente a la posición del ligando, se ha argumentado que, el ligando en posición axial influye en el potencial de oxidación de la enzima, lo que posiblemente proporciona el mecanismo para regular su actividad (Enguita, 2011).

Aplicaciones generales de las enzimas lignocelulolíticas en la industria biotecnológica

Las enzimas lignocelulolíticas constituyen un grupo de enzimas capaces de llevar a la biomasa lignocelulolítica a su forma monomérica, haciendola accesible a bioconversiones y multiples productos y aplicaciones en diversas industrias, incluyendo: papel, textil, alimentos y bebidas, biocombustibles y biorremediación. Estas enzimas pueden ser aplicadas en diferentes procesos y en varios propósitos (Benatti & Polizeli, 2023).

Figura 7. Aplicaciones de las enzimas lignocelulolíticas en diversas industrias. Adaptado de: Benatti & Polizeli, 2023.

Actualmente las celulasas son ampliamente utilizadas en la industria textil para el ablandamiento de algodón y desteñido de mezclilla, en el mercado de los detergentes para el cuidado del color y anti-deposición. Dentro de la industria alimentaria, son empleadas para favorecer la extracción y filtración de jugos y en la industria de la pasta kraft y de papel se usan para la eliminación de tinta (Kirk et al., 2002).

Las xilanasas y su posibilidad de poder comercializarlas, se asocia a su capacidad misma de degradar el xilano, con aplicaciones industriales, como la producción de forrajes,

compostaje, extracción de café, extracción de aceites vegetales, extracción de almidón, clarificación de jugos, entre otros (Polizeli et al., 2005).

Las lacasas tienen múltiples usos en toda la industria, desde la textil, papelera, alimenticia, farmacéutica y médica. Actualmente se ha estudiado su uso en biosensores y biorremediación de pesticidas, insecticidas y tinturas, aprovechando su capacidad para degradar una amplia variedad de compuestos similares a la lignina tanto fenólicos como no fenólicos (Acevedo Barajas et al., 2015)

Antecedentes

Dada la versatilidad de los hongos por crecer en diversos sustratos, diversas investigaciones han sido dirigidas en evaluar el crecimiento del hongo y la producción de complejos enzimáticos con base en la bioconversión de diferentes sustratos considerados residuos agroindustriales para la disminución su impacto ambiental y participando en la economía circular (Israilides & Philippoussis, 2003).

Actualmente, existen trabajos que reportan diferentes niveles de actividad catalítica, según el sustrato en el que el hongo creció, siendo las características del sustrato pieza clave en la regulación de secreción de enzimas que participan en la degradación de la biomasa. De Vega Luttmann (2021) reporta que se obtiene una mayor actividad enzimática de *H. erinaceus* empleando el sustrato formulado con aserrín de pino, cáscara de nuez y salvado de trigo (**Tabla 1**).

Por otro lado, en la **Tabla 1** se muestran los resultados Maldonado (2022) y Kurt & Buyukalaca (2010) que reportan la actividad enzimática de *P. ostreatus* en cascarilla de cacahuate y salvado de trigo y en salvado de paja de trigo, salvado de paja de arroz y otros residuos de viticultura, respectivamente.

Tabla 1. Registro de la variación de actividades enzimáticas según el sustrato evaluado.

Hongo	Sustrato evaluado	Actividad enzimática (UI/gSS)	Referencia
H. erinaceus	Aserrín de pino	Cel – 3.9 Xil – 3.2 Lac – 1.0	(De Vega Luttmann, 2021)
	Aserrín de pino – Cáscara de Nuez	Cel – 3.5 Xil – 3.5 Lac – 0.6	
	Aserrín de pino – Salvado de trigo	Cel – 33.3 Xil – 1.2 Lac – 17.4	
	Aserrín de pino – Salvado de trigo – Cáscara de Nuez	Cel – 20.6 Xil – 1.2 Lac – 13.8	
	Cascarilla de cacahuate	Cel – 6.46 Xil – 9.93 Lac – 788.66	(Maldonado, 2022)
	Salvado de trigo	Cel – 5.49 Xil – 12.74 Lac – 48.87	
Pleurotus spp.	Bagazo de caña de azúcar	Cel – 5.64 Xil – 18.49 Lac – 50.55	(Peláez-Acero et al., 2011)
	Extracto de paja de trigo	Cel - 0.18 Xil - 5.79 Lac - 0.040	(Membrillo et al., 2008)

Estos y otros trabajos, demuestran cómo las formulaciones pueden influir no solo la cantidad de enzimas que los hongos secretan al medio, además demuestran que según el tipo de sustrato en el que se encuentren, se puede identificar el complejo enzimático producido para poder proliferar de manera correcta. Sin embargo, aún se desconoce el perfil enzimático que es producido y que permite degradar dichos sustratos, así como los mecanismos moleculares que

regulan su expresión. Lo anterior es relevante para el desarrollo de nuevas aplicaciones en áreas como diseño de biosensores, síntesis de paneles de fibras y cosméticos, entre otras aplicaciones.

Justificación

Las enzimas lignocelulolíticas producidas por basidiomicetos tienen un papel crucial para la descomposición y colonización de sustratos lignocelulósicos. Sin embargo, a pesar de su importancia, la información estructural disponible sobre estas enzimas aún es limitada, lo que subraya la necesidad de continuar con investigaciones que profundicen el conocimiento sobre su diversidad, así como entender con mayor claridad la relación entre su estructura y función. Además, es fundamental comprender cómo la composición de los sustratos influye en la producción de enzimas lignocelulolíticas para diseñar procesos de degradación de biomasa más eficientes y rentables. En este contexto, el estudio de las enzimas lignocelulolíticas producidas por *Hericium erinaceus* y *Pleurotus ostreatus* resultan especialmente relevantes, ya que estas especies son conocidas por su capacidad para descomponer biomasa, por lo que pueden ser un modelo ideal para explorar cómo sus enzimas interactúan con los sustratos lignocelulósicos. Este conocimiento no solo ampliará nuestra comprensión fundamental sobre el proceso biológico de descomposición, sino que también tiene el potencial de generar herramientas enzimáticas con características mejoradas para aplicaciones biotecnológicas de interés.

Pregunta de Investigación

¿Cuál es la relación entre la estructura de las enzimas lignocelulolíticas producidas por *Hericium erinaceus* y *Pleurotus ostreatus* y su capacidad para descomponer sustratos lignocelulósicos?

Hipótesis

La comprensión estructural de las enzimas lignocelulolíticas producidas por *Hericium erinaceus* y *Pleurotus ostreatus* permitirá conocer la relación con su capacidad de descomposición de sustratos lignocelulósicos.

Objetivos

General

Analizar la relación estructura-función de enzimas lignocelulolíticas producidas por *Hericium erinaceus* y *Pleurotus ostreatus*.

Específicos

- Describir las características estructurales de enzimas lignocelulolíticas putativas producidas por *Hericium erinaceus* y *Pleurotus ostreatus* mediante análisis *in silico.*
- Determinar la actividad catalítica de enzimas lignocelulolíticas de *Pleurotus ostreatus* y *Hericium erinaceus* producidas en sustrato agotado.

Materiales y Métodos

Análisis *In Silico* de secuencias de enzimas putativas de *H. erinaceus* y *P. ostreatus*.

Se realizó un análisis *in silico* utilizando la base de datos UniProt (uniprot.org). Se recopiló la secuencia de aminoácidos de celulasas, xilanasas y lacasas reportadas para *P. ostreatu*s como para *H. erinaceus*. Una vez hecho lo anterior, se obtuvo la matriz con todas las secuencias reportadas, se sometieron a un proceso de filtración para asegurar que las secuencias no presentaran regiones incompletas o ambigüedades que pudieran interferir con el análisis posterior.

El primer proceso de filtración las secuencias de cada grupo fueron revisadas en formato fasta eliminando aquellas cuya función no correspondía a la de las enzimas aquí estudiadas. Una vez realizado esto para cada grupo de enzimas las secuencias restantes fueron ingresadas al NCBI Batch CD search, en donde se identificó de manera precisa a qué familia pertenecía esa secuencia primaria, además de señalar los intervalos en la secuencia que confieren al dominio catalítico. En este proceso las secuencias se sometieron a un segundo proceso de depuración, ya que en algunas el dominio catalítico no era identificado y otras no cumplían con la función esperada.

Finalmente, se realizaron alineamientos por grupo de enzimas y a su vez por dominio catalítico. Se identificó la enzima más estudiada de cada grupo y se descargó su estructura tridimensional (en la mayoría de los casos la estructura tridimensional fue resultado de una predicción de Alpha-fold), con la finalidad de revisar y analizar no solo un alineamiento de secuencia primaria, sino también de estructura secundaria. Este alineamiento se realizó en ESPript 3.0 (Rober y Gouet, 2014).

Formulación de sustratos utilizados para el crecimiento de *H. erinaceus* y *P. ostreatus.*

Los bloques de sustrato agotado de *Hericium erinaceus* se obtuvieron de cinco sustratos agotados de 90 días de almacenamiento con su respectivo duplicado con las siguientes formulaciones:

HS1: 80% viruta de encino + 20% salvado de trigo

HS2: 50% aserrín de pino + 50 % paja de cebada

HS3: 40% aserrín de pino + 40% paja de cebada + 20% salvado de trigo

HS4: 40% aserrín de pino + 40% paja de cebada + 20% hollejo de uva

HS5: 40% aserrín de pino + 40% paja de cebada + 20% cáscara de nuez

Figura 8. Bolsas de sustrato agotado de *Hericium erinaceus* con 90 días de almacenamiento.

Por otro lado, para la obtención del extracto crudo enzimático se utilizó sustrato agotado de *Pleurotus ostreatus* (empresa productora "Hongos tolteca" cuyo único componente es paja de avena), mismo que se utilizó como referencia y comparación de los datos obtenidos por *H. erinaceus*.

Obtención del Extracto Crudo Enzimático

A partir de los bloques de sustrato agotado se tomaron 20 g totales de cada bloque tanto de *H. erinaceus* como de *P. ostreatus*, de los cuales 10 g fueron destinados para la obtención de peso seco y los 10 g restantes para la obtención del extracto crudo enzimático (De Vega Luttmann, 2021).

Para obtener el peso seco, se ingresaron 10 g de cada bloque a una estufa de secado durante 48 horas a 70°C. Posteriormente, se colocaron en un desecador durante 1 hora para asegurar que el peso no variara y finalmente pesarlos.

Para la obtención del extracto crudo enzimático se tomaron los 10g de muestra restantes y se hidrataron con 30 mL de 0.1M de buffer citrato pH 5.3 preparado según (Gomori, 1955). Las muestras se mantuvieron en hielo en agitación constante en un agitador orbital a 170 rpm durante 1 hora y 30 minutos. Transcurrido este tiempo, las muestras se sometieron a un proceso de filtración, a través de dos capas de gasa. La fase líquida recuperada se centrifugó (Centrifuga eppendorf 5702 R) durante 30 min a 4° C a 4200 rpm. Una vez obtenido el extracto crudo enzimático de cada muestra se preservaron en refrigeración para su posterior uso.

Cuantificación de proteína soluble

La determinación de proteína soluble se realizó mediante el ensayo de (Bradford, 1976). Las muestras fueron leídas en un volumen de 2 mL constituido por 1800 µL de 0.1M buffer citrato pH 5.3 y 200 µL de reactivo de Bradford para el blanco, mientras que las muestras se prepararon con 740 µL de buffer citrato, 60 µL de muestra (ECE) y 200 µL de reactivo de Bradford, adicionando 1000 µL de agua destilada previamente esterilizada para tomar la lectura en el espectrofotómetro DLAB (Espectrofotómetro visible SP-V1000). La curva estándar se preparó con albúmina de huevo en una concentración de 1 mg/mL con el mismo volumen de reacción, ajustando los volúmenes de estos hasta lograr 7 tubos de reacción cuyas

concentraciones fueron de 0 a 90 µL **(Tabla 1 - Gráfica 1** del **Anexo 1**). Se agitaron en vortex y se leyó la absorbancia a 595nm (Espectrofotómetro visible SP-V1000).

Finalmente, para obtener la cantidad de proteína se usó la Formula 1. En donde se calculan los $mg\ proteína/g_{MS}$ tomando en cuenta los $mg\ proteína/mL$ multiplicados por el volumen total obtenido del extracto crudo enzimático entre el peso de la muestra seca. Los $mg\ proteína/mL$ se calculan a partir de la Formula 2. En donde se toman los valores de absorbancia obtenidos a 595nm menos el valor de b entre el valor de la pendiente (m), estos últimos dos valores son obtenidos de la curva estándar (Formula 1, Gráfica 1 del Anexo 1).

Formula 1. Ecuación de la recta.

$$\mu g\ proteína/mL\ = \frac{ABS_{595}\ -\ b}{m}$$

Formula 2.

$$mg\ proteína/\ gSS\ = \frac{\left(\frac{\mu g\ proteína}{mL}\right)(Vt_{ECE})}{gSS}/1000$$

En donde: Vt_{ECE} = Volumen total del extracto crudo enzimático obtenido; gSS = gramo de sustrato seco

Los valores de absorbancia obtenidos por triplicado fueron ingresados en la Fórmula 1 para su procesamiento. Se utilizó el programa Rstudio (versión 2024.04.2.) para la realización de los gráficos.

Determinación de la actividad enzimática de celulasas, xilanasas y lacasas.

La actividad enzimática de celulasas y xilanasas, se realizó siguiendo el método de azúcares reductores Miller (1959), con un volumen de reacción de 2.5 mL conformado por; 500 µL de extracto crudo enzimático, 1.5 mL de DNS preparado según Miller (1959) y 500 µL de sustrato Carboximetilcelulosa (SIGMA-Aldrich) al 1% para las celulasas y Xilano para las xilanasas. Las muestras fueron leídas respecto a un blanco preparado con los mismos volúmenes de reacción, cambiando únicamente el orden de adición, agregando extracto previamente desnaturalizado después de la incubación. Los tubos fueron incubados durante 20 minutos a 50 °C para posteriormente detener la reacción al adicionar 1.5 mL de DNS e inmediatamente se llevaron a ebullición por 5 minutos, finalmente fueron colocados en hielo hasta alcanzar la temperatura ambiente. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro (DLAB Espectrofotómetro visible SP-V1000), a 640nm de absorbancia. La curva estándar se realizó utilizando 50mM de solución de dextrosa, 0.1M Buffer citrato pH 5.3 y ECE desnaturalizado (**Tabla 2 - Gráfica 2** del **Anexo 2**).

Para determinara la actividad enzimática de lacasas se siguió la metodología de Bourbonnais et al., (1998) se preparó un sistema de reacción de 2 mL, en donde 1mL de ECE fue incubado durante 1 minuto a 40° C para posteriormente añadir el sustrato 250 µM ABTS para *P. ostreatus* y 5mM ABTS para *H. erinaceus*, e inmediatamente colocar las muestras en una celda para ser leídas a 420nm. La preparación de la muestra blanco se preparó llevando el extracto crudo enzimático a ebullición para su desnaturalización. La reacción fue leída durante máximo 1 min 30 s, realizando las lecturas cada 10 s.

La actividad enzimática, determinada como UI/gSS se define como cantidad de µmol de sustrato oxidado por g de sustrato agotado seco (gss), empleando la Formula 3 para Celulasas y Xilanasas, y la Formula 4 para Lacasas. Además, se reportan los datos en UI/mg de proteína obtenidos a través de la Formula 5.

Formula 3.

$$UI/gSS = \frac{(Azúcares\ reductores\ liberados\ en\ \ 20\ min)(FD)(Vt_{ECE})}{gSS}$$

Formula 4.

$$UI/gSS\ = \frac{((\mu mol/mL\ x\ min)(FD))(\ Vt_{ECE})}{gSS}$$

Fórmula 5.

$$\frac{\text{UI}}{\text{mg de proteína}} = \frac{\text{UI/gSS}}{\text{mg/gSS}}$$

Resultados

Análisis *In Silico* de secuencia primaria y secundaria de enzimas lignocelulolíticas de *H. erinaceus* y *P. ostreatus*.

Las enzimas lignocelulolíticas producidas por hongos filamentosos son diversas en relación a sus características estructurales y propiedades catalíticas, por lo que es importante su estudio para ampliar el conocimiento sobre sus funciones biológicas para el diseño de futuras aportaciones biotecnológicas.

En este trabajo se realizó la búsqueda y filtrado de secuencias de celulasas, xilanasas y lacasas en bases de datos como UniProt. La tabla 2 muestra el número de secuencias finales utilizadas, eliminándose aquellas secuencias registradas como fragmentos o subunidades pequeñas, además de todas aquellas cuyo dominio catalítico no se logrará identificar o no correspondía al de una enzima lignocelulolítica.

Tabla 2. Secuencias finales obtenidas posterior al análisis *in silico* realizado a partir de información depositada en la base de datos UniProt.

Organismo	Enzima	Entradas UniProt	Secuencias finales
P. ostreatus	Cel	153	40
	Xil	17	13
	Lac	69	31
H. erinaceus	Cel	3	3
	Xil	2	2
	Lac	-	-

En el caso de la búsqueda de celulasas de *P. ostreatus*, únicamente 40 secuencias cumplieron con las características necesarias para continuar con el análisis de alineamientos de secuencia primaria. Dentro de estas secuencias se identificaron diferentes dominios catalíticos correspondientes a diferentes familias de celulasas, la familia GH7 con 31 secuencias, la familia GH45 con 4 secuencias, la familia GH12 con 3 secuencias y la familia GH9 con 2 secuencias. Para cada una de estas familias se realizó un alineamiento y se analizaron los resultados con respecto a los residuos catalíticos conservados, así como la organización a nivel de estructura secundaria (Figura 9).

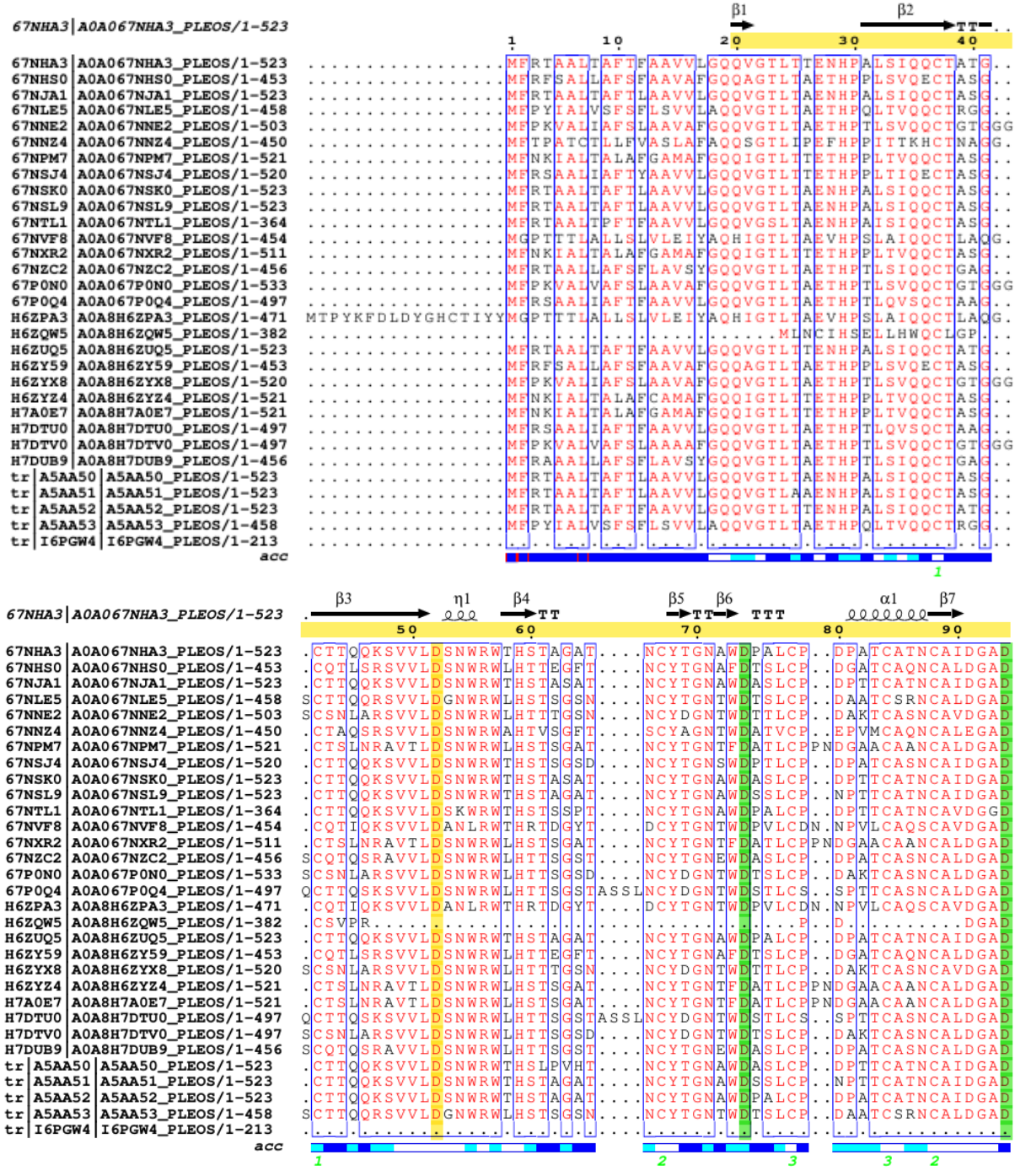
Dentro de cada alineamiento se visualizaron una serie de caracteres especiales cuyo significado se específica en la Tabla 3. Señalando que esta simbología es la misma para todos los alineamientos.

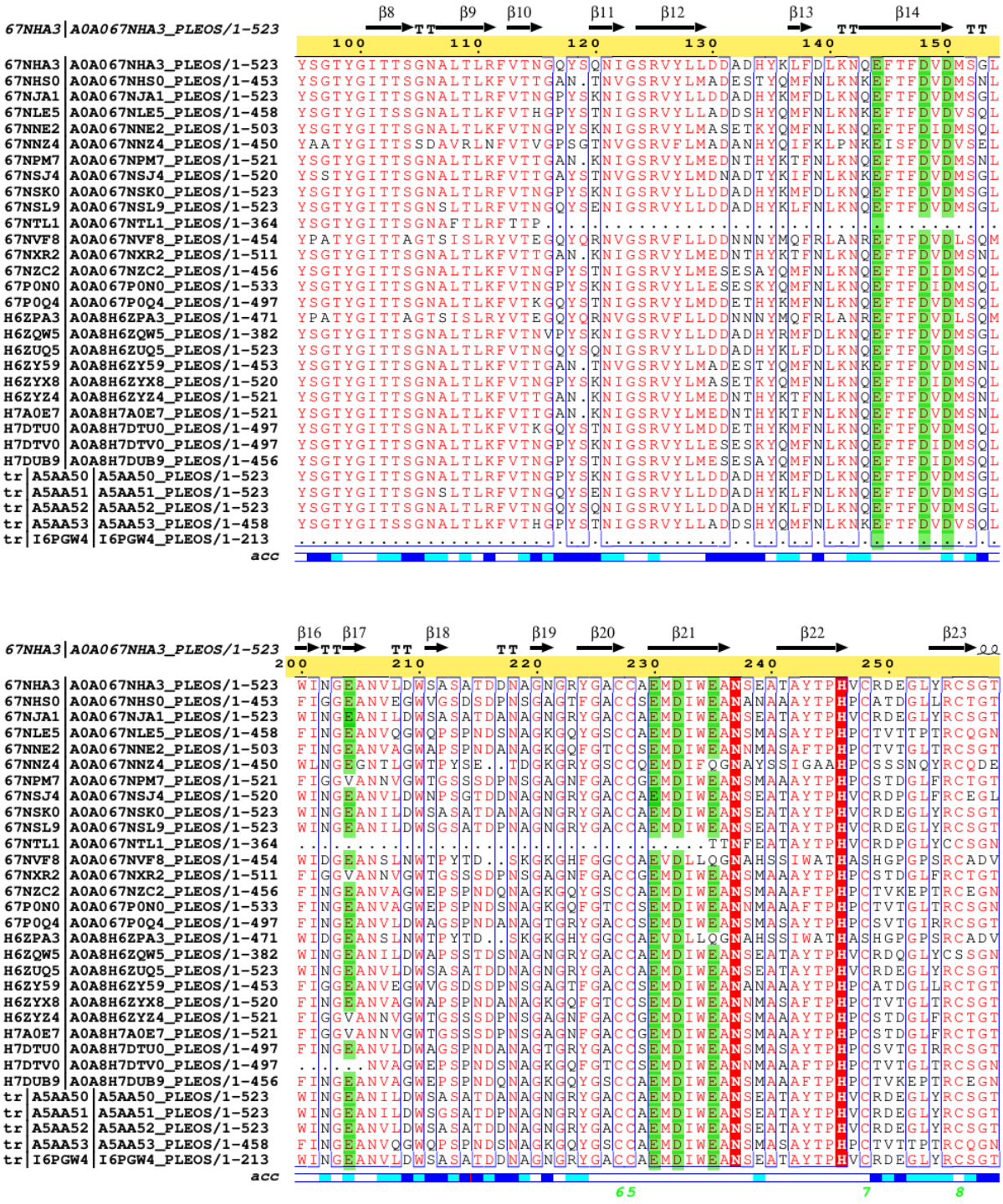
En la Figura 9 se muestra el alineamiento de las 31 secuencias de *P. ostreatus*. cuyo dominio catalítico pertenece a la familia GH7, siendo identificado desde el residuo 20 hasta el 455, y marcando el inicio del dominio catalítico en la posición 52 con un ácido aspártico y finalizando con un triptófano en la posición 400. A lo largo del alineamiento se señala con color verde la conservación de los aminoácidos con funciones esenciales dentro del dominio catalítico, siendo estos normalmente el aspartato y glutamato, para el caso de las celulasas (Gutiérrez-Rojas et al., 2015).

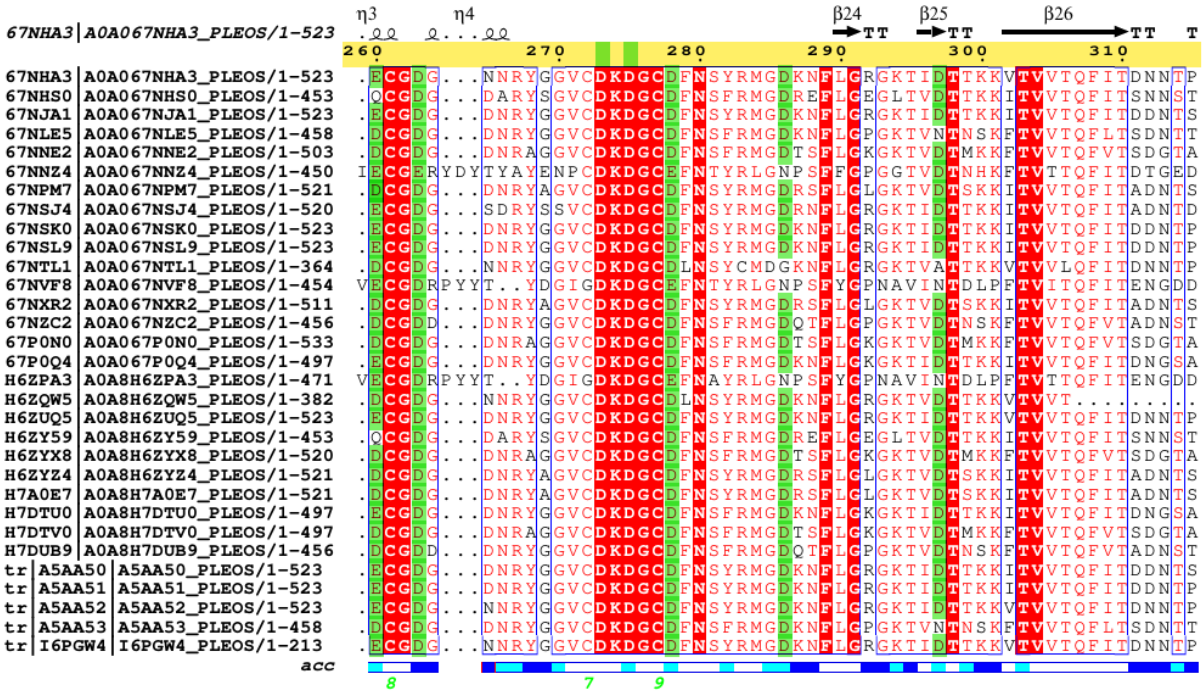
Tabla 3. Simbología de los alineamientos, según el orden de aparición. Información obtenida del programa ESPript 3.0.

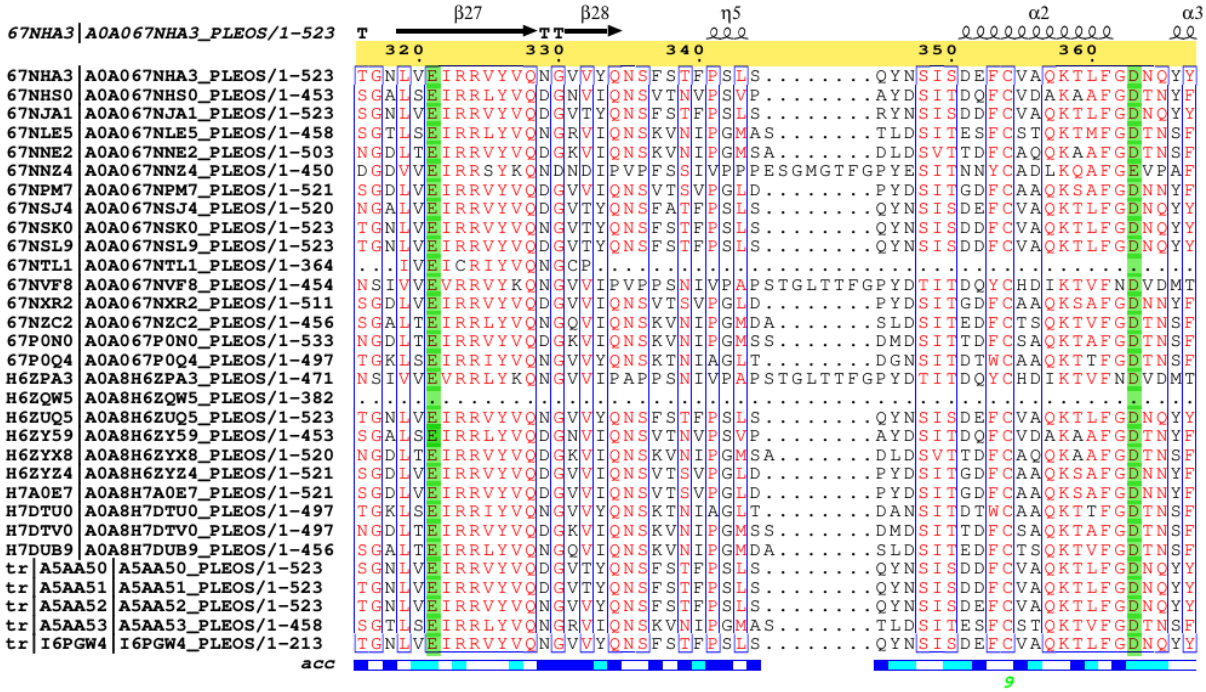
Carácter	Significado
	Lámina plegada β
	Hélice-α
	Marcos con similitud global
C	Caracteres de similitud de grupo
	Cajas de identidad
D	Dominio catalítico
acc	 Accesibilidad de aminoácidos, en donde Azul - Accesible Cian - Intermedio Blanco - Enterrado

Celulasas - GH7




67NHA3|A0A067NHA3_PLEOS/1-523
67NHA3|A0A067NHA3_PLEOS/1-523
67NHS0|A0A067NHS0_PLEOS/1-453
67NJA1|A0A067NJA1_PLEOS/1-523
67NLE5|A0A067NLE5_PLEOS/1-458
67NNE2|A0A067NNE2_PLEOS/1-503
67NNZ4|A0A067NNZ4_PLEOS/1-450
67NPM7|A0A067NPM7_PLEOS/1-521
67NSJ4|A0A067NSJ4_PLEOS/1-520
67NSK0|A0A067NSK0_PLEOS/1-523
67NSL9|A0A067NSL9_PLEOS/1-523
67NTL1|A0A067NTL1_PLEOS/1-364
67NVF8|A0A067NVF8_PLEOS/1-454
67NXR2|A0A067NXR2_PLEOS/1-511
67NZC2|A0A067NZC2_PLEOS/1-456
67P0N0|A0A067P0N0_PLEOS/1-533
67P0Q4|A0A067P0Q4_PLEOS/1-497
H6ZPA3|A0A8H6ZPA3_PLEOS/1-471
H6ZQW5|A0A8H6ZQW5_PLEOS/1-382
H6ZUQ5|A0A8H6ZUQ5_PLEOS/1-523
H6ZY59|A0A8H6ZY59_PLEOS/1-453
H6ZYX8|A0A8H6ZYX8_PLEOS/1-520
H6ZYZ4|A0A8H6ZYZ4_PLEOS/1-521
H7A0E7|A0A8H7A0E7_PLEOS/1-521
H7DTU0|A0A8H7DTU0_PLEOS/1-497
H7DTV0|A0A8H7DTV0_PLEOS/1-497
H7DUB9|A0A8H7DUB9_PLEOS/1-456
tr|A5AA50|A5AA50_PLEOS/1-523
tr|A5AA51|A5AA51_PLEOS/1-523
tr|A5AA52|A5AA52_PLEOS/1-523
tr|A5AA53|A5AA53_PLEOS/1-458
tr|I6PGW4|I6PGW4_PLEOS/1-213
acc
β8
β9
β10
β11
β12
β13
β14
100
110
120
130
140
150
β16
β17
β18
β19
β20
β21
β22
β23
200
210
220
230
240
250
65
7
8


η3
η4
β24
β25
β26
67NHA3|A0A067NHA3_PLEOS/1-523
260
270
280
290
300
310
67NHA3|A0A067NHA3_PLEOS/1-523
67NHS0|A0A067NHS0_PLEOS/1-453
67NJA1|A0A067NJA1_PLEOS/1-523
67NLE5|A0A067NLE5_PLEOS/1-458
67NNE2|A0A067NNE2_PLEOS/1-503
67NNZ4|A0A067NNZ4_PLEOS/1-450
67NPM7|A0A067NPM7_PLEOS/1-521
67NSJ4|A0A067NSJ4_PLEOS/1-520
67NSK0|A0A067NSK0_PLEOS/1-523
67NSL9|A0A067NSL9_PLEOS/1-523
67NTL1|A0A067NTL1_PLEOS/1-364
67NVF8|A0A067NVF8_PLEOS/1-454
67NXR2|A0A067NXR2_PLEOS/1-511
67NZC2|A0A067NZC2_PLEOS/1-456
67P0N0|A0A067P0N0_PLEOS/1-533
67P0Q4|A0A067P0Q4_PLEOS/1-497
H6ZPA3|A0A8H6ZPA3_PLEOS/1-471
H6ZQW5|A0A8H6ZQW5_PLEOS/1-382
H6ZUQ5|A0A8H6ZUQ5_PLEOS/1-523
H6ZY59|A0A8H6ZY59_PLEOS/1-453
H6ZYX8|A0A8H6ZYX8_PLEOS/1-520
H6ZYZ4|A0A8H6ZYZ4_PLEOS/1-521
H7A0E7|A0A8H7A0E7_PLEOS/1-521
H7DTU0|A0A8H7DTU0_PLEOS/1-497
H7DTV0|A0A8H7DTV0_PLEOS/1-497
H7DUB9|A0A8H7DUB9_PLEOS/1-456
tr|A5AA50|A5AA50_PLEOS/1-523
tr|A5AA51|A5AA51_PLEOS/1-523
tr|A5AA52|A5AA52_PLEOS/1-523
tr|A5AA53|A5AA53_PLEOS/1-458
tr|I6PGW4|I6PGW4_PLEOS/1-213
acc
8
7
9


β27
β28
η5
α2
α3
67NHA3|A0A067NHA3_PLEOS/1-523
320
330
340
350
360
67NHA3|A0A067NHA3_PLEOS/1-523
67NHS0|A0A067NHS0_PLEOS/1-453
67NJA1|A0A067NJA1_PLEOS/1-523
67NLE5|A0A067NLE5_PLEOS/1-458
67NNE2|A0A067NNE2_PLEOS/1-503
67NNZ4|A0A067NNZ4_PLEOS/1-450
67NPM7|A0A067NPM7_PLEOS/1-521
67NSJ4|A0A067NSJ4_PLEOS/1-520
67NSK0|A0A067NSK0_PLEOS/1-523
67NSL9|A0A067NSL9_PLEOS/1-523
67NTL1|A0A067NTL1_PLEOS/1-364
67NVF8|A0A067NVF8_PLEOS/1-454
67NXR2|A0A067NXR2_PLEOS/1-511
67NZC2|A0A067NZC2_PLEOS/1-456
67P0N0|A0A067P0N0_PLEOS/1-533
67P0Q4|A0A067P0Q4_PLEOS/1-497
H6ZPA3|A0A8H6ZPA3_PLEOS/1-471
H6ZQW5|A0A8H6ZQW5_PLEOS/1-382
H6ZUQ5|A0A8H6ZUQ5_PLEOS/1-523
H6ZY59|A0A8H6ZY59_PLEOS/1-453
H6ZYX8|A0A8H6ZYX8_PLEOS/1-520
H6ZYZ4|A0A8H6ZYZ4_PLEOS/1-521
H7A0E7|A0A8H7A0E7_PLEOS/1-521
H7DTU0|A0A8H7DTU0_PLEOS/1-497
H7DTV0|A0A8H7DTV0_PLEOS/1-497
H7DUB9|A0A8H7DUB9_PLEOS/1-456
tr|A5AA50|A5AA50_PLEOS/1-523
tr|A5AA51|A5AA51_PLEOS/1-523
tr|A5AA52|A5AA52_PLEOS/1-523
tr|A5AA53|A5AA53_PLEOS/1-458
tr|I6PGW4|I6PGW4_PLEOS/1-213
acc
9

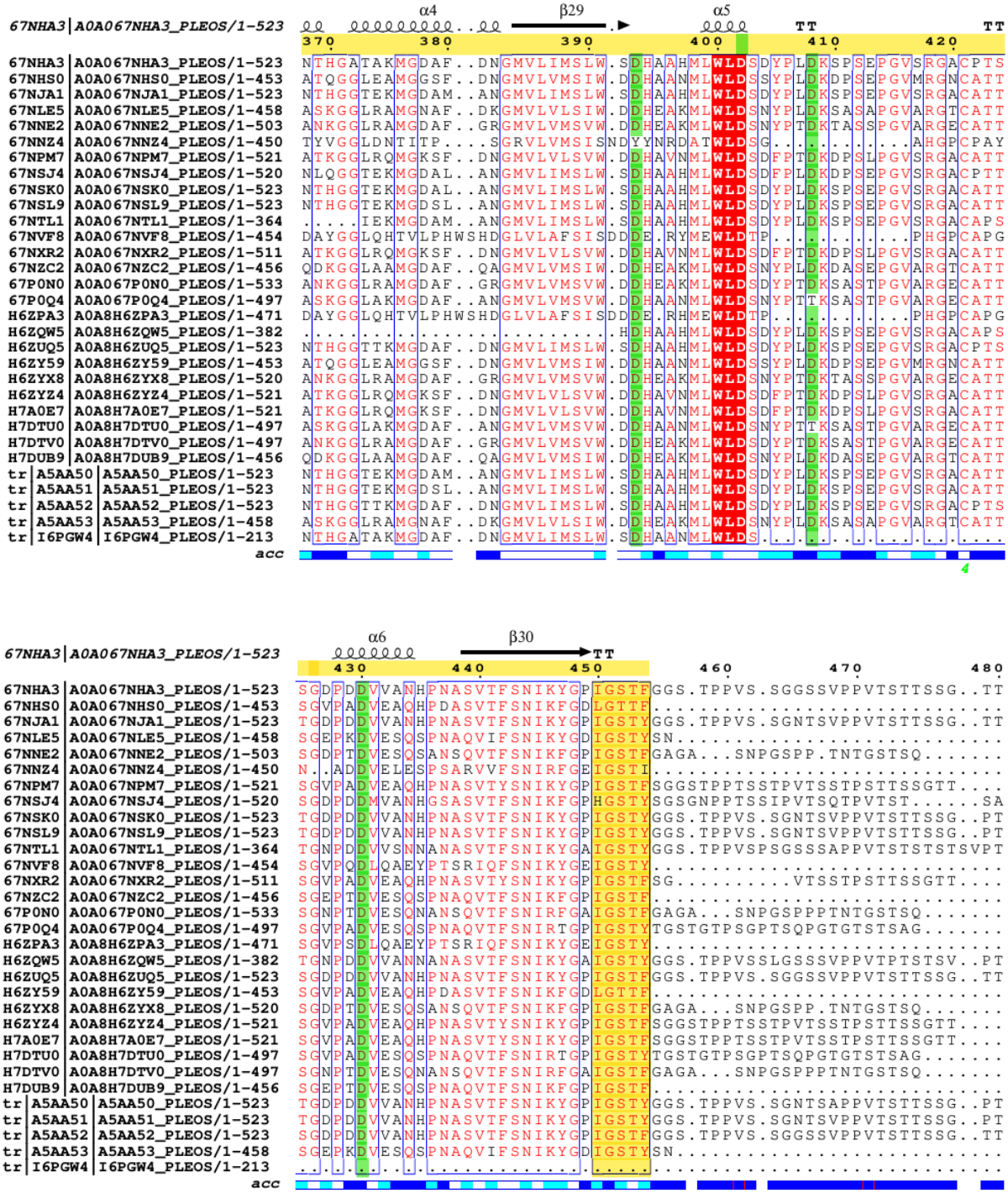


Figura 9. Alineamiento del dominio catalítico perteneciente a la familia GH7 de las 31 secuencias de celulasas registradas de *P.ostreatus.*

Nota: En el primer renglón del alineamiento se refleja la predicción secundaria de Alpha Fold de la enzima más estudiada para cada familia de las celulasas

De manera adicional, en la Tabla 4 se muestra un resumen de los datos e-value obtenidos para cada dominio catalítico de cada secuencia. El valor de e-value indica la significancia y calidad del alineamiento, por lo que se recomiendan valores de e-value iguales o menores a cero.

Tabla 4. Valores de e-value obtenidos del programa NCBI Batch CD al realizar los alineamientos de la Figura 9.

Entrada	De	A	e-value	Nombre del dominio
A0A067NHA3	21	453	0	Glyco_hydro_7
	291	519	2.78031e-13	CBM_1
A0A067NHS0	21	452	0	Glyco_hydro_7
A0A067NJA1	21	453	0	Glyco_hydro_7
	491	219	2.5466e-13	CBM_1
A0A067NLE5	21	455	0	Glyco_hydro_7
A0A067NNE2	21	457	0	Glyco_hydro_7
A0A067NNZ4	22	449	0	Glyco_hydro_7
A0A067NPM7	21	452	0	Glyco_hydro_7
	488	520	2.3831e-12	CBM_1
A0A067NSJ4	21	453	0	Glyco_hydro_7
	489	520	1.91042e-11	CBM_1
A0A067NSK0	21	453	0	Glyco_hydro_7
	491	519	6.82206e-13	CBM_1
A0A067NSL9	21	453	0	Glyco_hydro_7
	491	519	5.89324e-13	CBM_1
A0A067NVF8	21	453	0	Glyco_hydro_7
A0A067NXR2	21	452	0	Glyco_hydro_7
	478	510	2.33821e-12	fCBD
A0A067NZC2	21	455	0	Glyco_hydro_7

Entrada	De	A	e-value	Nombre del dominio
A0A067P0N0	21	457	0	Glyco_hydro_7
	487	513	7.01711e-13	CMB_1
A0A067P0Q4	21	458	0	Glyco_hydro_7
A0A8H6ZUQ5	21	453	0	Glyco_hydro_7
	491	519	3.06523e-13	CMB_1
A0A8H6ZY59	21	452	0	Glyco_hydro_7
A0A8H6ZYX8	21	457	0	Glyco_hydro_7
	486	514	3.10814e-13	CBM_1
A0A8H6ZYZ4	21	452	0	Glyco_hydro_7
	488	520	2.95413e-12	fCBD
A0A8H7A0E7	21	452	0	Glyco_hydro_7
	488	520	2.3831e-12	fCBD
A0A067NTL1	21	291	5.2782e-129	Glyco_hydro_7
	332	360	2.37104e-12	CBM_1
A0A8H7DTU0	21	458	0	Glyco_hydro_7
A0A8H7DTV0	21	433	0	Glyco_hydro_7
A0A8H6ZQW5	25	317	7.34929e-171	Glyco_hydro_7
	355	382	4.89432e-06	fCBD
I6PGW4	1	213	4.63672e-139	Glyco_hydro_7
0A8H7DUB9	21	455	0	Glyco_hydro_7
A5AA50	21	453	0	Glyco_hydro_7
	491	519	2.13648e-13	CBM_1
A5AA51	21	453	0	Glyco_hydro_7
	491	519	5.61264e-13	CBM_1
A5AA52	21	453	0	Glyco_hydro_7
	491	519	3.15627e-13	CBM_1
A5AA53	21	455	0	Glyco_hydro_7

Entrada	De	A	e-value	Nombre del dominio
A0A8H6ZPA3	38	470	0	Glyco_hydro_7

En la secuencia primaria de enzimas de *P. ostreatus* también se identificaron celulasas con un dominio catalítico pertenece a la familia GH45, iniciando este en 3 casos desde la posición del residuo 21 con una treonina y finalizando entre las posiciones 220-250 con una glicina o una cisteína, aunque para el caso de la secuencia A0A067P6B0 inicia en la posición 1 con un ácido aspártico y finaliza con una cisteína en la posición 194 (Figura 10), destacando en color rosa la presencia de dominios adicionales, por ejemplo la secuencia A0A067P6B0 se encontró un dominio de la posición 267 a 294 que corresponde a un dominio de unión a carbohidratos de la familia 1 (CBM_1:Dominio de unión a celulosa fúngico) que tiene afinidad principalmente a celulosa. De igual forma, los e-value obtenidos a través del NCBI para este alineamiento se reflejan en la Tabla 5.

Tabla 5. Valores de e-value obtenidos del programa NCBI Batch CD al realizar los alineamientos de la Figura 10.

Entrada	De	A	e-value	Nombre del domino
A0A067NWQ3	21	227	2.19788e-80	Glyco_hydro_45
A0A067P6B0	1	194	1.26097e-74	Glyco_hydro_45
A0A8H7A1K0	21	246	1.69264e-76	Glyco_hydro_45
A0A8H6ZXJ8	21	222	5.67388e-82	Glyco_hydro_45
	267	294	3.23656e-10	CBM_1

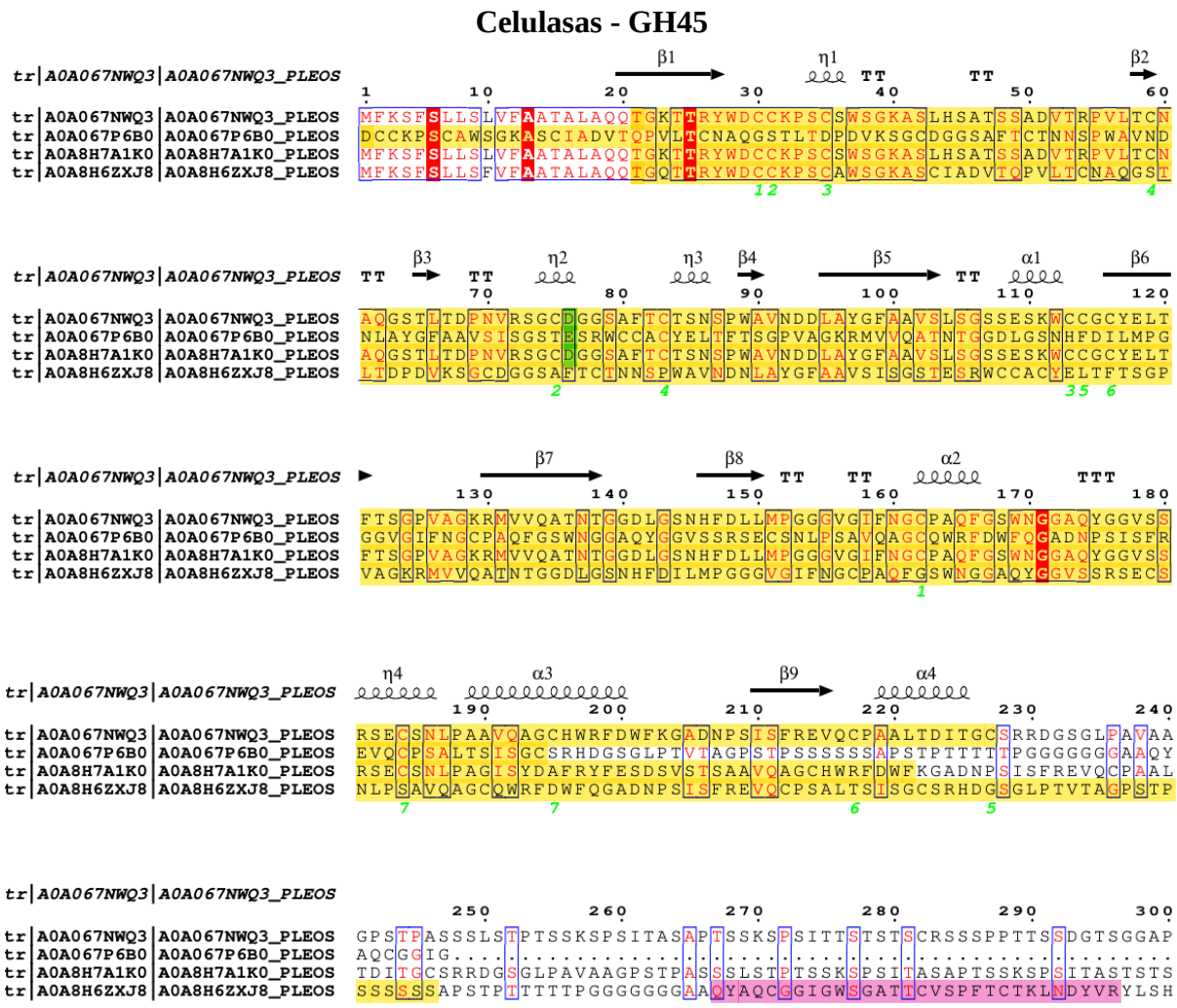


Figura 10. Alineamiento del dominio catalítico perteneciente a la familia GH45 de las 4 secuencias de celulasas registradas de *P. ostreatus*

Para las celulasas pertenecientes a la familia GH12 el dominio catalítico comprende de la posición 35 para el caso de la secuencia A0A067NVX2 y para las otras entre la posición 47/48 con la treonina o la serina y termina con la asparagina entre las posiciones 244 y 262. Adicionalmente, al dominio catalítico que corresponde a las glucósido-hidrolasas pertenecientes a la familia GH12, no se identificó otro dominio diferente a este. El e-value obtenido para el alineamiento de estas tres secuencias se reporta en la Tabla 6.

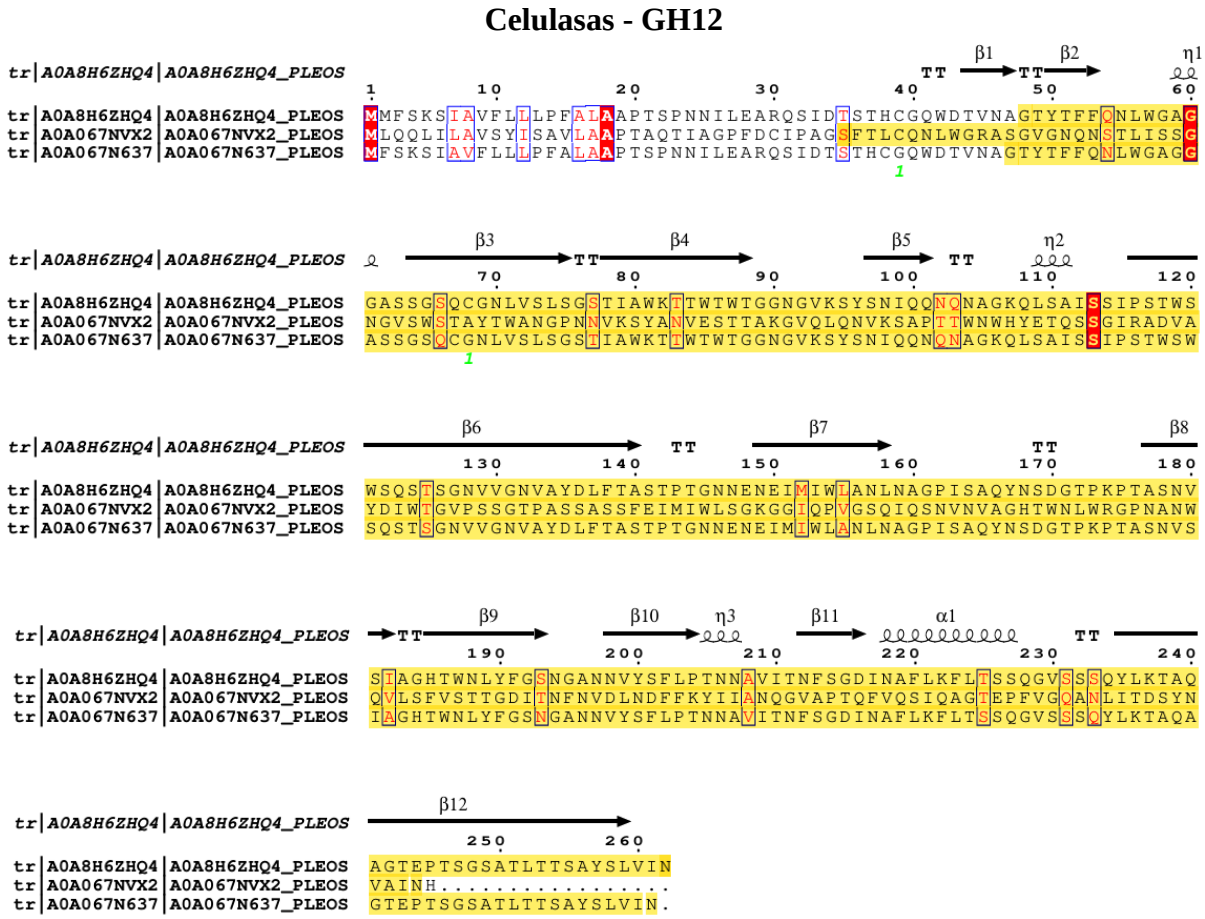


Figura 11. Alineamiento del dominio catalítico perteneciente a la familia GH12 de las 3 secuencias de celulasas registradas de *P. ostreatus*

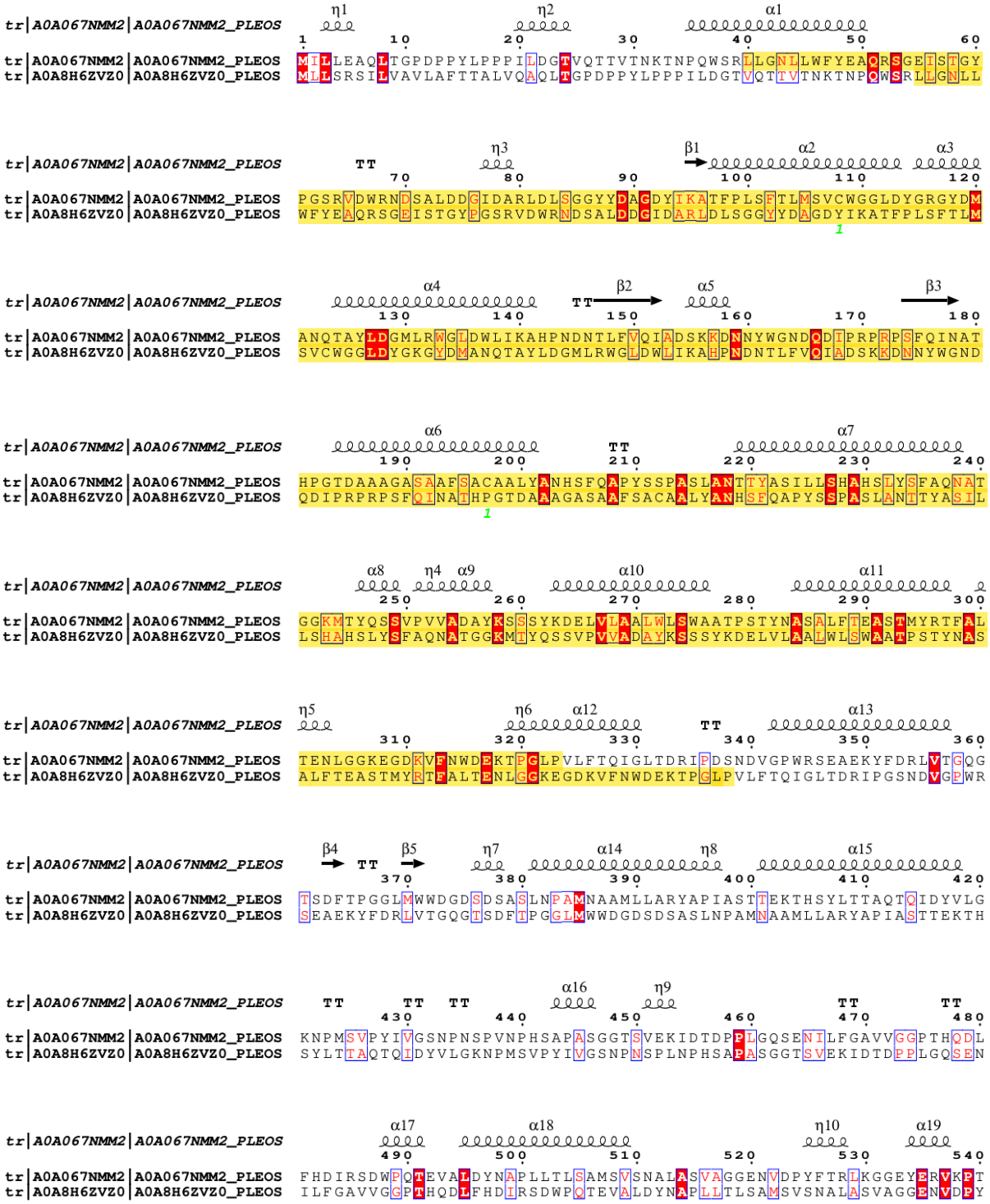
Tabla 6. Valores de e-value obtenidos del programa NCBI Batch CD al realizar los alineamientos de la Figura 11.

Entrada	De	A	e-value	Nombre del domino
A0A8H6ZHQ4	48	262	5.47162e-33	Glyco_hydro_12
A0A067NVX2	34	244	4.8373e-37	Glyco_hydro_12
A0A067N637	47	261	8.24579e-33	Glyco_hydro_12

Finalmente, se encontraron dos secuencias de celulasas que pertenecen a la familia GH9, el dominio catalítico fue identificado entre las posiciones 40 y 55 con la leucina y finaliza

en la posición 323 y 338 con la misma leucina. Al igual que en el alineamiento anterior, no se identificó un dominio diferente, reportando los valores de e-value en la Tabla 7.

Celulasas - GH9



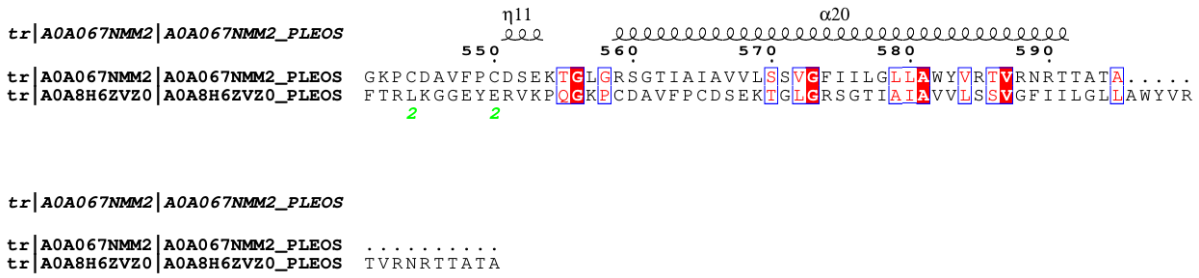


Figura 12. Alineamiento del dominio catalítico perteneciente a la familia GH9 de las 2 secuencias de celulasas registradas de *P. ostreatus*

Además del dominio catalítico que corresponde a las glucósidohidrolasas pertenecientes a la familia GH9 no se identificó otro dominio extra como en casos de familias anteriores. El e-value obtenido para el alineamiento de estas tres secuencias se reporta en la Tabla 7.

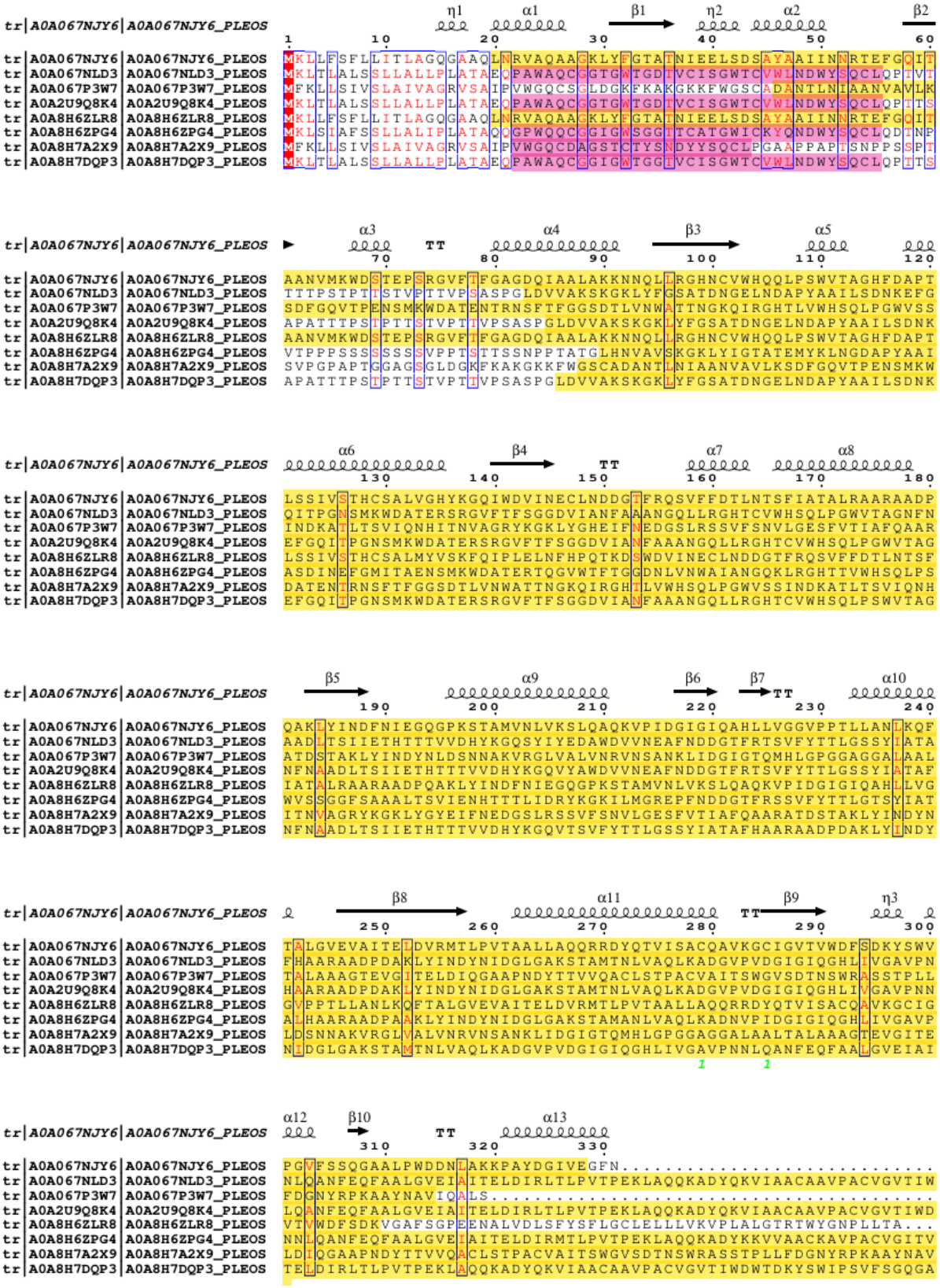
Tabla 7. Valores de e-value obtenidos del programa NCBI Batch CD al realizar los alineamientos de la Figura 12.

Entrada	De	A	e-value	Nombre
A0A067NMM2_PLEOS	40	501	1.92249e-106	Glyco_hydro_9
A0A8H6ZVZ0_PLEOS	55	516	7.53311e-107	Glyco_hydro_9

De forma similar se realizó un análisis de enzimas xilanasas encontrando principalmente dominios catalíticos pertenecientes a la familia GH10. En este alineamiento, se muestran dos valores de e-value dentro de una misma secuencia en algunos casos, dependiendo si contaba con más de un dominio (en este caso GH10 o fCBD). Aunque de igual forma el e-value es menor o igual a cero (Tabla 8). Para las xilanasas registradas de *P. ostreatus* se alinearon 13 secuencias, de las cuales 8 pertenecen a la familia GH10 y 5 a la familia GH11. En la Figura 13 se visualiza el alineamiento del dominio catalítico de la familia GH10 y además para 5

secuencias se identificó un dominio de unión a celulosa, posicionado en el inicio del dominio en el residuo 22 y finalizando en la posición 55 marcado en color rosa.

Xilanasas - GH10



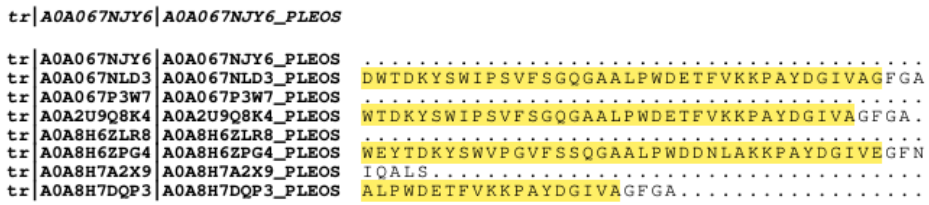


Figura 13. Alineamiento del dominio catalítico perteneciente a la familia GH10 de las 8 secuencias de xilanasas registradas de *P. ostreatus*

En la Tabla 8, se reportan los diferentes valores e-value que se obtuvieron para la familia GH10, incluyendo los dominios identificados como fCBD (fungal carbohydrate binding domain)

Tabla 8. Valores de e-value obtenidos del programa NCBI Batch CD al realizar los alineamientos de la Figura 13.

Entrada	De	A	e-value	Nombre del domino
A0A067NJY6	20	328	4.34869e-139	Glyco_hydro_10
A0A067NLD3	83	397	3.56812e-139	Glyco_hydro_10 fCBD
	22	55	7.35324e-118	
A0A067P3W7	42	314	1.20294e-118	Glyco_hydro_10
A0A2U9Q8K4	86	396	4.12429e-142	Glyco_hydro_10 fCBD
	22	55	7.25684e-14	
A0A8H6ZLR8	20	309	1.6827e–115	Glyco_hydro_10
A0A8H6ZPG4	90	398	1.0779e-133	Glyco_hydro_10 fCBD
	22	55	1.36816e-14	
A0A8H7DQP3	88	360	5.06532e-120	Glyco_hydro_10 fCBD
	21	43	0.000351752	

A0A8H7DQP3	86	379	6.35334e-126	Glyco_hydro_10
	22	55	8.32546e-15	fCBD

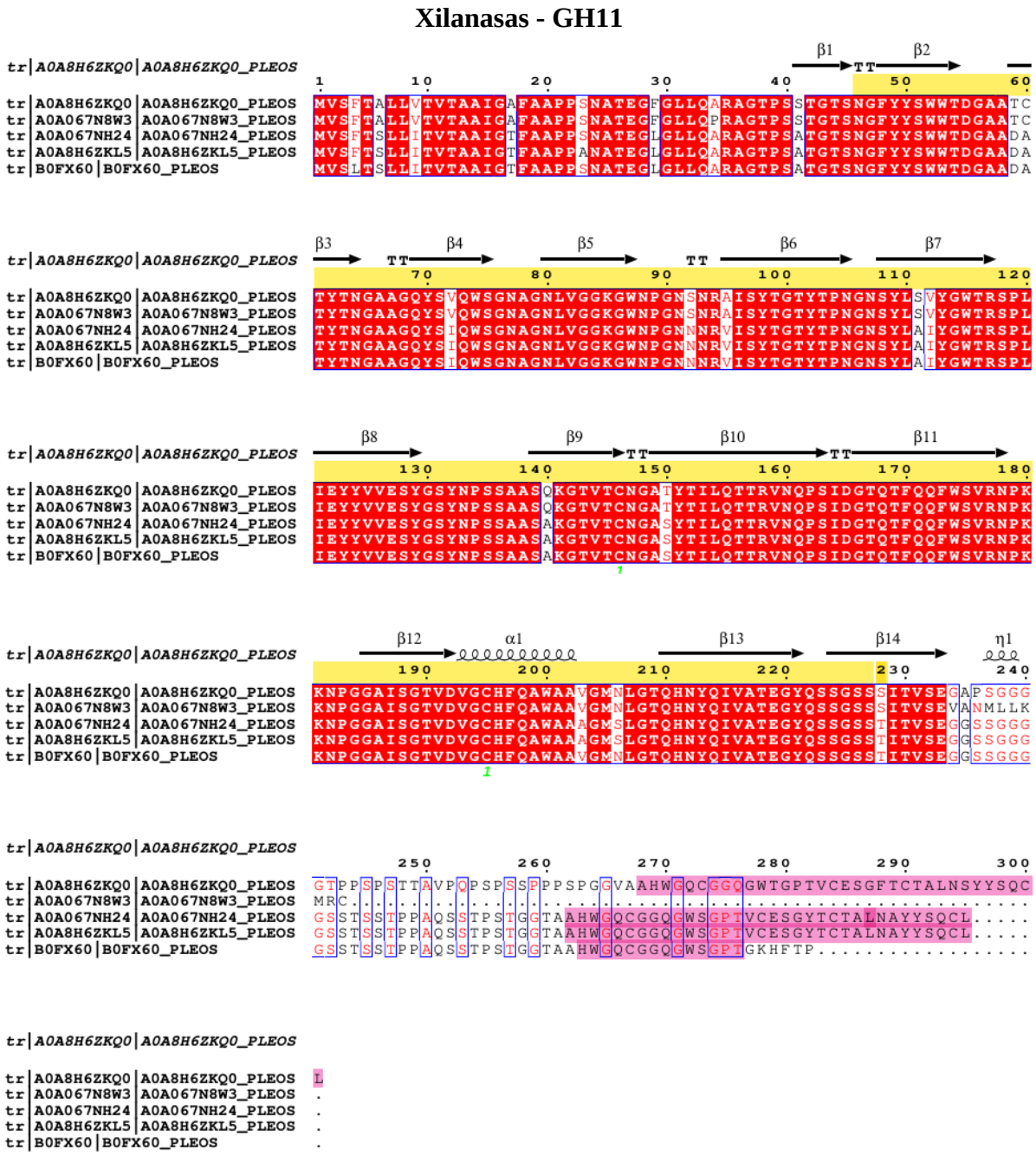


Figura 14. Alineamiento del dominio catalítico perteneciente a la familia GH11 de 5 secuencias de xilanasas de *P. ostreatus*

Las últimas 5 secuencias alineadas para las xilanasas pertenecientes a la familia GH11 mostraron tener un alto porcentaje de identidad entre ellas. Se identifica en amarillo el dominio catalítico de las GH11 y en color rosa el dominio que podría corresponder a un dominio de unión a celulosa conservado en 4 de las secuencias de la Figura 13.

De igual forma, se registran los valores e-value obtenidos al momento de la identificación del dominio catalítico.

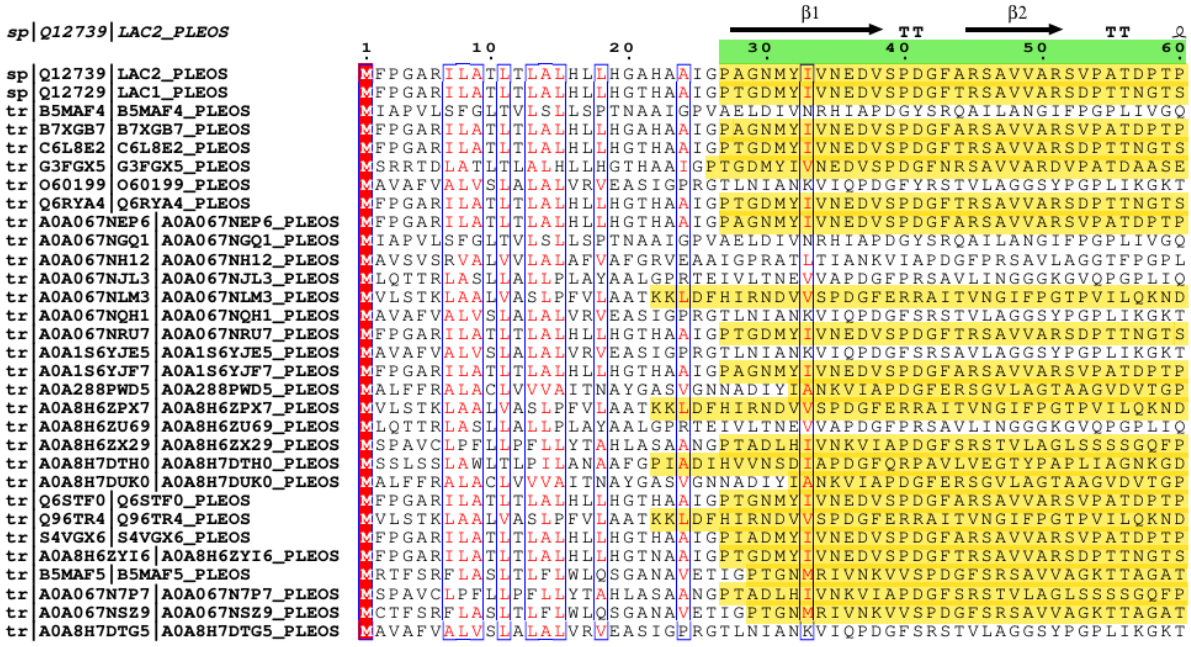
Tabla 9. Valores de e-value obtenidos del programa NCBI Batch CD al realizar los alineamientos de la Figura 14.

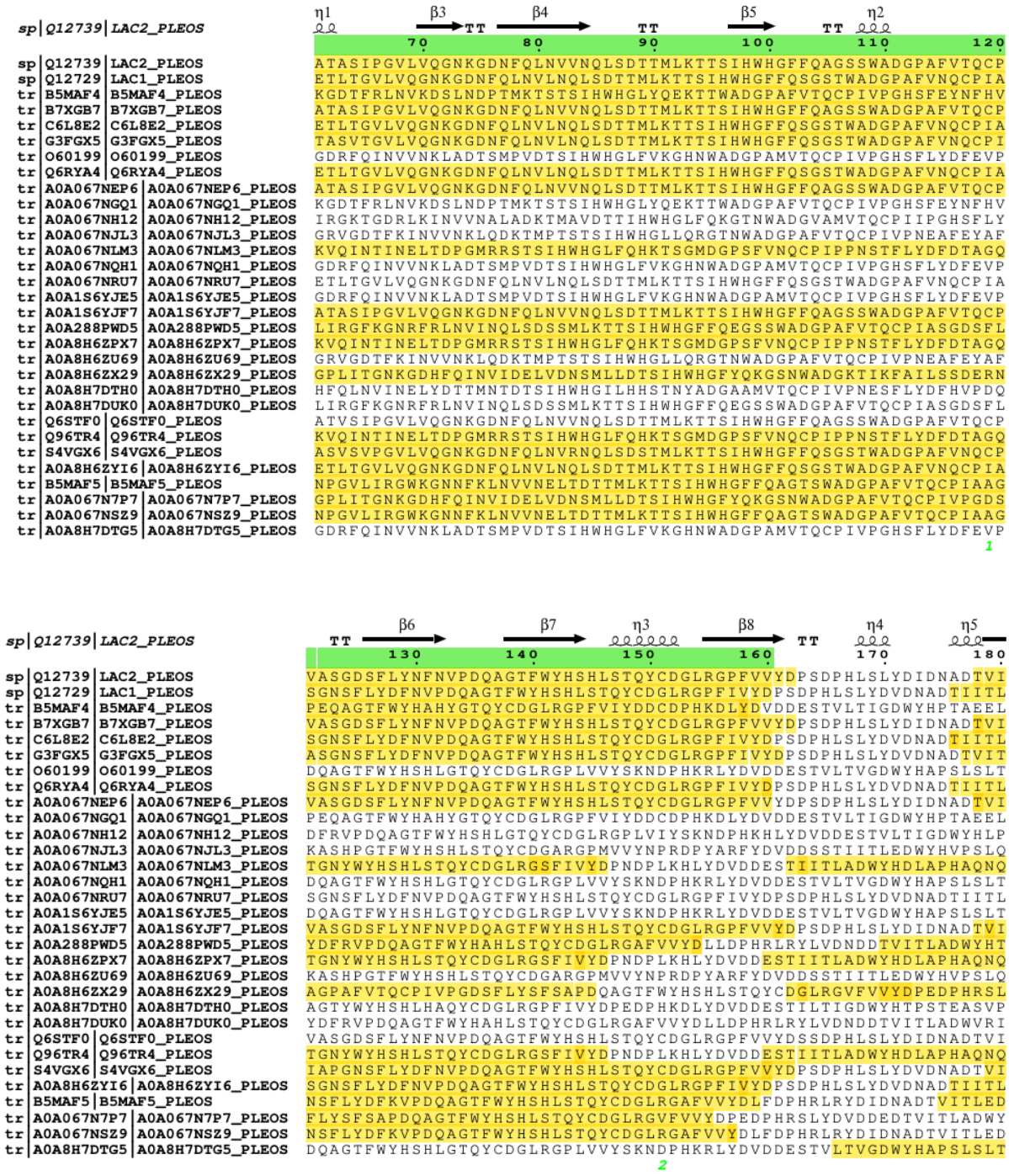
Entrada	De	A	e-value	Nombre del domino
A0A8H6ZKQ0	46	222	3.97102e-93	Glyco_hydro_11 fCBD
	268	301	1.37096e-11	
A0A067N8W3	46	222	2.86342e-96	Glyco_hydro_11
A0A067NH24	46	228	3.04918e-95	Glyco_hydro_11 fCBD
	262	295	1.09746e-12	
0A8H6ZKL5	46	228	1.86469e-95	Glyco_hydro_11 fCBD
	262	295	9.82229e-13	
B0FX60	46	228	1.12672e-95	Glyco_hydro_11 CMB_1
	263	276	0.00397364	

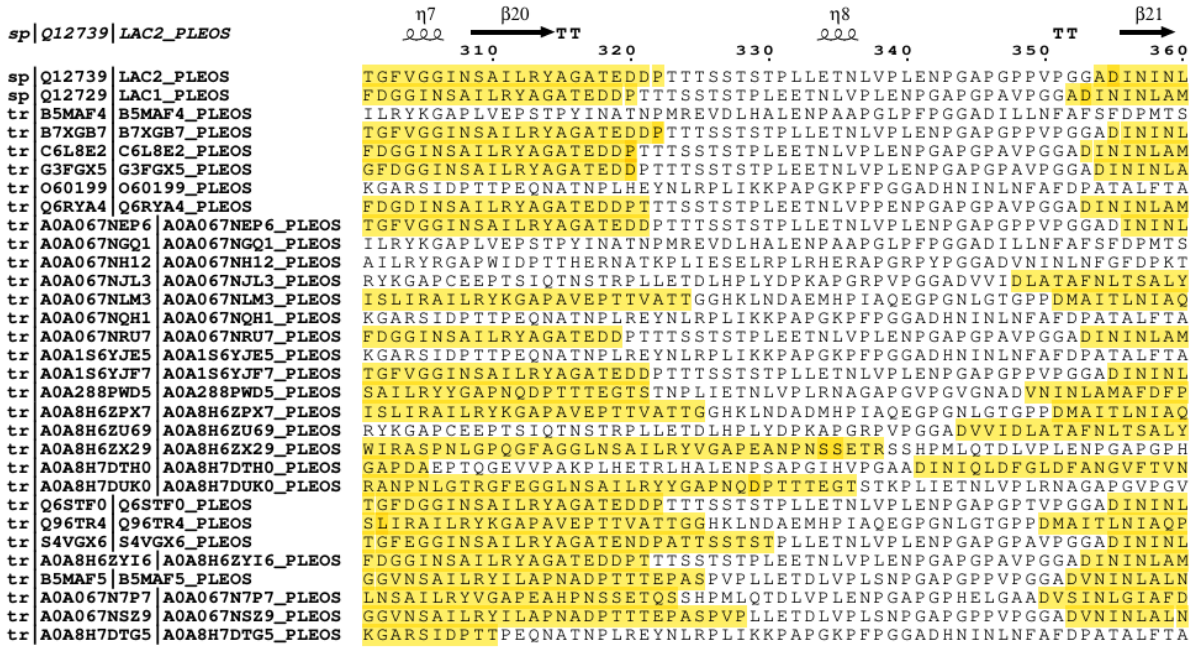
En el caso de las enzimas lacasas, la Figura 15 muestra el alineamiento obtenido de 31 secuencias de *P. ostreatus.* Se identificaron 3 dominios catalíticos correspondientes a la familia de las cupredoxinas. El primer dominio posicionado entre los residuos 94 a 141 corresponde al

dominio de la superfamilia de las cupredoxinas y dentro de este de los residuos 27 a 160 (ver Figura 15, color verde) el cual corresponde al dominio de unión a cobre tipo 1 (Figura 15, color verde), identificado únicamente en las secuencias A0A8H6ZYI6, B5MAF5, A0A067N7P7 y A0A067NSZ9. El segundo dominio igualmente correspondiente a la superfamilia de las cupredoxinas posicionado entre los residuos 176 a 321 (ver Figura 15, color amarillo). El tercero entre los residuos 354 a 502 y dentro de este último un dominio de unión a cobre tipo 3 entre los residuos 415 a 502 (ver Figura 15, color rosa).

Superfamilia de cupredoxina




sp|Q12739|LAC2_PLEOS
η1 β3 β4 β5 η2
TT TT TT TT
70 80 90 100 110 120
sp|Q12739|LAC2_PLEOS ATASIPGVLVQGNKGDNFQLNVVNQLSDTTMLKTTSIHWHGFFQAGSSWADGPAFVTQCP
sp|Q12729|LAC1_PLEOS ETLTGVLVQGNKGDNFQLNVLNQLSDTTMLKTTSIHWHGFFQSGSTWADGPAFVNQCPIA
tr|B5MAF4|B5MAF4_PLEOS KGDTFRLNVKDSLNDPTMKTSTSIHWHGLYQEKTTWADGPAFVTQCPIVPGHSFEYNFHV
tr|B7XGB7|B7XGB7_PLEOS ATASIPGVLVQGNKGDNFQLNVVNQLSDTTMLKTTSIHWHGFFQAGSSWADGPAFVTQCP
tr|C6L8E2|C6L8E2_PLEOS ETLTGVLVQGNKGDNFQLNVLNQLSDTTMLKTTSIHWHGFFQSGSTWADGPAFVNQCPIA
tr|G3FGX5|G3FGX5_PLEOS TASVTGVLVQGNKGDNFQLNVLNQLSDTTMLKTTSIHWHGFFQSGSTWADGPAFVNQCPI
tr|O60199|O60199_PLEOS GDRFQINVVNKLADTSMPVDTSIHWHGLFVKGHNWADGPAMVTQCPIVPGHSFLYDFEVP
tr|Q6RYA4|Q6RYA4_PLEOS ETLTGVLVQGNKGDNFQLNVLNQLSDTTMLKTTSIHWHGFFQSGSTWADGPAFVNQCPIA
tr|A0A067NEP6|A0A067NEP6_PLEOS ATASIPGVLVQGNKGDNFQLNVVNQLSDTTMLKTTSIHWHGFFQAGSSWADGPAFVTQCP
tr|A0A067NGQ1|A0A067NGQ1_PLEOS KGDTFRLNVKDSLNDPTMKTSTSIHWHGLYQEKTTWADGPAFVTQCPIVPGHSFEYNFHV
tr|A0A067NH12|A0A067NH12_PLEOS IRGKTGDRLKINVVNALADKTMAVDTTIHWHGLFQKGTNWADGVAMVTQCPIIPGHSFLY
tr|A0A067NJL3|A0A067NJL3_PLEOS GRVGDTFKINVVNKLQDKTMPTSTSIHWHGLLQRGTNWADGPAFVTQCPIVPNEAFEYAF
tr|A0A067NLM3|A0A067NLM3_PLEOS KVQINTINELTDPGMRRSTSIHWHGLFQHKTSGMDGPSFVNQCPIPPNSTFLYDFDTAGQ
tr|A0A067NQH1|A0A067NQH1_PLEOS GDRFQINVVNKLADTSMPVDTSIHWHGLFVKGHNWADGPAMVTQCPIVPGHSFLYDFEVP
tr|A0A067NRU7|A0A067NRU7_PLEOS ETLTGVLVQGNKGDNFQLNVLNQLSDTTMLKTTSIHWHGFFQSGSTWADGPAFVNQCPIA
tr|A0A1S6YJE5|A0A1S6YJE5_PLEOS GDRFQINVVNKLADTSMPVDTSIHWHGLFVKGHNWADGPAMVTQCPIVPGHSFLYDFEVP
tr|A0A1S6YJF7|A0A1S6YJF7_PLEOS ATASIPGVLVQGNKGDNFQLNVVNQLSDTTMLKTTSIHWHGFFQAGSSWADGPAFVTQCP
tr|A0A288PWD5|A0A288PWD5_PLEOS LIRGFKGNRFRLNVINQLSDSSMLKTTSIHWHGFFQEGSSWADGPAFVTQCPIASGDSFL
tr|A0A8H6ZPX7|A0A8H6ZPX7_PLEOS KVQINTINELTDPGMRRSTSIHWHGLFQHKTSGMDGPSFVNQCPIPPNSTFLYDFDTAGQ
tr|A0A8H6ZU69|A0A8H6ZU69_PLEOS GRVGDTFKINVVNKLQDKTMPTSTSIHWHGLLQRGTNWADGPAFVTQCPIVPNEAFEYAF
tr|A0A8H6ZX29|A0A8H6ZX29_PLEOS GPLITGNKGDHFQINVIDELVDNSMLLDTSIHWHGFYQKGSNWADGKTIKFAILSSDERN
tr|A0A8H7DTH0|A0A8H7DTH0_PLEOS HFQLNVINELYDTTMNTDTSIHWHGILHHSTNYADGAAMVTQCPIVPNESFLYDFHVPDQ
tr|A0A8H7DUK0|A0A8H7DUK0_PLEOS LIRGFKGNRFRLNVINQLSDSSMLKTTSIHWHGFFQEGSSWADGPAFVTQCPIASGDSFL
tr|Q6STF0|Q6STF0_PLEOS ATVSIPGVLVQGNKGDNFQLNVVNQLSDTTMLKTTSIHWHGFFQAGSSWADGPAFVTQCP
tr|Q96TR4|Q96TR4_PLEOS KVQINTINELTDPGMRRSTSIHWHGLFQHKTSGMDGPSFVNQCPIPPNSTFLYDFDTAGQ
tr|S4VGX6|S4VGX6_PLEOS ASVSVPGVLVQGNKGDNFQLNVRNQLSDSTMLKTTSIHWHGFFQSGSTWADGPAFVNQCP
tr|A0A8H6ZYI6|A0A8H6ZYI6_PLEOS ETLTGVLVQGNKGDNFQLNVLNQLSDTTMLKTTSIHWHGFFQSGSTWADGPAFVNQCPIA
tr|B5MAF5|B5MAF5_PLEOS NPGVLIRGWKGNNFKLNVVNELTDTTMLKTTSIHWHGFFQAGTSWADGPAFVTQCPIAAG
tr|A0A067N7P7|A0A067N7P7_PLEOS GPLITGNKGDHFQINVIDELVDNSMLLDTSIHWHGFYQKGSNWADGPAFVTQCPIVPGDS
tr|A0A067NSZ9|A0A067NSZ9_PLEOS NPGVLIRGWKGNNFKLNVVNELTDTTMLKTTSIHWHGFFQAGTSWADGPAFVTQCPIAAG
tr|A0A8H7DTG5|A0A8H7DTG5_PLEOS GDRFQINVVNKLADTSMPVDTSIHWHGLFVKGHNWADGPAMVTQCPIVPGHSFLYDFEVP
1
sp|Q12739|LAC2_PLEOS
β6 β7 η3 β8 η4 η5
TT TT
130 140 150 160 170 180
sp|Q12739|LAC2_PLEOS VASGDSFLYNFNVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPFVVYDPSDPHLSLYDIDNADTVI
sp|Q12729|LAC1_PLEOS SGNSFLYDFNVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPFIVYDPSDPHLSLYDVDNADTIITL
tr|B5MAF4|B5MAF4_PLEOS PEQAGTFWYHAHYGTQYCDGLRGPFVIYDDCDPHKDLYDVDDESTVLTIGDWYHPTAEEL
tr|B7XGB7|B7XGB7_PLEOS VASGDSFLYNFNVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPFVVYDPSDPHLSLYDIDNADTVI
tr|C6L8E2|C6L8E2_PLEOS SGNSFLYDFNVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPFIVYDPSDPHLSLYDVDNADTIITL
tr|G3FGX5|G3FGX5_PLEOS ASGNSFLYDFNVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPFIVYDPSDPHLSLYDVDNADTVIT
tr|O60199|O60199_PLEOS DQAGTFWYHSHLGTQYCDGLRGPLVVYSKNDPHKRLYDVDDESTVLTVGDWYHAPSLSLT
tr|Q6RYA4|Q6RYA4_PLEOS SGNSFLYDFNVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPFIVYDPSDPHLSLYDVDNADTIITL
tr|A0A067NEP6|A0A067NEP6_PLEOS VASGDSFLYNFNVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPFVVYDPSDPHLSLYDIDNADTVI
tr|A0A067NGQ1|A0A067NGQ1_PLEOS PEQAGTFWYHAHYGTQYCDGLRGPFVIYDDCDPHKDLYDVDDESTVLTIGDWYHPTAEEL
tr|A0A067NH12|A0A067NH12_PLEOS DFRVPDQAGTFWYHSHLGTQYCDGLRGPLVIYSKNDPHKHLYDVDDESTVLTIGDWYHLP
tr|A0A067NJL3|A0A067NJL3_PLEOS KASHPGTFWYHSHLSTQYCDGARGPMVVYNPRDPYARFYDVDDSSTIITLEDWYHVPSLQ
tr|A0A067NLM3|A0A067NLM3_PLEOS TGNYWYHSHLSTQYCDGLRGSFIVYDPNDPLKHLYDVDDESTIITLADWYHDLAPHAQNQ
tr|A0A067NQH1|A0A067NQH1_PLEOS DQAGTFWYHSHLGTQYCDGLRGPLVVYSKNDPHKRLYDVDDESTVLTVGDWYHAPSLSLT
tr|A0A067NRU7|A0A067NRU7_PLEOS SGNSFLYDFNVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPFIVYDPSDPHLSLYDVDNADTIITL
tr|A0A1S6YJE5|A0A1S6YJE5_PLEOS DQAGTFWYHSHLGTQYCDGLRGPLVVYSKNDPHKRLYDVDDESTVLTVGDWYHAPSLSLT
tr|A0A1S6YJF7|A0A1S6YJF7_PLEOS VASGDSFLYNFNVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPFVVYDPSDPHLSLYDIDNADTVI
tr|A0A288PWD5|A0A288PWD5_PLEOS YDFRVPDQAGTFWYHAHLSTQYCDGLRGAFVVYDLLDPHRLRYLVDNDDTVITLADWYHT
tr|A0A8H6ZPX7|A0A8H6ZPX7_PLEOS TGNYWYHSHLSTQYCDGLRGSFIVYDPNDPLKHLYDVDDESTIITLADWYHDLAPHAQNQ
tr|A0A8H6ZU69|A0A8H6ZU69_PLEOS KASHPGTFWYHSHLSTQYCDGARGPMVVYNPRDPYARFYDVDDSSTIITLEDWYHVPSLQ
tr|A0A8H6ZX29|A0A8H6ZX29_PLEOS AGPAFVTQCPIVPGDSFLYSFSAPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGVFVVYDPEDPHRSL
tr|A0A8H7DTH0|A0A8H7DTH0_PLEOS AGTYWYHSHLHAQYCDGLRGPFIVYDPEDPHKDLYDVDDESTILTIGDWYHTPSTEASVP
tr|A0A8H7DUK0|A0A8H7DUK0_PLEOS YDFRVPDQAGTFWYHAHLSTQYCDGLRGAFVVYDLLDPHRLRYLVDNDDTVITLADWVRI
tr|Q6STF0|Q6STF0_PLEOS VASGDSFLYNFNVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPFVVYDSSDPHLSLYDIDNADTVI
tr|Q96TR4|Q96TR4_PLEOS TGNYWYHSHLSTQYCDGLRGSFIVYDPNDPLKHLYDVDDESTIITLADWYHDLAPHAQNQ
tr|S4VGX6|S4VGX6_PLEOS IAPGNSFLYDFNVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPFVVYDPSDPHLSLYDVDNADTVI
tr|A0A8H6ZYI6|A0A8H6ZYI6_PLEOS SGNSFLYDFNVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPFIVYDPSDPHLSLYDVDNADTIITL
tr|B5MAF5|B5MAF5_PLEOS NSFLYDFKVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGAFVVYDLFDPHRLRYDIDNADTVITLED
tr|A0A067N7P7|A0A067N7P7_PLEOS FLYSFSAPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGVFVVYDPEDPHRSLYDVDDEDTVITLADWY
tr|A0A067NSZ9|A0A067NSZ9_PLEOS NSFLYDFKVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGAFVVYDLFDPHRLRYDIDNADTVITLED
tr|A0A8H7DTG5|A0A8H7DTG5_PLEOS DQAGTFWYHSHLGTQYCDGLRGPLVVYSKNDPHKRLYDVDDESTVLTVGDWYHAPSLSLT
2


sp|Q12739|LAC2_PLEOS
η7 β20 η8 β21
310 320 330 340 350 360
sp|Q12739|LAC2_PLEOS
sp|Q12729|LAC1_PLEOS
tr|B5MAF4|B5MAF4_PLEOS
tr|B7XGB7|B7XGB7_PLEOS
tr|C6L8E2|C6L8E2_PLEOS
tr|G3FGX5|G3FGX5_PLEOS
tr|O60199|O60199_PLEOS
tr|Q6RYA4|Q6RYA4_PLEOS
tr|A0A067NEP6|A0A067NEP6_PLEOS
tr|A0A067NGQ1|A0A067NGQ1_PLEOS
tr|A0A067NH12|A0A067NH12_PLEOS
tr|A0A067NJL3|A0A067NJL3_PLEOS
tr|A0A067NLM3|A0A067NLM3_PLEOS
tr|A0A067NQH1|A0A067NQH1_PLEOS
tr|A0A067NRU7|A0A067NRU7_PLEOS
tr|A0A1S6YJE5|A0A1S6YJE5_PLEOS
tr|A0A1S6YJF7|A0A1S6YJF7_PLEOS
tr|A0A288PWD5|A0A288PWD5_PLEOS
tr|A0A8H6ZPX7|A0A8H6ZPX7_PLEOS
tr|A0A8H6ZU69|A0A8H6ZU69_PLEOS
tr|A0A8H6ZX29|A0A8H6ZX29_PLEOS
tr|A0A8H7DTH0|A0A8H7DTH0_PLEOS
tr|A0A8H7DUK0|A0A8H7DUK0_PLEOS
tr|Q6STF0|Q6STF0_PLEOS
tr|Q96TR4|Q96TR4_PLEOS
tr|S4VGX6|S4VGX6_PLEOS
tr|A0A8H6ZYI6|A0A8H6ZYI6_PLEOS
tr|B5MAF5|B5MAF5_PLEOS
tr|A0A067N7P7|A0A067N7P7_PLEOS
tr|A0A067NSZ9|A0A067NSZ9_PLEOS
tr|A0A8H7DTG5|A0A8H7DTG5_PLEOS

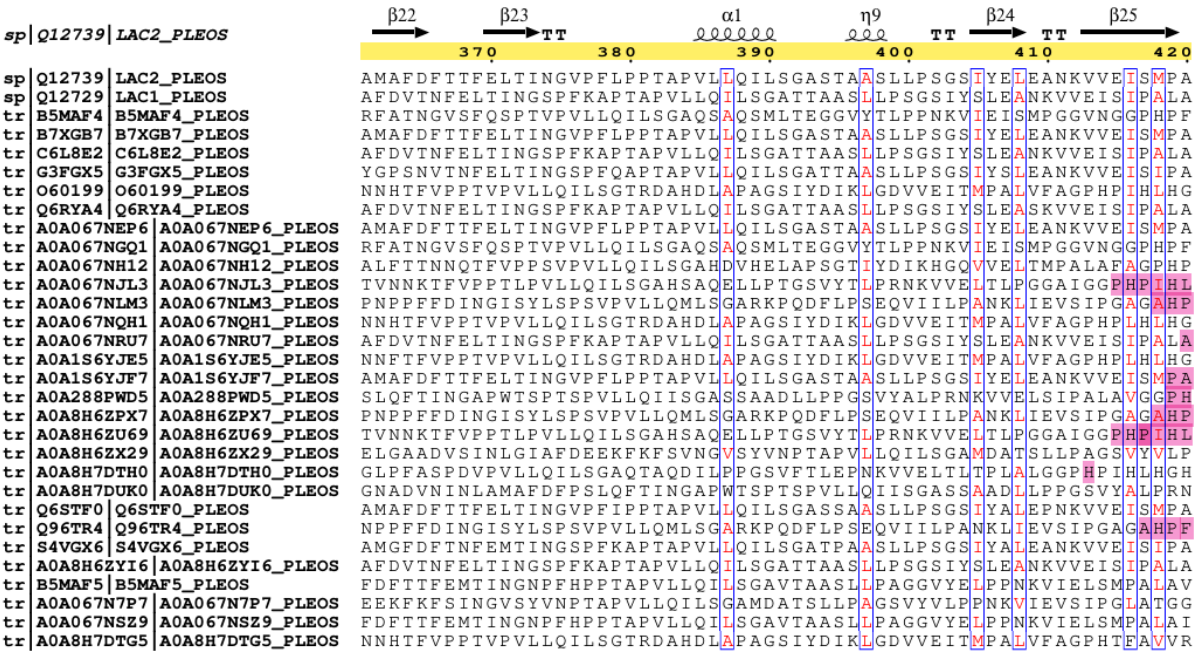

sp|Q12739|LAC2_PLEOS
β22 β23 α1 η9 β24 β25
370 380 390 400 410 420
sp|Q12739|LAC2_PLEOS
sp|Q12729|LAC1_PLEOS
tr|B5MAF4|B5MAF4_PLEOS
tr|B7XGB7|B7XGB7_PLEOS
tr|C6L8E2|C6L8E2_PLEOS
tr|G3FGX5|G3FGX5_PLEOS
tr|O60199|O60199_PLEOS
tr|Q6RYA4|Q6RYA4_PLEOS
tr|A0A067NEP6|A0A067NEP6_PLEOS
tr|A0A067NGQ1|A0A067NGQ1_PLEOS
tr|A0A067NH12|A0A067NH12_PLEOS
tr|A0A067NJL3|A0A067NJL3_PLEOS
tr|A0A067NLM3|A0A067NLM3_PLEOS
tr|A0A067NQH1|A0A067NQH1_PLEOS
tr|A0A067NRU7|A0A067NRU7_PLEOS
tr|A0A1S6YJE5|A0A1S6YJE5_PLEOS
tr|A0A1S6YJF7|A0A1S6YJF7_PLEOS
tr|A0A288PWD5|A0A288PWD5_PLEOS
tr|A0A8H6ZPX7|A0A8H6ZPX7_PLEOS
tr|A0A8H6ZU69|A0A8H6ZU69_PLEOS
tr|A0A8H6ZX29|A0A8H6ZX29_PLEOS
tr|A0A8H7DTH0|A0A8H7DTH0_PLEOS
tr|A0A8H7DUK0|A0A8H7DUK0_PLEOS
tr|Q6STF0|Q6STF0_PLEOS
tr|Q96TR4|Q96TR4_PLEOS
tr|S4VGX6|S4VGX6_PLEOS
tr|A0A8H6ZYI6|A0A8H6ZYI6_PLEOS
tr|B5MAF5|B5MAF5_PLEOS
tr|A0A067N7P7|A0A067N7P7_PLEOS
tr|A0A067NSZ9|A0A067NSZ9_PLEOS
tr|A0A8H7DTG5|A0A8H7DTG5_PLEOS

Figura 15. Alineamiento del dominio catalítico perteneciente a la familia de las cupredoxinas de las secuencias de lacasas registradas de *P. ostreatus.*

De igual forma, se registran los valores e-value obtenidos de la identificación de los tres dominios catalíticos de las lacasas de *P. ostreatus*.

Tabla 10. Valores de e-value obtenidos del programa NCBI Batch CD al realizar los alineamientos de la Figura 14.

Entrada	De	A	e-value	Nombre de domino
Q12739	355	355	2.19843e-81	CuRO_3_Tv-LCC_like
	178	322	2.00041e-77	Cupredoxin superfamily
	27	162	2.51477e-72	Cupredoxin superfamily
Q12729	3595	500	1.00432e-80	CuRO_3_Tv-LCC_like
	176	320	6.07483e-77	Cupredoxin superfamily
	27	160	1.0772e-72	Cupredoxin superfamily
B5MAF4	30	490	2.58638e-83	Ascorbase superfamily
B7XGB7	355	502	2.19843e-81	CuRO_3_Tv-LCC_like
	178	322	2.00041e-77	Cupredoxin superfamily
	27	162	2.51477e-72	Cupredoxin superfamily
C6L8E2	353	500	1.00432e-80	CuRO_3_Tv-LCC_like
	176	320	6.07483e-77	Cupredoxin superfamily
	27	160	1.0772e-72	Cupredoxin superfamily
G3FGX5	354	502	5.24491e-79	CuRO_3_Tv-LCC_like
	177	177	3.35747e-77	Cupredoxin superfamily
	26	26	2.19798e-71	Cupredoxin superfamily
O60199	37	491	1.61407e-82	Ascorbase superfamily
Q6RYA4	353	500	2.08453e-79	CuRO_3_Tv-LCC_like
	176	320	5.84952e-76	Cupredoxin superfamily
	27	160	1.17362e-72	Cupredoxin superfamily

A0A067NEP6	355	502	2.4746e-81	CuRO_3_Tv-LCC_like
	178	322	2.11072e-77	Cupredoxin superfamily
	27	162	3.18289e-72	Cupredoxin superfamily
A0A067NGQ1	30	490	2.58638e-83	Ascorbase superfamily
A0A067NH12	41	506	8.38552e-82	Ascorbase superfamily
A0A067NJL3	344	490	7.50353e-89	CuRO_3_Tv-LCC_like
	35	488	6.10881e-78	Ascorbase superfamily
A0A067NLM3	162	326	1.83268e-78	Cupredoxin superfamily
	22	146	2.18518e-69	Cupredoxin superfamily
	351	491	3.91647e-69	CuRO_3_Tv-LCC_like
A0A067NQH1	37	491	1.02608e-83	Ascorbase superfamily
A0A067NRU7	353	500	1.00432e-80	CuRO_3_Tv-LCC_like
	176	320	6.07483e-77	Cupredoxin superfamily
	27	160	1.0772e-72	Cupredoxin superfamily
A0A1S6YJE5	37	491	1.04905e-84	Ascorbase superfamily
A0A1S6YJF7	355	502	2.4746e-81	CuRO_3_Tv-LCC_like
	178	322	2.11072e-77	Cupredoxin superfamily
	27	162	3.18289e-72	Cupredoxin superfamily
A0A288PWD5	348	493	2.46393e-88	CuRO_3_Tv-LCC_like
	170	321	3.47783e-80	Cupredoxin superfamily
	32	154	1.7037e-69	Cupredoxin superfamily
A0A8H6ZPX7	162	326	1.97592e-78	Cupredoxin superfamily

	22	146	2.25648e-69	Cupredoxin superfamily
	351	491	4.26638e-69	CuRO_3_Tv-LCC_like
A0A8H6ZU69	344	490	7.50353e-89	CuRO_3_Tv-LCC_like
	35	488	6.10881e-78	Ascorbase superfamily
A0A8H6ZX29	366	502	3.57642e-80	CuRO_3_Tv-LCC_like
	188	337	5.1275e-79	Cupredoxin superfamily
	27	172	4.00251e-73	Cupredoxin superfamily
A0A8H7DTH0	162	308	8.33378e-74	Cupredoxin superfamily
	341	491	1.37669e-72	CuRO_3_Tv-LCC_like
	22	146	5.03344e-72	Cupredoxin superfamily
A0A8H7DUK0	364	509	3.15199e-88	CuRO_3_Tv-LCC_like
	170	337	2.85786e-76	Cupredoxin superfamily
	32	154	1.67573e-69	Cupredoxin superfamily
Q6STF0	355	502	7.17762e-81	CuRO_3_Tv-LCC_like
	178	322	1.96763e-76	Cupredoxin superfamily
	27	162	2.48798e-72	Cupredoxin superfamily
Q96TR4	162	325	2.80936e-80	Cupredoxin superfamily
	22	146	2.13314e-69	Cupredoxin superfamily
	350	490	4.16472e-69	CuRO_3_Tv-LCC_like
S4VGX6	178	329	8.0561e-80	Cupredoxin superfamily
	27	162	3.57608e-73	Cupredoxin superfamily

	355	494	4.28877e-72	CuRO_3_Tv-LCC_like
A0A8H6ZYI6	353	500	1.6293e-81	CuRO_1_Tv-LCC_like
	176	320	1.0962e-77	Cupredoxin superfamily
	27	160	4.5258e-73	CuRO_1_Tv-LCC_like
	658	772	4.48898e-12	CuRO_3_Tv-LCC_like
B5MAF5	352	498	1.91817e-79	CuRO_1_Tv-LCC_like
	174	326	5.20482e-78	Cupredoxin superfamily
	29	158	7.30243e-74	CuRO_3_Tv-LCC_like
A0A067N7P7	350	495	8.97602e-88	CuRO_1_Tv-LCC_like
	172	324	3.99294e-79	Cupredoxin superfamily
	27	156	7.11581e-77	CuRO_3_Tv-LCC_like
A0A067NSZ9	352	498	7.85937e-80	CuRO_1_Tv-LCC_like
	174	326	4.0222e-78	Cupredoxin superfamily
	29	158	7.07131e-74	CuRO_1_Tv-LCC_like
A0A8H7DTG5	311	311	9.21774e-77	Cupredoxin superfamily
	37	484	3.27978e-76	Ascorbase superfamily

Finalmente, el análisis *in silico* muestra la diversidad de secuencias de enzimas lignocelulolíticas encontradas en la base de datos UniProt que corresponden a *P. ostreatus*. Por otro lado, en el caso del hongo *H. erinaceus* la información fue insuficiente, ya que las secuencias reportadas son muy pocas y no son secuencias completas. Por lo tanto, es importante continuar con estudios que aporten información sobre sus propiedades catalíticas.

Determinación de la actividad enzimática de celulasas, xilanasas y lacasas a partir de sustrato agotado de los basidiomicetos *P. ostreatus* y *H. erinaceus*

Para la determinación de las actividades enzimáticas se obtuvo el extracto crudo enzimático a partir de los sustratos agotados, a los cuales se les determinó la cantidad de proteína. El contenido de proteína en el ECE del sustrato agotado de *P. ostreatus* fue de 45.4 mg de proteína/gSS, mientras que a partir de los sustratos agotados de *H. erinaceus* el contenido de proteína fue entre 4 y 20 veces menor al obtenido para *P. ostreatus* (ver Tabla 11).

Tabla 11. Cantidad de proteína en el ECE obtenido a partir de sustrato agotado de *P. ostreatus y H. erinaceus*. Los datos muestran los g de proteína/gSS, promedio de tres repeticiones ± la desviación estándar.

Sustrato evaluado	mg proteína/gSS	
	Lote 1	Lote 2
P. ostreatus		
PS1	45.47 ± 0.33	45.42 ± 0.29
H. erinaceus		
HS1	2.82 ± 0.04	2.96 ± 0.05
HS2	3.76 ± 0.32	3.44 ± 0.24
HS3	3.97 ± 0.28	8.32 ± 0.37
HS4	5.54 ± 0.39	7.45 ± 0.30
HS5	2.81 ± 0.25	3.54 ± 0.25

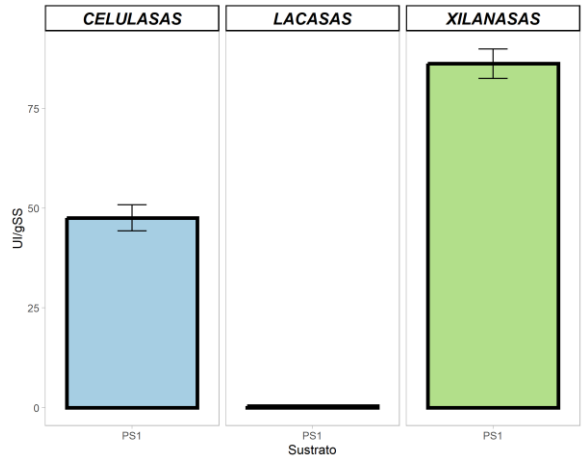
Actividad enzimática de enzimas lignocelulolíticas en *H. erinaceus* y *P. ostreatus*.

La determinación de la actividad lignocelulolítica producida por los hongos *H. erinaceus* y *P. ostreatus* (Figura 16) se reporta en UI/gss y en UI/mg de proteína. Las primeras unidades (UI/gss) nos permiten hacer una comparación con los datos reportados en la literatura, ya que la mayoría de los trabajos reportan la actividad enzimática en estas unidades evaluando

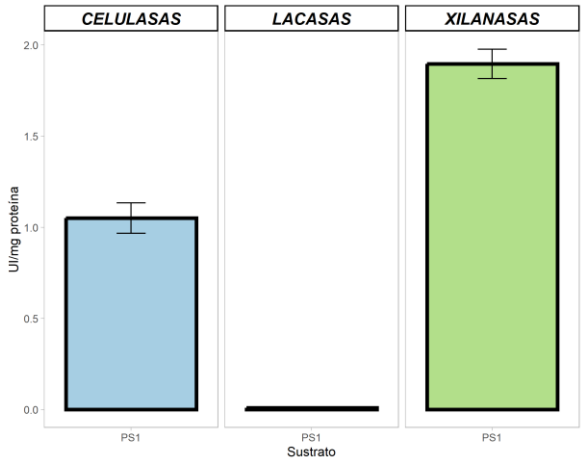
la actividad catalítica con respecto a diferentes residuos agrícolas como sustrato para el crecimiento de los hongos. Las segundas unidades (UI/mg de proteína) nos dan información de la actividad catalítica con respecto a la cantidad de proteína soluble que se obtuvo en el ECE y nos permite conocer de manera específica la actividad enzimática determinada.

La **Figura 16** muestra los datos obtenidos de la determinación de la actividad de celulasas, xilanasas y lacasas a partir del ECE obtenido de sustratos agotados de *P. ostreatus* y *H. erinaceus* reportados en UI/gSS y UI/mg proteína, en donde se observa que *H. erinaceus* presentó menor actividad enzimática lignocelulolítica, en comparación con *P. ostreatus*.

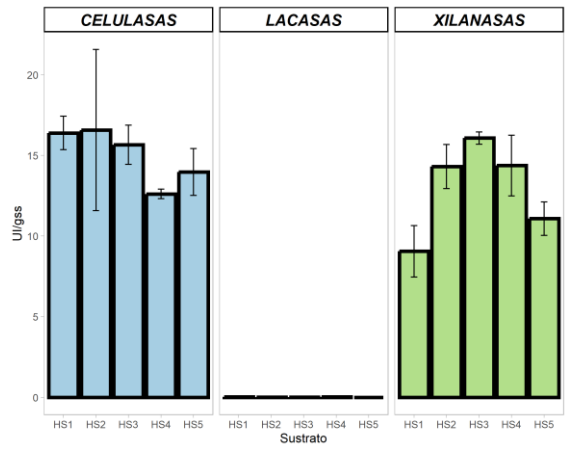
a)



b)



c)



d)

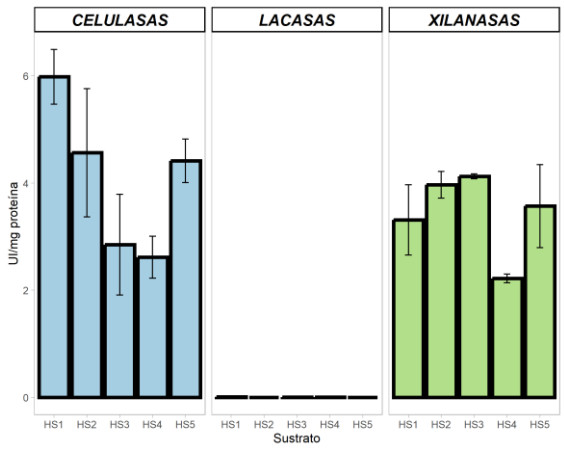


Figura 16. Actividad catalítica de enzimas lignocelulolíticas. a) Determinación de la actividad enzimática de celulasas, xilanasas y lacasas a partir de ECE de sustratos agotados de *P. ostreatus* en UI/gSS y b) Actividad enzimática *P. ostreatus* reportada en UI/mg proteína. c) Determinación de la actividad enzimática de celulasas, xilanasas y lacasas a partir de ECE de sustratos agotados de *H. erinaceus* en UI/gSS y d) Actividad enzimática *H. erinaceus* reportada en UI/mg proteína.

Con respecto a la determinación de la actividad enzimática en *P. ostreatus* (Tabla 12) las enzimas que reportaron mayores niveles de producción fueron las celulasas con 45.4 UI/gSS y las xilanasas con un promedio de 86.2 UI/gSS, mientras que las lacasas mostraron una producción de apenas 0.42 UI/gSS. No obstante, las cantidades reportadas en UI/mg proteína nos permiten observar de manera específica la cantidad de proteína que realmente tiene actividad lignocelulolítica, siendo de 1.06 UI/mg proteína para las celulasas, 1.93 UI/mg proteína para las xilanasas y 0.009 UI/mg proteína para las lacasas.

Tabla 12. Actividad de enzimas lignocelulolíticas (reportadas en UI/gSS y UI/mg proteína) determinadas a partir de ECE de sustrato agotado de *P. ostreatus*.

P. ostreatus				
Enzima	UI/gSS		UI/mg proteína	
	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2
Celulasas	45.47 ± 0.33	45.42 ± 0.29	1.06 ± 0.07	1.04 ± 0.09
Xilanasas	87.76 ± 2.62	84.64 ± 4.48	1.93 ± 0.06	1.86 ± 0.10
Lacasas	0.42 ± 0.04	0.41 ± 0.41	0.009 ± 0.0009	0.009 ± 0.0006

Nota: Se muestra el promedio de 3 repeticiones ± su desviación estándar. Para el análisis de los resultados se utilizó el programa RStudio (versión 2024.04.2.).

Por otro lado, las actividades enzimáticas de *H. erinaceus* fueron menores a las de *P. ostreatus.* En el caso de las celulasas, la producción llego hasta las 22.20 UI/gSS mientras que los datos reportados en UI/mg proteína fueron hasta 3 veces menores (Figura 17).

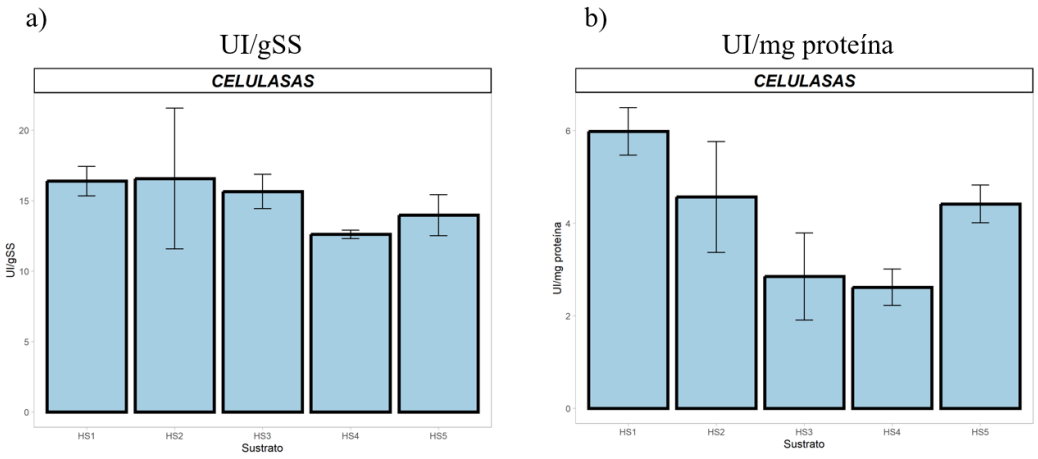


Figura 17. Determinación de celulasas producidas en el ECE de *H. erinaceus* reportadas en a) UI/gSS y b) UI/mg proteína.

Los datos obtenidos para celulasas tuvieron un comportamiento similar entre sustratos con una producción mayor con 22.20 UI/gSS y de 6.38 UI/mg proteína.

Tabla 13. Actividad de celulasas (reportadas en UI/gSS y UI/mg proteína) determinadas a partir de ECE de sustrato agotado de *H. erinaceus*.

H. erinaceus				
Sustrato evaluado	Celulasas			
	UI/gSS		UI/mg proteína	
	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2
HS1	15.61 ± 0.57	17.17 ± 0.74	5.54 ± 0.2	6.38 ± 0.27
HS2	21.04 ± 1.54	12.10 ± 0.08	5.60 ± 0.41	3.52 ± 0.02
HS3	14.62 ± 0.68	16.68 ± 0.17	3.68 ± 0.17	2.01 ± 0.02
HS4	12.61 ± 0.29	22.20 ± 0.46	2.28 ± 0.05	2.98 ± 0.06
HS5	12.99 ± 1.47	14.95 ± 0.46	4.62 ± 0.52	4.22 ± 0.13

Nota: Se muestra el promedio de 3 repeticiones ± su desviación estándar. Para el análisis de los resultados se utilizó el programa RStudio (versión 2024.04.2.).

La actividad de las xilanasas en el ECE de *H. erinaceus* fueron muy similares entre sustratos, pero aproximadamente 3 veces menores que los datos obtenidos en *P. ostreatus.*

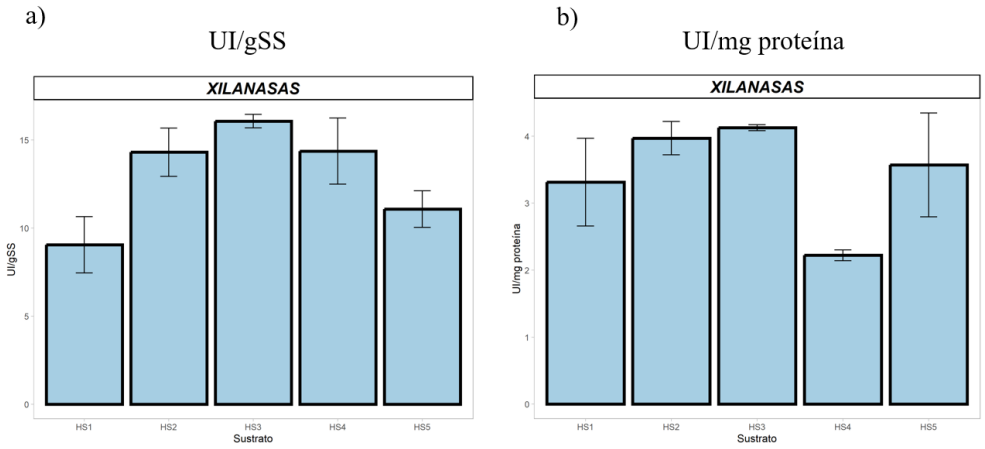


Figura 18. Determinación de xilanasas producidas en el ECE de *H. erinaceus* reportadas en a) UI/gSS y b) UI/mg proteína.

Al igual que las celulasas, las xilanasas demostraron un comportamiento similar entre sustratos con una producción mayor de 16.3 UI/gSS y de 4.13 UI/mg proteína.

Tabla 14. Actividad de xilanasas (reportadas en UI/gSS y UI/mg proteína) determinadas a partir de ECE de sustrato agotado de *H. erinaceus.*

H. erinaceus				
Sustrato evaluado	Xilanasas			
	UI/gSS		UI/mg proteína	
	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2
HS1	7.60 ± 0.29	10.50 ± 0.22	2.70 ± 0.10	3.90 ± 0.08
HS2	15.37 ± 0.17	13.25 ± 1.15	4.09 ± 0.04	3.85 ± 0.33
HS3	16.38 ± 0.18	15.76 ± 0.20	4.13 ± 0.05	1.89 ± 0.02
HS4	12.66 ± 0.34	16.07 ± 0.05	2.29 ± 0.06	2.16 ± 0.01
HS5	12.02 ± 0.09	10.13 ± 0.15	4.28 ± 0.03	2.86 ± 0.04

Nota: Se muestra el promedio de 3 repeticiones ± su desviación estándar. Para el análisis de los resultados se utilizó el programa RStudio (versión 2024.04.2.).

La actividad registrada de lacasas para ambas especies evaluadas fue baja, en comparación con las celulasas y xilanasas (Figura 16). Sin embargo, en el caso de *H. erinaceus* fue de 0.02 UI/gSS y 0.001 UI/mg proteína, es decir 2 veces menor a la obtenida para *P. ostreatus.*

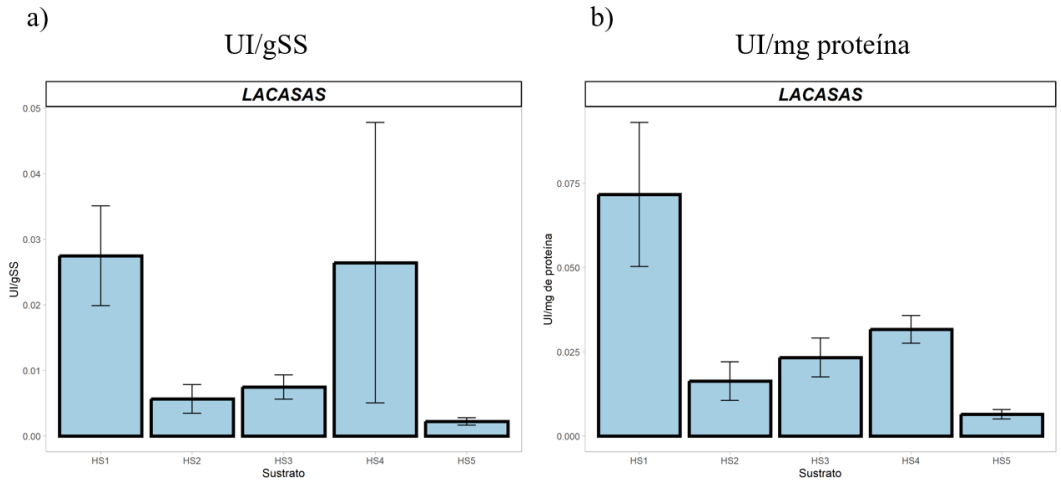


Figura 19. Determinación de lacasas producidas en el ECE de *H. erinaceus* reportadas en a) UI/gSS y b) UI/mg proteína.

Las lacasas tuvieron una producción mayor de 0.02 UI/gSS y de 0.001 UI/mg proteína.

Tabla 16. Actividad de lacasas (reportadas en UI/gSS y UI/mg proteína) determinadas a partir de ECE de sustrato agotado de *H. erinaceus.*

H. erinaceus				
Sustrato evaluado	Lacasas			
	UI/gSS		UI/mg proteína	
	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2
HS1	0.02 ± 0.008	0.02 ± 0.008	0.009 ± 0.003	0.01 ± 0.003
HS2	0.007 ± 0	0.004 ± 0.002	0.001 ± 0	0.001 ± 0.0005
HS3	0.007 ± 0.001	1.84 ± 0.2	0.001 ± 0.0004	0.22 ± 0.002
HS4	0.007 ± 0.001	0.04 ± 0.002	0.001 ± 0.0003	0.006 ± 0.0003
HS5	0.002 ± 0	0.001 ± 0.0006	0.0009 ± 0	0.0005 ± 0.0001

Nota: Se muestra el promedio de 3 repeticiones ± su desviación estándar. Para el análisis de los resultados se utilizó el programa RStudio (versión 2024.04.2.).

Nota 2: La reacción de las lacasas presentó variaciones en el tiempo de reacción dependiendo el sustrato evaluado, siendo 10 minutos el tiempo máximo de reacción, y <1 minuto el mínimo.

Discusión

La determinación de la actividad de enzimas lignocelulolíticas producidas en sustratos agotados de basidiomicetos ha sido un campo de estudio muy amplio. *P. ostreatus* es uno de los basidiomicetos más estudiados debido a las características catalíticas de las enzimas lignocelulolíticas que produce (Luz et al., 2012). Actualmente, son varios los basidiomicetos que han sido estudiados respecto a la producción de enzimas lignocelulolíticas en diferentes sustratos agrícolas, lo que impacta en la revalorización de estos sustratos como estrategia biotecnológica. Sin embargo, aún es insuficiente la información que relacione el tipo de sustrato a utilizar para inducir la producción de enzimas lignocelulolíticas, así como información sobre las características estructurales de estas enzimas.

Por otro lado, *H. erinaceus* es un basidiomiceto de gran importancia médica debido a la cantidad de metabolitos secundarios benéficos para salud (Bautista & Campos, 2024). Por tal motivo, la producción de *H. erinaceus* sobres sustratos agrícolas ha sido explorada en diversos trabajos (De Vega Luttmann 2021). Sin embargo, la producción y caracterización estructural de las enzimas lignocelulolíticas que produce este hongo ha sido pobremente explorada.

Como resultado del análisis *in silico* realizado en este trabajo, las enzimas lignocelulolíticas de *P. ostreatus* y *H. erinaceus* ofrecen un área de oportunidad para contribuir a la información depositada en bases de datos. En este contexto, en los resultados obtenidos a partir del análisis *in silico* se identifican dominios correspondientes a diversas familias de celobiohidrolasas y endoglucanasas.

Uno de los dominios identificados en las secuencias de las celulasas, fue el correspondiente a la familia GH7, la cual contiene tanto celobiohidrolasas (EC 3.2.1.176) como endoglucanasas (EC 3.2.1.4) (Payne et al., 2015).

Los dominios pertenecientes a la familia GH7, generalmente conservan tres aminoácidos, dos residuos de ácido glutámico que actúan como nucleófilo catalítico y un

ácido/base catalítico, adicional a un residuo de ácido aspártico auxiliar, fundamental para la actividad catalítica (Haataja et al., 2023). En las secuencias analizadas en la Figura 9, los residuos ácido glutámico y ácido aspártico (Glu y Asp) se conservan a lo largo del dominio catalítico, el cual inicia en la posición 52 con un ácido aspártico y termina en la posición 400 con un triptófano.

Para el caso de las xilanasas se identificaron dominios correspondientes a la familia GH10, que muestra actividades relativamente altas en xilooligosacáridos de cadena corta y producen productos más pequeños en comparación con las xilanasas de otras familias de glucósido hidrolasas, ya que en la mayoría de los casos no pueden escindir de manera eficiente la xilobiosa, que es el principal producto de degradación de su acción (Mendonça et al., 2023).

Las xilanasas tienen dos residuos de ácido glutámico los que actúan como residuos catalíticos esenciales. En diferentes trabajos han demostrado la importancia de estos residuos sobre la especificidad hacia diferentes sustratos como xilano (Solomon et al., 2007), lo que enfatiza su búsqueda dentro de los alineamientos múltiples realizados en este trabajo. Además del dominio catalítico de la familia GH10, algunas xilanasas tienen un dominio catalítico de la familia GH11 que presentan dos residuos de ácido glutámico en el sitio catalítico (Ishida et al., 2020).

En el caso de las lacasas, los dominios catalíticos identificados en las secuencias corresponden a la superfamilia de las cupredoxinas, las cuales contienen centros de cobre de tipo I y participan en reacciones de transferencia intermolecular de electrones. Aunque estas enzimas tienen diversas funciones, la mayoría de ellas tienen tres dominios de cupredoxina, que incluyen un centro de cobre mononuclear y uno trinuclear. En las secuencias capturadas en la Figura 15 se identifican dos sitios de unión a cobre de tipo 1 (identificado en color verde),

de tipo 3 (identificado en color rosa) y dentro de este último el dominio de unión a cobre trinuclear.

Como se mostró en los diferentes alineamientos, sólo para el caso de *P. ostreatus* se contó con suficiente información en las bases de datos para revisar la estructura primaria de las enzimas lignocelulolíticas que puede llegar a expresar y producir este hongo durante su crecimiento en diferentes sustratos. Sin embargo, esto no fue posible para el caso de *H. erinaceus* debido a que la información depositada en las bases de datos aún es limitada. Además, para llevar a cabo la identificación de la secuencia primaria de las proteínas presentes, a partir de diferentes extractos, es necesario contar con un sistema que nos permita extraer mayor cantidad de proteína y sobre todo de aquellas con la actividad catalítica de interés. Por lo que se requiere de más estudios que amplíen esta información, ya que tienen alto potencial para el diseño de enzimas con aplicaciones innovadoras y eficientes (Quiroz-Castañeda, 2011).

Respecto a la determinación de las actividades de enzimas lignocelulolíticas, se observa que la producción de estas enzimas es 3 veces mayor en *P. ostreatus* que en *H. erinaceus*, a pesar de esto se observó un factor común entre especies respecto a la producción de lacasas, la cual es mínima comparada con la producción de celulasas y xilanasas, y que estas a su vez muestran variabilidad en producción respecto a la formulación del sustrato en el que el hongo creció.

Iniciando con las celulasas, su producción fue similar en todos los sustratos, sin embargo, al ser reportados en UI/mg proteína se puede observar que el sustrato que tuvo mayor actividad de celulasas fue el HS1 con formulación 80% viruta de encino + 20% salvado de trigo y la menor producción fue en el sustrato HS4 con formulación 40% aserrín de pino + 40% paja de cebada + 20% hollejo de uva.

Continuando con las xilanasas, la producción de estas respecto al sustrato mostro poca variabilidad siendo el sustrato de mayor producción el HS3 con formulación 40% aserrín de pino + 40% paja de cebada + 20% salvado de trigo con 4.13 UI/gSS y 1.89 UI/mg de proteína. Mientras que el sustrato con menor producción de xilanasas fue el HS4 con formulación 40% aserrín de pino + 40% paja de cebada + 20% hollejo de uva.

Finalmente, las lacasas mostraron mayor actividad en el sustrato HS1 con 0.02 UI/gSS y 0.009 UI/mg proteína. En cuanto a la baja cantidad de enzimas producida por *H. erinaceus*, si bien son pocos los estudios relacionados, De Vega Luttmann (2021) reportó el comportamiento enzimático a través del tiempo (5 semanas contando desde su inoculación) teniendo la mayor actividad en sustrato con formulación de aserrín de pino y salvado de trigo, reportando 33.3 UI/gSS para celulasas, 1.2 UI/gSS para xilanasas y 17.4 UI/gSS para lacasas, mientras que la menor actividad la obtuvo en sustrato con formulación total de aserrín de pino, reportando 3.9 UI/gSS para celulasas, 3.2 UI/gSS para xilanasas y 1.0 UI/gSS para lacasas.

Estas diferencias podrían atribuirse al uso de sustratos agotados, que probablemente contienen diferentes cantidades de nutrientes disponibles. Esto sugiere que a pesar de la capacidad inherente de los basidiomicetos para sintetizar enzimas que puedan actuar sobre la biomasa lignocelulósica, es importante investigar no solo las interacciones de los microorganismos, también la composición del sustrato, su estado inicial y los tiempos de incubación son factores determinantes para maximizar la actividad enzimática, lo que enfatiza la importancia de optimizar estos parámetros según el objetivo del estudio.

En el estudio realizado por Valle-Pérez et al., (2023) se evaluó la interacción entre cepas fúngicas, y diversos parámetros inherentes a la muestra, demostrando estadísticamente que la cepa, el pH de fermentación, fuente de carbono (residuo agroindustrial) y periodo de fermentación son significantes respecto a la producción enzimática. Reportando como

parámetros ideales para las más altas actividades enzimáticas un periodo de fermentación de 24 - 48 hrs, pH de 6.4 para el caso de las celulasas y xilanasas.

Otro factor que se ha reportado favorece en una actividad más alta es el tipo de cultivo, resaltando la fermentación en estado sólido que favorece la interacción directa entre el hongo y el sustrato de crecimiento proporcionando condiciones adecuadas para el crecimiento de los hongos (Bentil, 2021). En contraste, Pilafidis et al., (2022) sugieren que el cultivo sumergido para los hongos, promete ser una alternativa más rápida, eficiente y consistente para la producción de bioactivos de hongos, señalando que es estrictamente controlado y monitoreado en el que un sustrato nutritivo líquido es convertido enzimáticamente.

Conclusiones

En este estudio se realizó un análisis estructural y funcional de enzimas lignocelulolíticas producidas por los hongos filamentosos *Hericium erinaceus* y *Pleurotus ostreatus*. La investigación combinó herramientas *in silico* con la evaluación de actividades catalíticas en extractos crudos enzimáticos (ECE) obtenidos de sustratos agotados.

El análisis bioinformático se realizó a partir de los datos colectados de la base de datos UniProt para conocer dominios catalíticos y funcionales presentes en celulasas, xilanasas y lacasas de ambos hongos. Mediante alineamientos de secuencias, se identificaron dominios catalíticos clave en familias de glicósido hidrolasas (GH), destacando las familias **GH7, GH9, GH12** y **GH45** en celulasas, y **GH10 y GH11** en xilanasas, junto con aminoácidos conservados en sus sitios activos.

En la evaluación funcional, se cuantificaron las actividades enzimáticas en ECE de sustratos agotados. *P. ostreatus* mostró mayor eficiencia, con actividades de **87.76 UI/gSS (xilanasas)** y **47.97 UI/gSS (celulasas)**, mientras que *H. erinaceus* presentó valores menores (**3.46 UI/gSS**

y 3.20 UI/gSS, respectivamente). Para lacasas, se registraron promedios de **0.43 UI/gSS** (*P. ostreatus*) y **0.03 UI/gSS** (*H. erinaceus*).

Los resultados muestran diferencias importantes en la capacidad lignocelulolítica entre ambas especies, posiblemente asociadas a mecanismos de regulación enzimática. Futuras investigaciones podrían explorar la dinámica temporal de producción de estas enzimas durante el crecimiento fúngico en diferentes sustratos y no solo en sustratos agotados, particularmente para el caso de *H. erinaceus*, y lograr elucidar su potencial en la degradación de biomasa.

Perspectivas

Realizar estudios genómicos, transcriptómicos y proteómicos para conocer la regulación en la expresión de enzimas lignocelulolíticas para *H. erinaceus* y otros basidiomicetos de interés que permitan aportar información en el diseño de nuevas y novedosas enzimas con óptimas características bioquímicas para el desarrollo de nuevas aplicaciones biotecnológicas y aumentar la eficiencia en la degradación de biomasa y/o bioconversión de residuos agrícolas.

Referencias

Acevedo Barajas, A. de J., García, R. M., & Morales Hernández, C. E. (2015). Aplicación de lacasas producidas por hongos para degradación de colorantes microbiológicos (Hematoxilina y azul de metileno). *2015*, *1*(2), 6. https://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/39

Aguirre-Acosta, E., Ulloa, M., Aguilar, S., Cifuentes, J., & Valenzuela, R. (2014). Biodiversidad de hongos en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, *85*, 76–81. https://doi.org/10.7550/rmb.33649

Alfaro Sánchez, M. (2017). *Genomic, transcriptomic and proteomic analysis of pleurotus ostratus secreted proteins*. Universidad Pública de Navarra.

Aza, P., & Camarero, S. (2023). Fungal Laccases: Fundamentals, Engineering and Classification Update. *Biomolecules*, *13*(12), 1716. https://doi.org/10.3390/biom13121716

Baldrian, P. (2006). Fungal laccases occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*, *30*(2), 215–242. https://doi.org/10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x

Bautista, L. R., & Campos, S. B. (2024). Potencial farmacológico y biotecnológico de Hericium erinaceus: Una revisión. Pädi Boletín Científico De Ciencias Básicas E Ingenierías Del ICBI *13*(25). https://doi.org/10.29057/icbi.v13i25.12796

Benatti, A. L. T., & Polizeli, M. D. L. T. D. M. (2023). Lignocellulolytic Biocatalysts: The Main Players Involved in Multiple Biotechnological Processes for Biomass Valorization. *Microorganisms*, *11*(1), 162. https://doi.org/10.3390/microorganisms11010162

Bentil, J. A. (2021). Biocatalytic potential of basidiomycetes: Relevance, challenges and research interventions in industrial processes. *Scientific African*, *11*, e00717. https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2021.e00717

Bermúdez-Savón, R. C., García-Oduardo, N., Aguilera-Rodríguez, I. A., & Mendoza-Montero, L. Y. (2022). *Biodegradación de residuos lignocelulósicos secundarios por Pleurotus spp*. Tecnología Química, 43(1), 157-172. Epub 25 de enero de 2023.

Bourbonnais, R., Leech, D., & Paice, M. G. (1998). Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1379*(3), 381–390. https://doi.org/10.1016/S0304-4165(97)00117-7

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. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3

Cárdenas, E. G. E. (2012). *Estudio de la generación de extractos enzimáticos con actividad celulolítica y ligninolítica, obtenidos durante la producción de los hongos pleurotus ostreatus 202 y 896 en rastrojo de maíz*. http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/5157

De Vega Luttmann, G. (2021). *Evaluación de la actividad enzimática de Hericium erinaceus en residuos agroforestales*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Deepalakshmi, K., & Mirunalini, S. (2014). *Pleurotus ostreatus: An oyster mushroom with nutritional and medicinal properties*. J Biochem Tech (2014) 5(2):718-726

Díaz Causil, Y. M. (2020). Determinación del contenido de azúcares, proteínas y nitrógeno presentes en medios de cultivos modificados para el crecimiento *in vitro* del hongo *Colletotrichum sp* fitopatogeno del ñame *(Dioscórea alata)* en montería-córdoba. Universidad de Córdoba Facultad de Ciencias Básicas.

Drula, E., Garron, M.-L., Dogan, S., Lombard, V., Henrissat, B., & Terrapon, N. (2022). The carbohydrate-active enzyme database: Functions and literature. *Nucleic Acids Research*, *50*(D1), D571–D577. https://doi.org/10.1093/nar/gkab1045

Ejaz, U., Sohail, M., & Ghanemi, A. (2021). Cellulases: From Bioactivity to a Variety of Industrial Applications. *Biomimetics*, *6*(3), 44. https://doi.org/10.3390/biomimetics6030044

Fernández-Fueyo, E., Ruiz-Dueñas, F. J., López-Lucendo, M. F., Pérez-Boada, M., Rencoret, J., Gutiérrez, A., Pisabarro, A. G., Ramírez, L., & Martínez, A. T. (2016). A secretomic view of woody and nonwoody lignocellulose degradation by Pleurotus ostreatus. *Biotechnology for Biofuels*, *9*(1), 49. https://doi.org/10.1186/s13068-016-0462-9

Funes, D. (2019). *1. Medicina. 2. Infecciones Bacterianas y Micosis. 3. Micosis. I. Riera, Fernando, comp. II. Título. CDD 616.969*.

Gomori, G. (1955). Preparation of buffers for use in enzyme studies. En *Methods in Enzymology* (Vol. 1, pp. 138–146).

Gutiérrez-Rojas, I., Moreno-Sarmiento, N., & Montoya, D. (2015). Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: Casos clásicos y nuevos modelos. *Revista Iberoamericana de Micología*, *32*(1), 1–12. https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.10.009

Haataja, T., Gado, J. E., Nutt, A., Anderson, N. T., Nilsson, M., Momeni, M. H., Isaksson, R., Väljamäe, P., Johansson, G., Payne, C. M., & Ståhlberg, J. (2023). Enzyme kinetics by GH7 cellobiohydrolases on chromogenic substrates is dictated by non-productive binding: Insights from crystal structures and MD simulation. *The FEBS Journal*, *290*(2), 379–399. https://doi.org/10.1111/febs.16602

Heredia-Abarca, G. P. (2020). La importancia de los hongos (Fungi) en los servicios ecosistémicos. *Bioagrociencias*, *13*(2). https://doi.org/10.56369/BAC.3575

Hüttner, S., Granchi, Z., Nguyen, T. T., Van Pelt, S., Larsbrink, J., Thanh, V. N., & Olsson, L. (2018). Genome sequence of Rhizomucor pusillus FCH 5.7, a thermophilic zygomycete involved in plant biomass degradation harbouring putative GH9 endoglucanases. *Biotechnology Reports*, *20*, e00279. https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00279

Ishida, T., Parks, J. M., & Smith, J. C. (2020). Insight into the Catalytic Mechanism of GH11 Xylanase: Computational Analysis of Substrate Distortion Based on a Neutron Structure. *Journal of the American Chemical Society*, *142*(42), 17966–17980. https://doi.org/10.1021/jacs.0c02148

Israilides, C., & Philippoussis, A. (2003). Bio-technologies of Recycling Agro-industrial Wastes for the Production of Commercially Important Fungal Polysaccharides and Mushrooms. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, *20*(1), 247–260. https://doi.org/10.1080/02648725.2003.10648045

J. Enguita, F. (2011). Structural Biology of Fungal Multicopper Oxidases. En A. Lúcia Leitão (Ed.), *Mycofactories* (pp. 57–72). BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS. https://doi.org/10.2174/978160805223311101010057

Kirk, O., Borchert, T. V., & Fuglsang, C. C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, *13*(4), 345–351. https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00328-2

Kurt, S., & Buyukalaca, S. (2010). Yield performances and changes in enzyme activities of Pleurotus spp. (P. ostreatus and P. sajor-caju) cultivated on different agricultural wastes. *Bioresource Technology*, *101*(9), 3164–3169. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.011

Lange, J. (2007). Lignocellulose conversion: An introduction to chemistry, process and economics. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, *1*(1), 39–48. https://doi.org/10.1002/bbb.7

Luz, J. M. R. D., Nunes, M. D., Paes, S. A., Torres, D. P., Silva, M. D. C. S. D., & Kasuya, M. C. M. (2012). Lignocellulolytic enzyme production of Pleurotus ostreatus growth in agroindustrial wastes. *Brazilian Journal of Microbiology*, *43*(4), 1508–1515. https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000400035

Estefany Sánchez Maldonado. (2022). *Actividad enzimática extracelular de lacasas y algunas hidrolasas de Hericium erinaceus en cultivo sólido*. Universidad Autonoma del Estado de Morelos.

Membrillo, I., Sánchez, C., Meneses, M., Favela, E., & Loera, O. (2008). Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by Pleurotus ostreatus strains. *Bioresource Technology*, *99*(16), 7842–7847. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.01.083

Mendonça, M., Barroca, M., & Collins, T. (2023). Endo-1,4-β-xylanase-containing glycoside hydrolase families: Characteristics, singularities and similarities. *Biotechnology Advances*, *65*, 108148. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108148

Miller, G. L. (1959). *Use of DinitrosaIicyIic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar*.

Panchapakesan, A., & Shankar, N. (2016). *Chapter 2—Fungal Cellulases: An Overview*. En V. K. Gupta (Ed.), New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering (pp. 9–18). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63507-5.00002-2

Payne, C. M., Knott, B. C., Mayes, H. B., Hansson, H., Himmel, M. E., Sandgren, M., Ståhlberg, J., & Beckham, G. T. (2015). *Fungal Cellulases*. Chemical Reviews, 115(3), 1308–1448. https://doi.org/10.1021/cr500351c

Peláez-Acero, A., Meneses-Mayo, M., Miranda-Romero, L. A., Ayala-Martínez, M., Crosby-Galván, M. M., Loera-Corral, O., & Megías-Rivas, M. D. (2011). *Enzimas fibrolíticas producidas por fermentación en estado sólido para mejorar los ensilajes de caña de azúcar*. Agrociencia, 45(6), 675-685.

Pilafidis, S., Diamantopoulou, P., Gkatzionis, K., & Sarris, D. (2022). *Valorization of Agro-Industrial Wastes and Residues through the Production of Bioactive Compounds by Macrofungi in Liquid State Cultures: Growing Circular Economy*. Applied Sciences, 12(22), 11426. https://doi.org/10.3390/app122211426

Ping, L., Wang, M., Yuan, X., Cui, F., Huang, D., Sun, W., Zou, B., Huo, S., & Wang, H. (2018). *Production and characterization of a novel acidophilic and thermostable xylanase from Thermoascus aurantiacu*. International Journal of Biological Macromolecules, 109, 1270–1279. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.130

Polizeli, M. L. T. M., Rizzatti, A. C. S., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., & Amorim, D. S. (2005). *Xylanases from fungi: Properties and industrial applications.* Applied Microbiology and Biotechnology, 67(5), 577–591. https://doi.org/10.1007/s00253-005-1904-7

Quiroz-Castañeda, R. E. (2011). *Plant cell wall degrading and remodeling proteins: Current perspectives*. Biotecnología Aplicada 2011; Vol.28, No.4

Rivera-Hoyos, C. M., Morales-Álvarez, E. D., Poutou-Piñales, R. A., Pedroza-Rodríguez, A. M., RodrÍguez-Vázquez, R., & Delgado-Boada, J. M. (2013). *Fungal laccases*. *Fungal Biology Reviews*, *27*(3–4), 67–82. https://doi.org/10.1016/j.fbr.2013.07.001

Saha, B. C., & Hayashi, K. (2004). *Lignocellulose Biodegradation and Applications in Biotechnology*

Sahay, R. (2020). *Fungal laccase mediator and its biocatalytic potential applications: A review*. Biotecnol Apl. 2021;38(1):1101-1109.

Sajith, S., Sreedevi, & Benjamin. (2016). *An Overview on Fungal Cellulases with an Industrial Perspective*. Journal of Nutrition & Food Sciences, *06*(01). https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000461

Sánchez, C. (2009). *Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi*. Biotechnology Advances, *27*(2), 185–194. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.001

Sánchez-Ramírez, J., Martínez-Hernández, J. L., Segura-Ceniceros, E. P., Contreras-Esquivel, J. C., Medina-Morales, M. A., Aguilar, C. N., & Iliná, A. (2014). *Immobilization of lignocellulolytic enzymes in magnetic nanoparticles.* Química Nova, 37(3). https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140085

Schmidt, A., Kratky, C., Schlacher, A., Schwab, H., & Steiner, W. (1998). Structure of the xylanase from *Penicillium simplicissimum*. *Protein Science*, *7*(10), 2081–2088. https://doi.org/10.1002/pro.5560071004

Schwarze, F. W. M. R. (2007). *Wood decay under the microscope.* Fungal Biology Reviews, 21(4), 133–170. https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.09.001

Sergentani, A. G., Gonou-Zagou, Z., Kapsanaki-Gotsi, E., & Hatzinikolaou, D. G. (2016). *Lignocellulose degradation potential of Basidiomycota from Thrace (NE Greece)*. International Biodeterioration & Biodegradation, 114, 268–277. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.07.004

Solomon, V., Teplitsky, A., Shulami, S., Zolotnitsky, G., Shoham, Y., & Shoham, G. (2007). *Structure–specificity relationships of an intracellular xylanase from Geobacillus stearothermophilus.* Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography, 63(8), 845–859. https://doi.org/10.1107/S0907444907024845

Valle-Pérez, A. U., Gómez-Angulo, J. H., Flores-Cosío, G., & Amaya-Delgado, L. (2023). *Interaction of Fungal Strains, Biomass, and pH to Produce Lignocellulosic Enzymes in Solid-State Fermentation for Sustainable Biotransformation of Sugarcane and Agave Bagasse. BioEnergy Research*, *17*(2), 1015–1028. https://doi.org/10.1007/s12155-023-10695-3

Anexo 1

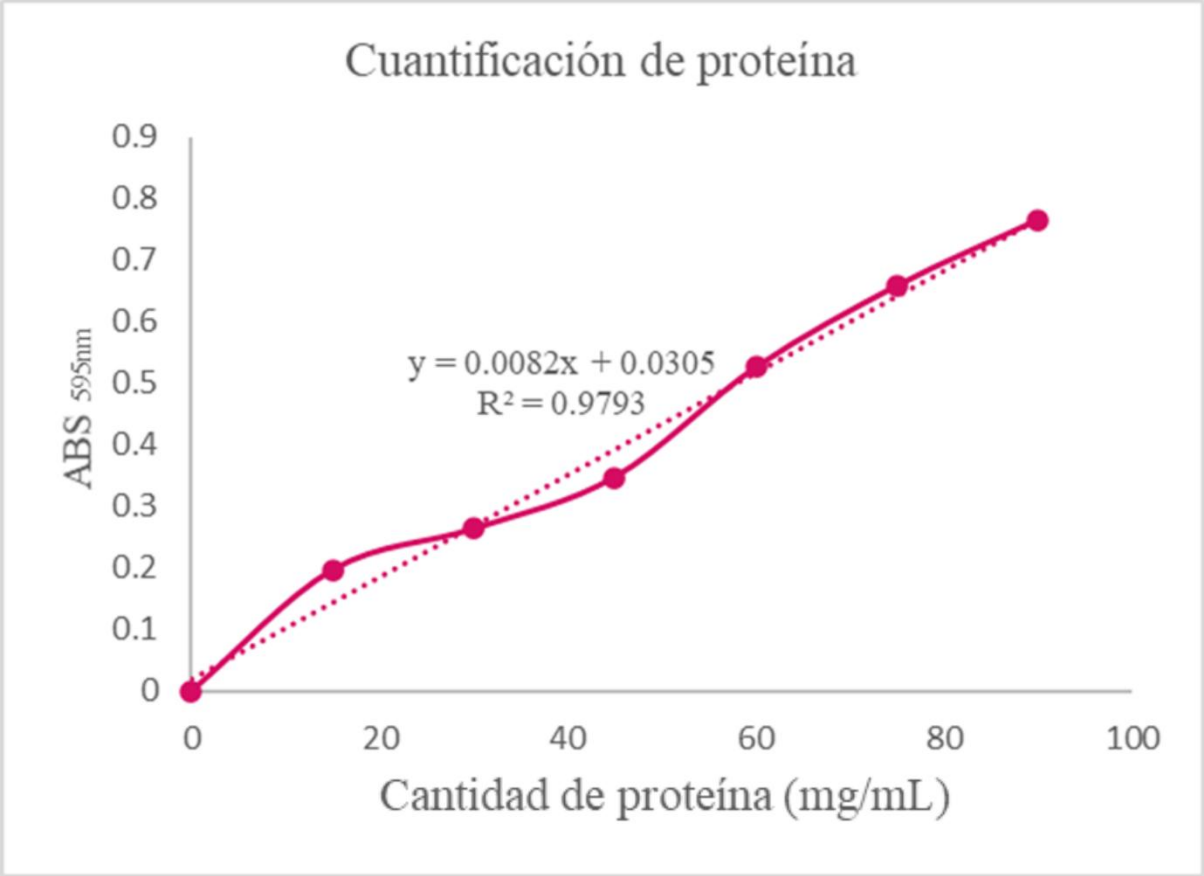
Tabla 1

Elaboración de la curva estándar para la cuantificación de proteínas por método de Bradford.

Cantidad de proteína mg	0	15	30	45	60	75	90
Buffer citrato (µl)	800	770	740	710	680	650	620
Solución de albúmina de huevo 1 mg/mL (µl)	0	30	60	90	120	150	180
Bradford (µl)	200	200	200	200	200	200	200
Agua (µl)				1000			

Nota. El formato muestra el orden de adición. Se adicionaron 1000 µL de agua esterilizada para lograr que el volumen en la celda de acrílico fuera suficiente a la hora de la lectura en el espectrofotómetro.

El método de Bradford, se basa en la unión del colorante, Comassie Blue G-250 (también Serva Blue) a las proteínas, formando un color azul al formar el complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre. Este método es sensible (1-15 µg), rápido y pocas sustancias interfieren en su determinación.



Gráfica 1. Curva estándar para la determinación de proteínas, en donde la gráfica representa el promedio de los respectivos triplicados.

Anexo 2

Tabla 2. Curva estándar de xilanasas y celulasas por método de determinación de azúcares reductores utilizando DNS.

Cantidad de proteína µg	0	40	80	120	160	200	240	280	320
Buffer citrato (µL)	950	948	946	944	942	940	938	936	934
Solución dextrosa 50mM (µL)	0	2	4	6	8	10	12	14	16
ECE desnaturalizado (µL)					50				
DNS (µL)					1500				

El método de azúcares reductores, es una técnica colorimétrica que se basa en una reacción redox, ocurrida entre el DNS y los azúcares reductores presentes en la muestra, seguido de la determinación espectrofotométrica a 540nm de los azúcares reductores. El método se basa principalmente en la reducción del DNS (de color amarillo) por la glucosa u otro azúcar reductor al ácido 3-amino-5- nitrosalicílico (de color rojo ladrillo) (Díaz Causil, 2020).

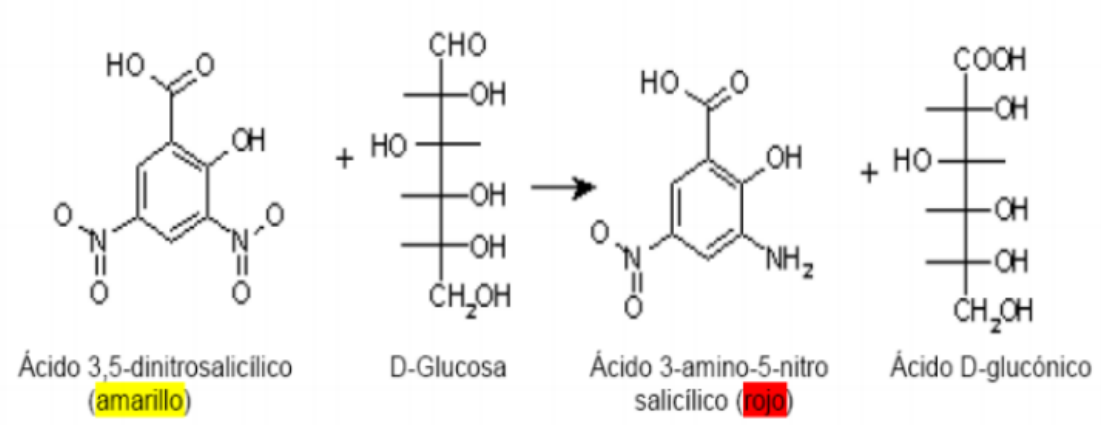
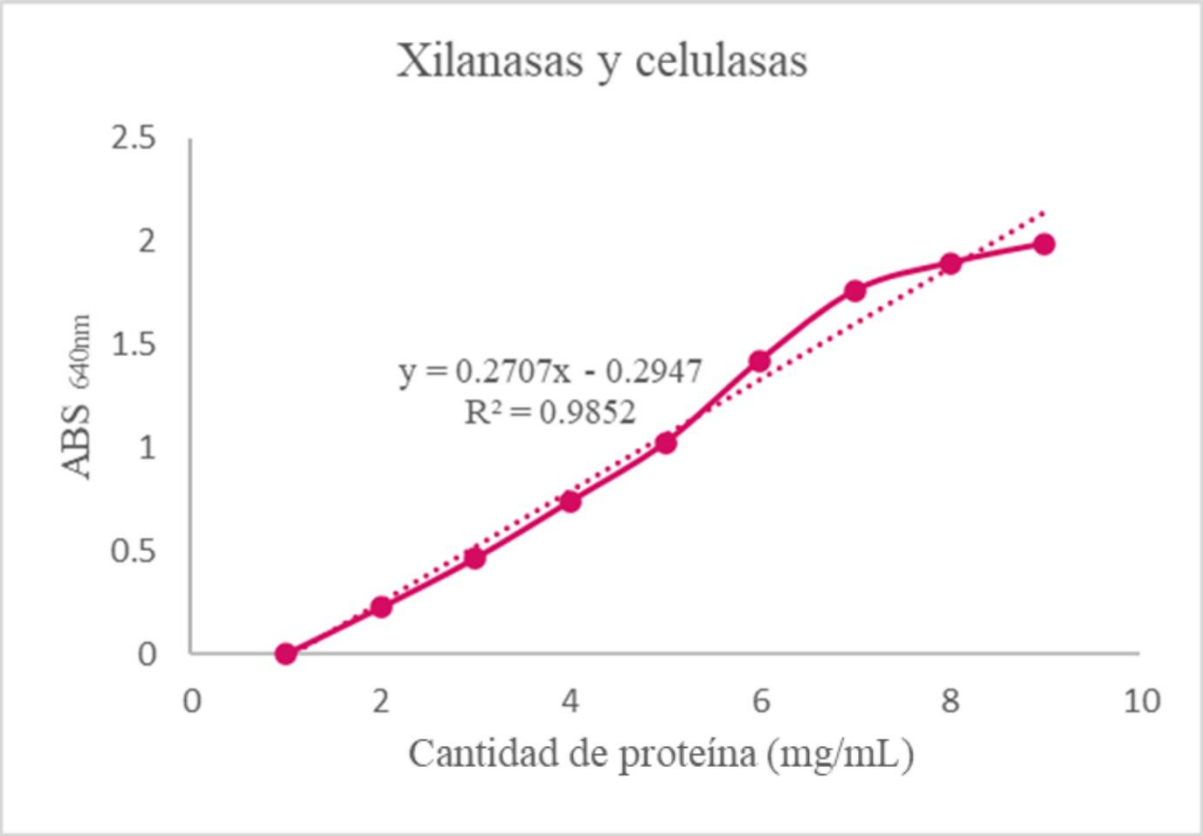


Figura 1. Conversión de los azúcares reductores mediante DNS.



Gráfica 2. Curva estándar de xilanasas y celulasas. En donde la gráfica representa el promedio de los respectivos triplicados.