



EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CICLOHEXANONA MONOOXIGENASA EN CEPAS DE HONGOS FILAMENTOSOS Y LEVADURAS

*Juan P. Apaza; ^a Georgina Chávez; ^b Christian Espinal; ^a Ma. Teresa Álvarez; ^a Enrique Terrazas ^a (f)

^aÁrea de biotecnología, Instituto de Investigaciones Fármaco - Bioquímicas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés, Av. Saavedra 2224. La Paz, Bolivia; ^bInstituto de Investigaciones en Productos Naturales (IIPN), Carrera de Ciencias Químicas, Universidad Mayor de San Andrés, Calle Andrés Bello y Calle 27 Cota - Cota, Edificio FCPN, 2° piso, La Paz, Bolivia.

Keywords: *Cyclohexanone monooxygenase, fungal microorganisms, lactone.*

ABSTRACT

Cyclohexanone monooxygenase (CHMO) catalyzes the oxygenation of linear or cyclic ketone, thereby producing the corresponding lactones, these lactones on an industrial level are obtained by chemical synthesis. Instead, the biotransformation has the advantage of being highly enantioselective and regio-selective giving pure products of high value, and contribute to the development of processes environmentally friendly. CHMO activity was assessed 90 fungal strains which were divided into two groups: 85 strains of filamentous fungi were obtained from the culture collection of Biochemical Drug Research Institute (IIFB) and 5 strains of yeasts isolated from soil contaminated with oil. Three methods were employed CHMO screening for: (i) by means of the qualitative evaluation by pH change (color change indicator) identified three strains with potential enzymatic activity, which was observed for the strain introduced QD 177 a consumption of 41 mM to 30 hour period, by (ii) colorimetric assay for determination of cyclic ketones, and subsequently the enzyme activity was measured by the (iii) spectrophotometric monitoring depletion of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), which gave an activity of 90 IU / L. We proceeded to identify the most active strain by macroscopic and microscopic characteristics, which relate to *Aspergillus flavus*.

*Corresponding author: bio_juancho@hotmail.com

RESUMEN

Ciclohexanona monooxigenasa (CHMO) cataliza la oxigenación de cetonas lineales o cetonas cíclicas, produciendo así sus correspondientes lactonas, estas lactonas a nivel industrial son obtenidas por síntesis química. En cambio, la biotransformación tiene la ventaja de ser altamente enantio y regio selectivas dando productos puros de alto valor, además de contribuir al desarrollo de procesos amigables con el medio ambiente. Se evaluó la actividad CHMO de 90 cepas fúngicas las cuales fueron divididas en dos grupos: 85 cepas de hongos filamentosos que fueron obtenidas del cepario del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB) y 5 cepas de levaduras aisladas de tierras contaminadas con petróleo. Tres métodos de screening para CHMO fueron empleados: (i) por medio de la evaluación cualitativa por cambio de pH (viraje de color del indicador), se identificaron 3 cepas con potencial actividad enzimática, de las cuales se observó que la cepa 177 QD presentó un consumo de 41 mM al lapso de 30 horas, (ii) mediante ensayo colorimétrico para determinación de cetonas cíclicas; posteriormente se midió la actividad enzimática (iii) mediante la monitorización espectrofotométrica de la depleción de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), la cual dio una actividad de 90 UI/L. Se procedió a identificar la cepa más activa mediante sus características macroscópicas y microscópicas, que la relacionan con *Aspergillus flavus*.

INTRODUCCION

La búsqueda de microorganismos que lleven adelante la transformación enzimática (bio-transformación) de moléculas de interés industrial, llama la atención de muchos investigadores, porque los procesos mediados por éstos microorganismos no son nocivos para el medio ambiente y los productos obtenidos son biodegradables. Los mohos (hongos filamentosos) y levaduras, constituyen una clase de microorganismos de gran importancia comercial, porque

sintetizan gran cantidad de enzimas como Oxido/reductasas, (peroxidasa, lacasa); hidrolíticas (quitinasa, celulasa, pectinasa) (1). Estos son microorganismos eucariotas que pueden metabolizar los compuestos xenobioticos por medio del citocromo P450 y otras enzimas, como por ejemplo las Baeyer Villiger Monoxygenasas (BVMO). La producción de enzimas en nuestro medio viene desarrollándose por los métodos de la biotecnología clásica, la cual presenta dos etapas principales: la de fermentación; etapa en la cual el microorganismo se multiplica para concentrar la enzima y, la etapa de recuperación y purificación, en la que se aísla la enzima y se lleva al grado de pureza adecuado para su uso, este último en plena proyección en nuestro país, cuyo pionero es el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB) desde el año 1999. La figura 1, muestra la ruta metabólica en condiciones aerobias y anaerobias del metabolismo que realiza el microorganismo en presencia de ciclohexanona, que es precursor central de varias moléculas de uso industrial, como: ϵ -caprolactona y ácido adípico. Desde otra perspectiva, tenemos la biorremediación de aguas contaminadas con compuestos aromaticos como el fenol y catecol. Sabiendo que los derivados de fenol se usan como desinfectantes, antisépticos, fungicidas e insecticidas; las cuales no son tratadas adecuadamente al momento de su desecho, ya que son eliminados directamente a los drenajes contaminando las aguas. Los fenoles como los cresoles, actúan precipitando proteínas, de donde se deduce su poder germicida y su toxicidad (2).

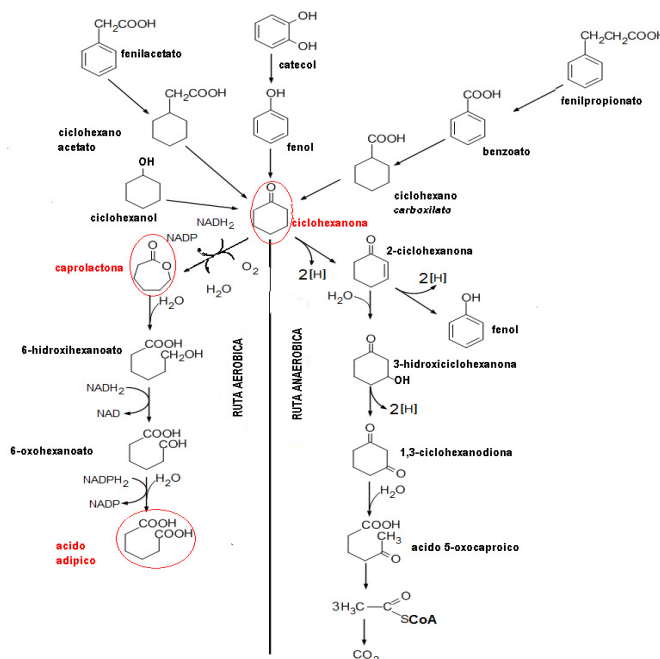


Figura 1.- Ciclohexanona como metabolito intermediario, en el metabolismo anaeróbico y aeróbico de compuestos cíclicos en los microorganismos (10).

La reacción de Baeyer-Villiger (BV) es un proceso muy conocido que consiste en la transformación de cetonas en ésteres o lactonas, el interés en la reacción se debe a que las enzimas que catalizan este proceso, son capaces de reconocer una gran variedad de sustratos, teniendo selectividad y especificidad sobre el grupo carbonilo, estas enzimas utilizan oxígeno molecular para mediar la oxigenación nucleofílica de las cetonas lineales o cetonas cíclicas, obteniendo sus correspondientes lactonas como se puede observar en la figura 2.

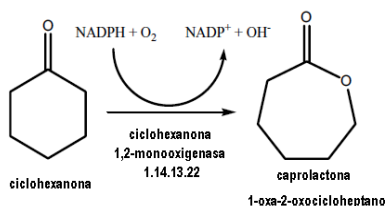


Figura 2. Conversión enzimática de ciclohexanona a caprolactona.

Este proceso es de interés industrial porque el producto formado es ampliamente utilizado en la síntesis de policaprolactona (PCL) el cual es material biodegradable, que puede ser utilizado en la síntesis de bioplástico, material quirúrgico, nanocápsulas. Esta última como vehículo de administración de ciertos principios activos contra el cáncer (3). Uno de los mayores problemas en estos tiempos, es por una parte la contaminación producida por el ser humano, porque todo proceso de la vida cotidiana lleva consigo la generación de basura, que puede ser orgánica o inorgánica, siendo la segunda una enfermedad silenciosa que daña al medio ambiente. En un segundo plano aun más nocivo es el empleo de agentes químicos los cuales son utilizados en la producción de muchos materiales, en especial el plástico (4). Debemos recordar que los procesos industriales de producción en general no deben ser agresivos con el medio ambiente, por otro lado se debe buscar que sean ventajosos desde el punto de vista de los costos de operación (5). De modo que tenemos la necesidad de paliar el incrementado del uso de agentes químicos por medio de la denomina “química verde” que evitaría erosionar los suelos, contaminar las aguas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Acondicionamiento de las cepas de hongos filamentosos y levaduras para el análisis de actividad CHMO.

Tras el sembrado en medio Caldo Papa Dextrosa (CPD), se reveló que las cepas se encontraban totalmente libres de contaminación, sin embargo no se encontraban en condiciones de ser sometidas a evaluación enzimática por la baja concentración de propágulos. Se logró aislar 5 cepas de levaduras, procedentes de muestras de tierras contaminadas con petróleo. La evaluación de la actividad debe ser realizada con una concentración de $2,6 \times 10^3$ prop/mℓ, este valor equivale a una densidad óptica (DO) de 0,6 (6), el cual conserva la linealidad requerida para la evaluación de la actividad (7). Observaciones realizadas muestran que concentraciones bajas ó altas de propágulos muestran resultados con muy poca reproducibilidad de la prueba, aconsejando una concentración intermedia de 2×10^3 prop/mℓ (8).

Análisis cualitativo por viraje de indicador.

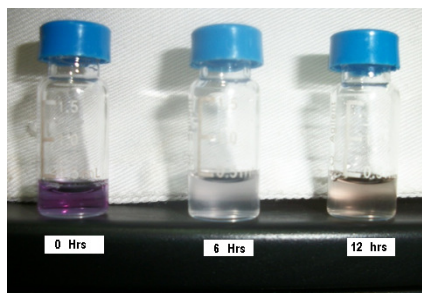
En la Tabla 1 se muestra que sólo 1 de 85 hongos filamentosos y 2 de 5 levaduras presentaron actividad CHMO.

Tabla 1. Evaluación de la actividad CHMO en cepas fúngica

Microorganismos	Negativos	Positivos	Código
Hongos Filamentosos	84	1	177 QD
Levaduras	3	2	7 QJR 14 QJR
Total	87	3	

En la figura 3 podemos observar el viraje de color del indicador a tres diferentes tiempos, de una de las muestras sometidas al ensayo.

Figura 3. Análisis cualitativo basado en el viraje de púrpura de bromocresol para la detección de productos ácidos, debido a la actividad CHMO en la cepa 177QD



El mecanismo por el cual la enzima lleva su acción sobre su sustrato (Figura 2) y la ruta de asimilación (Figura 1), son puntos clave para aseverar que si existe la presencia de actividad monooxigenasa por la formación de compuestos de carácter ácido (9). Se puede llegar a observar la producción de derivados de la ciclohexanona de manera cualitativa por la reducción del pH, porque en el medio solo existe ciclohexanona en tampón fosfato, propágulos del hongo y púrpura de bromocresol como indicador, el mismo que presenta un color violeta a pH ligeramente alcalino y vira a color amarillo a pH ácido (Figura3).

Medición del consumo de sustrato por ensayo colorimétrico en hongos filamentosos y levaduras.

En la figura 4, se puede observar que a las 12 horas, las cepas 177QD; 14QJG; 7QJR, difieren muy poco en relación al consumo de sustrato (ciclohexanona). El ácido 3,5 di-nitrobenzoico posee un grupo auxocromo (grupo carboxilo), un grupo cromóforo (anillo bencénico) y los grupos nitro vendrían a ser los grupos cromógenos, la presencia de estos tres grupos confiere al compuesto la capacidad de emitir color al unirse con la ciclohexanona en medio alcalino (KOH) dando una coloración purpura, que presenta una máxima absorbancia a 540 nm. Por lo tanto la disminución de la concentración de ciclohexanona se ve reflejada en la disminución en la absorbancia (10). La cepa 177QD presentó un mayor consumo, llegando a consumir 41 mM de sustrato en comparación con las otras cepas al cabo de 30 horas. Con respecto a la evaluación del consumo de sustrato, se debe denotar que la saturación del sistema con un número elevado de propágulos o formación de excesiva de biomasa, dificulta la captación de oxígeno, haciendo que se inhiba la conversión de la ciclohexanona, Siendo esta una prueba cuantitativa preliminar para llevar adelante la cuantificación, mas sin embargo la prueba idónea para la determinar la actividad en este proceso enzimático debe ser por medio de la detección de productos formados; pero dichos ensayos como ser cromatografía líquida de alta precisión (HPLC), cromatografía gaseosa (GC), incrementarían los costos, por lo tanto no se realizaron.

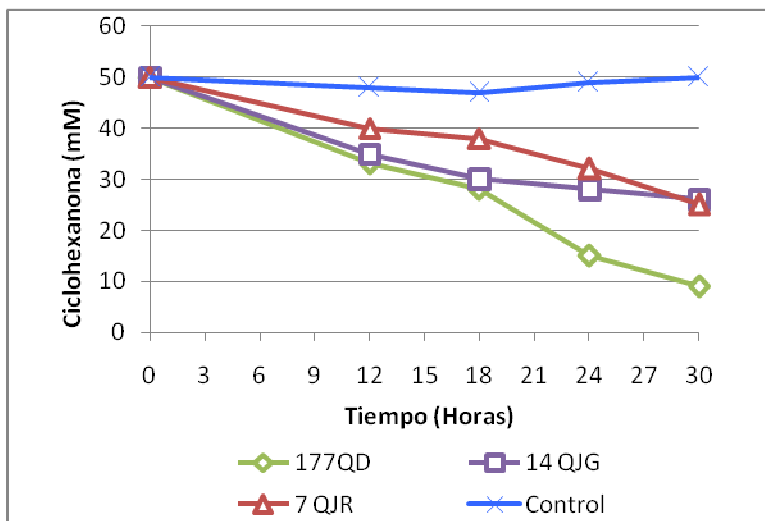


Figura 4. Comparación de la velocidad de consumo de sustrato entre las cepas 177QD; 14QJG; 7QJR.

Identificación de la cepa 177QD.

Características macroscópicas.

En el cultivo la cepa 177QD la cual presentó un color oliváceo y ocasionalmente verde oscuro como se muestra en la figura 5, los micelios eran blancos, apenas visible; esclerocios y en ocasiones presentaban un color marrón a negro, el tamaño y su forma era variable; en el reverso de la placa generalmente era incoloro y en ocasiones era amarillo pálido. Inicialmente la cepa presentaba un aspecto algodonoso (hasta el tercer día de incubación), sin embargo en algunas placas se observó la variación de un aspecto granuloso por la esporulación (a partir del quinto día de incubación), sin embargo estas características pueden variar debido al estrés de nutrientes o de los factores fisicoquímicos de cultivo, como ser temperatura, pH, aireación (11).

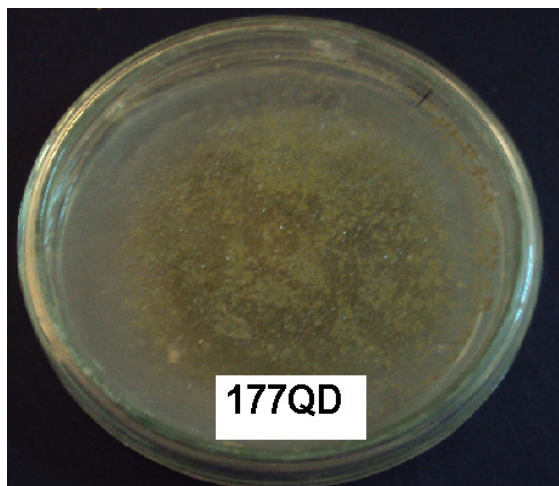


Figura 5. Características macroscópicas en placas de PDA donde se observa el desarrollo de la cepa 177QD y se aprecia la coloración característica del hongo.

Características microscópicas.

Las características observadas, al microscopio, son cabezas conidiales uniseriadas y biseriadas, principalmente radiales; estipes normalmente rugosos, hialinos, color marrón pálido. Vesícula esférica; métulas ocupando prácticamente toda la superficie de la vesícula. Como se observa en la figura 6; los conidios globosos o elipsoidales, lisos o ligeramente rugosos, estas características concuerdan con *Aspergillus flavus*.



Figura 6. Características microscópicas cepa 177QD tomada a 100X.

Comparación de diferentes técnicas de lisis.

Para realizar la confirmación de la actividad CHMO primeramente comparamos diferentes técnicas de lisado, para poder llevar adelante la cuantificación de la actividad enzimática por medio de la depleción de cofactor, es así que la mejor técnica, con la cual se obtuvo 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteína a los 5 minutos, fue por lisis mecánica con perlas de vidrio (figura 7).

La lisis mecánica es una técnica física que no altera la forma nativa de la molécula de interés, pero a tiempos prolongados se produce el incremento de la temperatura por la energía cinética liberada tras los golpes de las perlas de vidrio. A comparación con los procesos que incluyen el uso de compuestos químicos como las técnicas de ebullición con SDS, o ebullición en álcalis fuerte, combinan el calor con la acción de un detergente o el incremento del pH respectivamente; estas condiciones incrementa la posibilidad de desnaturalizar la proteína (12).

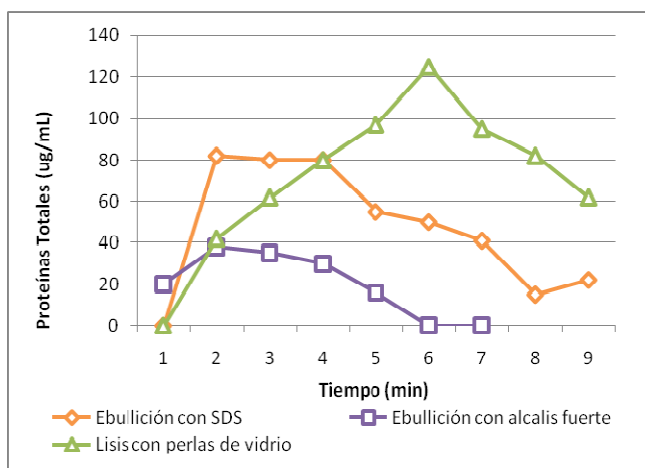


Figura 7. Comparación de técnicas de lisado a diferentes tiempos en biomasa de la cepa 177QD.

Medición de la depleción de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH).

Se confirmó la actividad CHMO de la cepa seleccionada, por medio del monitoreo de la oxidación de NADPH. El NADPH reduce el anillo de flavina del FAD, grupo prostético de la BVMO, al cual ataca el oxígeno molecular formando un peróxido, que posteriormente ataca a la ciclohexanona originando un intermediario de Criegee que da lugar a la caprolactona y una molécula de agua. La oxidación del NADPH por tanto ocurre en una etapa inicial del mecanismo (Figura 8) como consecuencia de la reducción del FAD. El FAD, a diferencia del NADPH, está fijo en el sitio activo de este tipo de enzimas, mientras que el NADPH es libremente dissociable. En trabajos realizados con genes putativos de BVMOs tipo I, observó que los hongos presentan menor frecuencia de actividad monooxigenasa (13), sin embargo al trabajar con cepas de *Aspergillus* para la producción de caprolactona, sí se observó actividad CHMO (14). Los hongos filamentosos al ser organismos pluricelulares pueden ser manipulados con mayor comodidad por su desarrollo lento, también se puede aprovechar el que se puede utilizar su propia biomasa como soporte (15), en comparación con las levaduras las cuales tienen un desarrollo rápido, similar al de las bacterias.

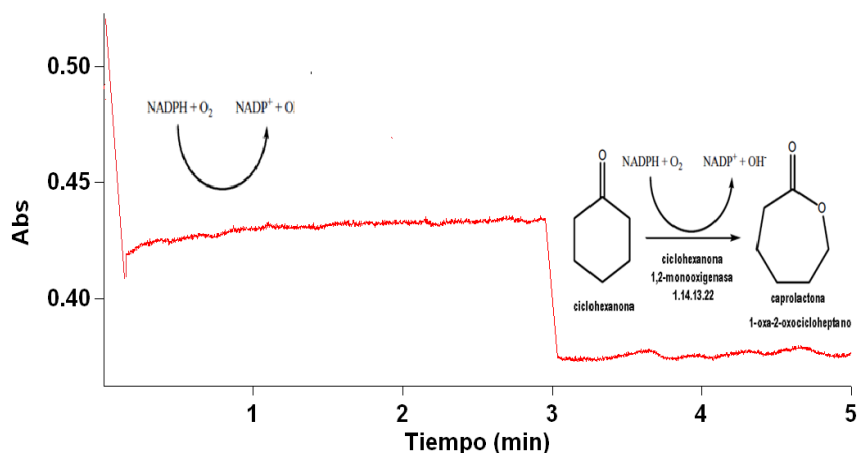


Figura 8. Depleción de cofactor NADPH a 340 nm de la cepa 177QD.



EXPERIMENTAL

Se analizaron 85 cepas de hongos filamentosos del cepario del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB) de la Universidad Mayor de San Andrés (UMSA), paralelamente se aislaron cepas de levaduras de muestras de tierra contaminada con petróleo, dichas muestras fueron recolectadas en la población de Sanandita, del Departamento de Tarija.

Acondicionamiento de las cepas de hongos filamentosos y levaduras para el análisis de actividad CHMO.

Las cepas de hongos filamentosos se encontraban en estado liofilizado, a las que se les añadió medio de cultivo Caldo Papa Dextrosa (CPD) pH 6,8; se incubó a una temperatura de 22°C durante 5 días. Se tomaron 200 µl del cultivo para sembrarlos en placas de Agar Papa Dextrosa (PDA), siendo cultivadas en las mismas condiciones de temperatura y pH durante el lapso de 7 días (16).

Se tomaron 2 g de tierra contaminada con petróleo para el aislamiento de levaduras, a la cual se le añadieron 2 ml solución fisiológica, se incubó a 25 °C durante 24 horas a 100 rpm, se procedió a la siembra de 100 µl en medio de cultivo PDA, a una temperatura de 25°C durante 48 horas.

Llevando adelante el ensayo cualitativo (viraje de indicador) y posteriormente el ensayo cuantitativo (consumo de sustrato) previamente se procedió a concentrar esporas por medio del sembrado en tubos con medio PDA en pico de flauta, los cuales fueron incubados a 22°C durante 15 días, pasado este tiempo se procedió al lavado de esporas con tampón fosfato (20 mM pH 6,8); alcanzando una concentración de 2×10^3 prop/ml el cual equivale a densidad óptica (DO) igual a 0,6.

Se procedió a inocular a las cepas de levaduras en medio de cultivo Dextrosa Peptona Extracto de Levadura (YEPD) (17), el cual fue incubado a 25°C durante 48 horas a 150 rpm. Posteriormente se realizaron lavados con tampón fosfato (20 mM; pH 6,8) Hasta llegar a obtener un saturado de células con una DO de 0,6.

Detección de la actividad CHMO

En el ensayo cualitativo se prepararon soluciones de ciclohexanona a una concentración de 50 mM en tampón fosfato (20 mM pH 6,8); a las cuales se le añadieron 100 µl de púrpura de bromocresol como indicador, la reacción tuvo tres mediciones de tiempo a las 0; 6; 12 horas respectivamente en comparación con la solución de ciclohexanona sin la presencia del microorganismo como control; la reacción es positiva cuando existe cambio del pH, el cual era monitoreado por el cambio de color de la solución (18), el cual cambia de púrpura a amarillo si existe reducción del pH.

Medición del consumo de ciclohexanona como sustrato por ensayo colorimétrico en hongos filamentosos y en levaduras.

Se cultivaron las cepas fúngicas en medio PDA en pico de flauta hasta que alcanzaron un desarrollo de 15 días, posteriormente se lavaron y se resuspendieron en tampón fosfato (20 mM pH 6.8) hasta una concentración de aproximadamente 2×10^3 prop/ml. Se emplearon 5 viales pequeños, uno para el blanco, uno para tiempo cero y tres viales para las repeticiones de la prueba; se añadió 200 µl de la suspensión fúngica y 14 µl de una solución de ciclohexanona 1M en cada vial, posteriormente se procedió a la medición de la absorbancia en un espectrofotómetro (Varían Cary 50 Bio UV-visible) del tubo de tiempo cero y se dejó los otros tubos a temperatura ambiente en agitación a 100 rpm durante 12 horas, transcurrido este tiempo se añadió 143 µl de 3.5 ácido dinitrobenzoico (DNB) al 1% por 3 min y 143 µl de hidróxido de potasio (KOH) 0.2 N (preparados en etanol a 96° GL) se dejó en reposo durante 15 min, finalmente se centrifugó a 8000 rpm durante 1 min; y se realizó la lectura del sobrenadante a 540 nm (10). Las cepas aisladas de levaduras fueron cultivadas en medio dextrosa peptona extracto de levadura (YEPD) durante 48 horas, se recolectó 1 ml de cultivo, se resuspendieron las células en tampón fosfato (20 mM pH 6.8) hasta que la muestra presente una absorbancia de 0,6; posteriormente se procedió de la misma manera que el apartado anterior para realizar la medición del consumo de ciclohexanona.

Comparación de la velocidad de consumo de sustrato.



Para esta prueba se prepararon viales que contenían ciclohexanona a una concentración de 50 mM, procediendo a la medición de la velocidad de consumo de sustrato, mediante el método colorimétrico descrito anteriormente de las cepas que presentaron actividad CHMO a diferentes tiempos durante 30 horas.

Identificación de la cepa con más actividad enzimática.

La identificación se realizó observando las características macroscópicas y microscópicas de la cepa que presentó la mejor actividad CHMO.

Observación macroscópica.

Se determinaron las características de desarrollo morfológicas y de pigmentación en el medio de cultivo para la discriminación de la cepa seleccionada. Se tomó los micelios de las cajas Petri, donde se presentó desarrollo con ayuda de una lupa; se consideraron las siguientes características: Anverso de la caja (Aspecto del frente hifal: velloso, seco, algodonoso, formación de macro estructuras sexuales, Color: de la especie fúngica). Reverso de la caja, (Aspecto del frente hifal: rugoso, liso. Pigmento: Presencia/ ausencia).

Observación microscópica.

Se utilizó la técnica de la cinta adhesiva en portaobjetos para la observación en el microscopio, para luego observar e identificar las características del hongo (conidios, hifas de la cepa).

Comparación de técnicas de lisado.

Para realizar el ensayo de la depleción de cofactor, se debe trabajar con células lisadas debido a que CHMO es una proteína intracelular (20). Se llevó adelante la evaluación de las técnicas de lisado se procedió a la siembra de las cepas en frascos de 100 ml en medio de cultivo CPD, durante 7 días a 22°C en agitación a 100 rpm. Al cabo de este tiempo se sometieron las muestras a las diferentes técnicas de lisado: agitación mecánica con perlas de vidrio, lisis por ebullición en presencia de álcalis fuerte, lisis por ebullición en presencia de Dodecil Sulfato Sódico (SDS). En el ensayo por agitación mecánica con perlas de vidrio, se tomaron aproximadamente 500 mg (peso promedio) de biomasa y, en el caso de las esporas se concentraron hasta llegar a una concentración de 2×10^8 prop/ml, a lo cual se agregó solución de lavado (PBS) (0,9 % p/v NaCl en 0,1 M de tampón fosfato, pH 7) con el fin de remover proteínas o remanentes extracelulares. Posteriormente se agregó perlas de vidrio acidificadas con ácido clorhídrico (HCl) 0,1 N en tampón de lisis (20mM tris-HCl pH 7,6; 10 mM; NaCl) la mezcla fue agitada en un vortex (V-UM100 united product and instruments, Inc.) durante 8 minutos (se repitieron ciclos de agitación por vortex durante el lapso de 1 minuto e incubadas en hielo) (21). Posteriormente la suspensión fue centrifugada a 8000 rpm durante 10 minutos a 5°C, se midió la concentración de proteínas totales por el método de Bradford. De igual manera en el ensayo por lisis por ebullición en presencia de álcalis fuerte, se tomaron aproximadamente 500 mg (peso promedio) de biomasa y para el caso de las esporas se concentraron hasta llegar a una concentración de 2×10^8 prop /ml. Se lavó con PBS y se adicionó 3 ml de hidróxido de sodio (NaOH) 0,2 N; la solución fue llevada a ebullición durante 5 minutos. Posteriormente la suspensión fue centrifugada a 5000 rpm 10 minutos a 5°C, finalmente se midió la concentración de proteínas totales por el método de Bradford.

En el ensayo por lisis por ebullición en presencia de SDS, se tomaron aproximadamente 500 mg (peso promedio) de biomasa y para el caso de las esporas se concentraron hasta llegar a una concentración de 2×10^8 prop /ml, a las que se efectuó lavados con PBS con el fin de remover proteínas o remanentes extracelulares, se adicionaron 3 ml de tampón de lisis SDS (1 % p/v SDS en 100 mM de Tris -HCl, pH 7,6); la solución se llevó a ebullición durante 5 minutos. La suspensión fue centrifugada a 5000 rpm durante 10 minutos a 5°C, se midió la concentración de proteínas totales por el método de Bradford.

Medición de la depleción de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH).

Se sometió la biomasa de hongo filamentoso seleccionado, a un proceso de lisado para obtener una concentración de 0,5-1mg/ml de proteínas totales. Luego de haber obtenido la concentración requerida de proteínas totales se conservó la muestra a 0°C, mediante el uso de baño de hielo para evitar la inactivación de la enzima. La absorbancia inicial debe encontrarse entre 0,5 y 0,8; con el fin de conservar la linealidad de la técnica (22-23-24). Se controló la disminución de la absorbancia de NADPH en un espectrofotómetro (Varían Cary 50 Bio UV-visible) durante 1



minuto; cuando ya no hubo cambio en la absorbancia se añadió 200 μl del sustrato de la enzima y se esperó hasta los 5 minutos.

CONCLUSIONES

Se evaluó la actividad ciclohexanona monooxigenasa por medio de un screening de 90 microorganismos fúngicos, obteniendo 3 cepas con actividad enzimática. Se evidenció que la cepa 177QD presenta la mejor capacidad de asimilación de la ciclohexanona como sustrato, identificándola por medio de las características macroscópicas y microscópicas que presentaba, cumpliendo con las características de *Aspergillus flavus*.

RECONOCIMIENTOS

A la cooperación UMSA – ASDI-SAREC y recursos IDH, por el financiamiento del proyecto; al Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas por la acogida para la realización del presente estudio.

A Oscar Cárdenas (Doctor Ponchis) por el apoyo para la realización del presente trabajo.

REFERENCIAS

1. Calle J., Villegas R., 2007. Optimización de las condiciones de cultivo para la producción de enzimas Redox por *Aspergillus niger* QD y *Pestalotia sp* 2i QJR. *Biofarbo*, 7 29-36.
2. Islas P., Valenzuela B., Jerardino S., 1987. Intoxicación aguda por fenoles. *Pediatría*, 58; 402-404.
3. Mandal A., Ahmadb, M.I. Khanb, R. Kumara ,2002. Biocatalytic transformation of cyclohexanone by *Fusarium sp.* *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 181, 237-241.
4. Grados R. Producción de polihidroxialcanoatos por digestión anaerobia de desechos agrícolas [tesis de licenciatura]2010.
5. Cavero H. Evaluación de estrategias biológicas para optimizar el proceso hidrolítico anaerobio de desechos orgánicos complejos en la producción de biogas [tesis de maestría] 2009.
6. Watts J., Beecher C., Whitche J., 2002. A method for screening Baeyer-Villiger Monooxygenase Activity Against Monocyclic Ketones. *Biocatalysis and Biotransformation*, 20 ; 209 – 215.
7. Espinal C. Evaluación de actividad biocontroladora de *Trichoderma inahatum* cepa BOL12QD, frente a *Botrytis faba*, causa de mancha de chocolate en cultivos de haba (*vicia faba*) [tesis de licenciatura] 2010.
8. Caballeira J., Álvarez E., Sinisterra J., 2004. Biotransformation of cyclohexanone using immobilized *Geotrichum candidum* NCYC49: Factors affecting the selectivity of the process. *Journal of molecular catalysis*, 28; 25-32.
9. Casablanca E., Ríos N., 2009. Optimización de las condiciones de cultivo anaeróbico termófilo para aumentar la producción enzimática de xilanasas con cepas bacterianas encapsuladas y libres. *Biofarbo*, 17(2); 51 -59.
10. Linares J., Chavéz G., Villagomez R, Mamo G, Hatty-kaul R., 2012. A method for rapid screening of ketone biotransformations: Detection of whole cell Baeyer-Villiger monooxygenase activity *Enzyme and Microbial Technology*. 50; 101-106.
11. Ray, Stephen R. McDow. 2005. Dicarboxylic acid concentration trends and sampling artifacts Atmospheric. *Environment*, 39; 7906-7919.
12. Torres M., Gutiérrez M., Aroca G., Huerta S., 2007. Modelado de la cinética de biotransformación tipo baeyer-villiger mediante el uso de *E. coli* TOP10 pQR239. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa Congreso Nacional de biotecnología y bioingeniería.
13. Nandakumar N., Marten R., 2002. Comparison of lysis methods and preparation protocols for one- and two- dimensional electrophoresis of *Aspergillus oryzae* intracellular proteins *Electrophoresis*. 23 ; 2216-2222.
14. Jeng I. Lin I. Hervey, 1990. Importance of ultrasonication conditions in recovery of microbial contamination from material surfaces. *Journal Applied Bacteriology*. 68; 479-484.
15. Morris y Nicholls, 1978. An evaluation of optical density estimate fungal spore concentration in water suspensions. *phytopathology*. 68 ; 1240-1242.
16. Yonghyun K., Nandakumar M., Mark R., 2008. Proteomics of filamentous fungi, *Trends in Biotechnology*, 25 ; 396-400.
17. Vázquez A., García S., Estrada A., 2002. Influencia del pH en el crecimiento de quince cepas de hongos ectomicorrizógenos . *Botánica*, 73: 1-15.
18. Shuiying R., Zhengfeng C., Xiaopeng X., Gaofei Q., 2009. Clean synthesis of adipic acid catalyzed by complexes derived from heteropoly acid and glycine. *Catalysis Communications*, 10; 464-467.
19. Roseñeda, M., 1962. Catálogo de enfermedades de plantas cubanas. Serie Agrícola, Academia de Ciencias de Cuba; Instituto de Investigaciones Tropicales, 5; 27-78.
20. Roland Wohlgemuth. 2006. On the Influence of Oxygen and Cell Concentration in an SFPR Whole Cell Biocatalytic Baeyer-Villiger Oxidation. *Process InterScience*, 27; 1139-1144.
21. Reyes C., Morales G., 2007. Determinación de la temperatura óptima de desarrollo *in vitro* de *Phytophthora parasitica* en aguacate , en la zona aguacatera de Michoacan, Mexico. *Facultad de Agrobiología* , 17; 978-956.



22. Mendoza A, Ahmadb A., Khanb I., Kumara R., 2007. Biocatalytic transformation of cyclohexanone by *Fusarium* sp. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. 18; 237-241.
23. González D. 2007. Complejo enzimático citocromo P450. *Ambient*, 23; 177-183.
24. Doig S., Lisa M. O'Sullivanb, Sejal P., John M., Woodley M., 2001. Large scale production of cyclohexanone monooxygenase from *E.coli* TOP10 pQR239. *Enzyme and Microbial Technology*, 28; 265-274.