

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS



**“AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE HONGOS PRODUCTORES
DE COLORANTES”**

Presentada por:

Paola Rosas Ramos

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Lima – Perú

2018

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS

**“AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE HONGOS PRODUCTORES
DE COLORANTES”**

Presentada por:

Paola Rosas Ramos

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

Q. F. Juan José León Cam
PRESIDENTE

Dr. Víctor Meza Contreras
MIEMBRO

Mg. Sc. Carmen Rodríguez Best
MIEMBRO

Ph. D. Gretty Villena Chávez
ASESORA

A mis padres y hermanos, por su apoyo incondicional y el cariño brindado.
Paola Rosas Ramos

AGRADECIMIENTO

En primer lugar expreso mi infinito agradecimiento a mi familia y amigos por el apoyo y cariño brindados durante mi vida académica en la universidad.

Expreso mi agradecimiento a Gretty Villena Chávez PhD, profesora y asesora de tesis, quien siempre confió en mi trabajo como investigadora y apoyó durante todos los años que pertencí al laboratorio de Micología y Biotecnología “Marcel Gutiérrez Correa”. Así mismo, agradezco a Marcel Gutiérrez Correa PhD., querido y admirado maestro, quien partió hace unos meses y quien, gracias a su arduo trabajo, fundó el laboratorio que hoy lleva su nombre, lugar donde jóvenes investigadores pueden poner en práctica sus habilidades y realizar trabajos de investigación de alto nivel.

Agradezco a la Oficina de Investigación – Vicerrectorado académico UNALM, por la subvención de tesis y apoyo brindados.

Agradezco a Mg. Víctor Hugo Sarmiento, profesor de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, por el apoyo brindado en las pruebas de caracterización inicial de colorantes y a Dra. Carmen Tamariz, Dr. Percy Céspedes y Mg. Miguelina Santillán, profesores de la Universidad Nacional Santiago Antúnez de Mayolo de Huaraz, con quienes realicé pruebas previas de caracterización de colorantes. También deseo agradecer a Blgo. Miguel Ángel Vera y Hernán Cunza, miembros del Laboratorio de Cereales UNALM, con quienes realicé la toma de fotos de placas de los hongos productores de colorantes.

Brindo mi agradecimiento a las empresas Prosegel S.A.C. y Fiestra S.A.C., lugares donde laboré, por haberme brindado las facilidades necesarias para poder culminar este trabajo de investigación.

Asimismo agradezco a todos mis compañeros del LMB y, en especial, a Mary Pasmíño, por su apoyo y cariño brindados durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

Finalmente, agradezco a aquellas otras personas que en alguna forma contribuyeron en el desarrollo del presente trabajo.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	x
SUMMARY	xi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	2
1.1.1. Hipótesis.....	3
1.1.2. Objetivos	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
3.1. MATERIALES.....	23
3.2. MÉTODOS.....	26
3.2.1. Aislamiento y tamizado de cepas productoras de colorantes	26
3.2.2. Caracterización morfológica y fisiológica de cepas productoras de colorantes	26
3.2.3. Extracción de ADN	27
3.2.4. Amplificación de la región espaciadora interna (ITS) mediante pcr convencional y genes Beta tubulina (<i>BenA</i>), Calmodulina (<i>CaM</i>)	28
3.2.5. Análisis filogenético.....	29
3.2.6. Producción de colorantes en cultivo sumergido.....	30
3.2.7. Extracción de colorantes	30
3.2.8. Análisis espectrofotométrico de los colorantes producidos y extraídos.....	31
3.2.9. Caracterización inicial de colorantes producidos por espectrofotometría de absorción en el infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR).....	31
3.2.10. Amplificación de genes de biosíntesis de micotoxinas	31
3.2.11. Análisis estadístico.....	32
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	34
4.1. AISLAMIENTO Y TAMIZADO DE CEPAS PRODUCTORAS DE COLORANTES.....	34
4.2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, MOLECULAR Y FILOGENIA DE LAS CEPAS PRODUCTORAS DE COLORANTES.....	40
4.3. PRODUCCIÓN DE COLORANTES POR CEPAS PRODUCTORAS SELECCIONADAS	54

4.4. CARACTERIZACIÓN INICIAL DE LOS COLORANTES PRODUCIDOS	60
4.5. IDENTIFICACIÓN DE GENES DE BIOSÍNTESIS DE MICOTOXINAS EN LAS CEPAS SELECCIONADAS	73
V. CONCLUSIONES.....	84
VI. RECOMENDACIONES.....	86
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
VIII. ANEXOS	103

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Colorantes naturales producidos por microorganismos (de uso o potencial uso alimenticio)	7
Tabla 2: Longitudes de onda de máxima absorción de algunos grupos de metabolitos secundarios conocidos	11
Tabla 3: Transiciones electrónicas de los orbitales moleculares n , σ y π correspondientes a grupos funcionales de diversos metabolitos	12
Tabla 4: Hidroxiantraquinonas producidas por hongos y sus principales características químicas	13
Tabla 5: Azafilonas producidas por <i>Penicillium chermesinum</i> y sus principales propiedades químicas	14
Tabla 6: Principales micotoxinas producidas por <i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp. y <i>Fusarium</i> sp.....	17
Tabla 7: Reactivos y cantidades utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	28
Tabla 8: Parámetros de amplificación de genes de identificación en hongos productores de colorantes	29
Tabla 9: Cebadores utilizados en la identificación molecular de hongos productores de colorantes seleccionados.....	29
Tabla 10: Cebadores utilizados en la amplificación de genes de biosíntesis de micotoxinas de hongos productores de colorantes seleccionados	33
Tabla 11: Relación de hongos de crecimiento in vitro aislados de basidiocarpos de la zona “El Huayo” - Iquitos.....	34
Tabla 12: Hongos productores de colorantes aislados de muestras de tierra de la zona “Contamana”.....	35
Tabla 13: Cepas productoras de colorantes provenientes del cepario del LMB	36
Tabla 14: Características morfológicas y fisiológicas del crecimiento de las cepas productoras de colorantes seleccionadas en diferentes medios de cultivo	46
Tabla 15: Tamaño de banda en pares de bases (pb) de productos de amplificación de la región ITS, de cepas productoras de colorantes.....	47

Tabla 16: Alineamiento de secuencias de genes de beta tubulina 2, calmodulina y la región espaciadora del transcrito interno (ITS) de los hongos productores de colorantes seleccionados mediante análisis BLAST	48
Tabla 17: Resultados del análisis espectrofotométrico UV-Visible de los colorantes producidos por las cepas seleccionadas	56
Tabla 18: Resultados del Análisis espectrofotométrico UV-Visible de los colorantes extraídos a partir de biomasa	61
Tabla 19: Resultados del análisis espectrofotométrico IR de los colorantes extraídos de biomasa por el software OMNIC Spectra	67
Tabla 20: Resultados del secuenciamiento de las amplificaciones de genes de biosíntesis de aflatoxina utilizando cebadores del gen AfIR	74
Tabla 21: Resultados del secuenciamiento de las amplificaciones de genes de biosíntesis de aflatoxina utilizando cebadores del gen Nor1	75
Tabla 22: Resultados del secuenciamiento de las amplificaciones de genes de biosíntesis de aflatoxina utilizando cebadores del gen OmtA	76
Tabla 23: Resultados del secuenciamiento de las amplificaciones de genes de biosíntesis de aflatoxina utilizando cebadores del gen Ver1	77
Tabla 24: Resultados del secuenciamiento de las amplificaciones de genes de biosíntesis de patulina utilizando cebadores del gen idh	78
Tabla 25: Resultados del secuenciamiento de las amplificaciones de genes de biosíntesis de ocratoxina A utilizando cebadores KAOTA	82
Tabla 26: Resultados del secuenciamiento de las amplificaciones de genes de biosíntesis de ocratoxina A utilizando cebadores KAF/R	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura química de algunos colorantes de uso alimenticio producidos por microorganismos	9
Figura 2: Estructura química de metabolitos secundarios producidos por hongos	10
Figura 3: Posible ruta de biosíntesis de colorantes y micotoxinas producidos por la cepa <i>Penicillium marneffe</i>	16
Figura 4: Ruta de biosíntesis de aflatoxina y esterigmatocistina	19
Figura 5: Ruta de biosíntesis de patulina	21
Figura 6: Crecimiento del hongo LMB-HL1 en agar papa dextrosa (PDA) luego de 7 días de incubación.	35
Figura 7: Crecimiento del hongo LMB-HL2 en agar papa dextrosa (PDA) luego de 7 días de incubación.	35
Figura 8: Crecimiento del hongo LMB-HU1 en agar papa dextrosa (PDA) luego de 7 días de incubación.	36
Figura 9: Crecimiento del hongo LMB-HP14 en agar papa dextrosa (PDA) luego de 7 días de incubación.	37
Figura 10: Crecimiento del hongo LMB-HP19 en agar papa dextrosa (PDA) luego de 7 días de incubación.....	37
Figura 11: Crecimiento del hongo LMB-HP33 en agar papa dextrosa (PDA) luego de 7 días de incubación.....	38
Figura 12: Crecimiento del hongo LMB-HP37 en agar papa dextrosa (PDA) luego de 7 días de incubación.....	38
Figura 13: Crecimiento del hongo LMB-HP43 en agar papa dextrosa (PDA) luego de 7 días de incubación.....	39
Figura 14: Características fisiológicas y morfológicas del hongo LMB-HP14 en diferentes medios de cultivo	40
Figura 15: Características fisiológicas y morfológicas del hongo LMB-HP19 en diferentes medios de cultivo	41
Figura 16: Características fisiológicas y morfológicas del hongo LMB-HP33 en diferentes medios de cultivo	42
Figura 17: Características fisiológicas y morfológicas del hongo LMB-HP37 en diferentes medios de cultivo	43

Figura 18: Características fisiológicas y morfológicas del hongo LMB-HP43 en diferentes medios de cultivo	44
Figura 19: Características fisiológicas y morfológicas del hongo LMB-HU1 en agar malta	45
Figura 20: Características fisiológicas y morfológicas del hongo LMB-HL1 en agar malta	45
Figura 21: Características fisiológicas y morfológicas del hongo LMB-HL2 en agar malta	45
Figura 22: Amplificación de la región ITS de hongos productores de colorantes.	47
Figura 23: Árbol filogenético de las cepas LMB-HP19 y LMB-HP33 utilizando cebadores del gen Beta tubulina 2	49
Figura 24: Árbol filogenético de las cepas LMB-HP19 y LMB-HP33 utilizando cebadores del gen Calmodulina.....	49
Figura 25: Árbol filogenético de la cepa LMB-HP43 utilizando cebadores del gen Beta tubulina 2.....	50
Figura 26: Árbol filogenético de la cepa LMB-HP43 utilizando cebadores del gen Calmodulina.....	50
Figura 27: Árbol filogenético de la cepa LMB-HU1 utilizando cebadores del gen Beta tubulina 2.....	50
Figura 28: Árbol filogenético de la cepa LMB-HL1 utilizando cebadores de la región ITS	51
Figura 29: Árbol filogenético de la cepa LMB-HL2 utilizando cebadores del gen Calmodulina.....	51
Figura 30: Colorantes producidos en fermentación sumergida por cepas seleccionadas en Caldo papa dextrosa luego de 7 días de incubación.	55
Figura 31: Espectro de absorción UV-Visible del colorante producido en fermentación sumergida por la cepa LMB-HP14 <i>Talaromyces wortmannii</i>	56
Figura 32: Espectro de absorción UV-Visible del colorante producido por fermentación sumergida por la cepa LMB-HP19 <i>Penicillium mallochii</i>	57
Figura 33: Espectro de absorción UV-Visible del colorante producido en fermentación sumergida por la cepa LMB-HP33 <i>Penicillium maximae</i>	57
Figura 34: Espectro de absorción UV-Visible del colorante producido en fermentación sumergida por la cepa LMB-HP37 <i>Penicillium mallochii</i>	57

Figura 35: Espectro de absorción UV-Visible del colorante producido en fermentación sumergida por la cepa LMB-43 <i>Talaromyces brunneus</i>	58
Figura 36: Espectro de absorción UV-Visible del colorante producido en fermentación sumergida por la cepa LMB-HU1 <i>Aspergillus amoenus</i>	58
Figura 37: Espectro de absorción UV-Visible del colorante producido en fermentación sumergida por la cepa LMB-HL1 <i>Trichoderma reesei</i>	58
Figura 38: Espectro de absorción UV-Visible del colorante producido en fermentación sumergida por la cepa LMB-HL2 <i>Trichoderma reesei</i>	59
Figura 39: Espectro de absorción UV/Visible del colorante extraído de biomasa de la cepa LMB-HP14 <i>Talaromyces wortmannii</i>	61
Figura 40: Espectro de absorción UV/Visible del colorante extraído de biomasa de la cepa LMB-HP19 <i>Penicillium mallochii</i>	62
Figura 41: Espectro de absorción UV/Visible del colorante extraído de biomasa de la cepa LMB-HP33 <i>Penicillium maximae</i>	62
Figura 42: Espectro de absorción UV/Visible del colorante extraído de biomasa de la cepa LMB-HP37 <i>Penicillium mallochii</i>	63
Figura 43: Espectro de absorción UV/Visible del colorante extraído de biomasa de la cepa LMB-HP43 <i>Talaromyces brunneus</i>	63
Figura 44: Espectro de absorción UV/Visible del colorante extraído de biomasa de la cepa LMB-HU1 <i>Aspergillus amoenus</i>	64
Figura 45: Espectro de absorción UV/Visible del colorante extraído de biomasa de la cepa LMB-HL1 <i>Trichoderma reesei</i>	64
Figura 46: Espectro de absorción UV/Visible del colorante extraído de biomasa de la cepa LMB-HL2 <i>Trichoderma reesei</i>	65
Figura 47: Espectro en el IR del colorante extraído de biomasa de la cepa LMB-HP14 <i>Talaromyces wortmannii</i>	68
Figura 48: Espectro en el IR del colorante extraído de biomasa de la cepa LMB-HP19 <i>Penicillium mallochii</i>	68
Figura 49: Espectro en el IR del colorante extraído de biomasa de la cepa LMB-HP33 <i>Penicillium maximae</i>	69
Figura 50: Espectro en el IR del colorante extraído de biomasa de la cepa LMB-HP37 <i>Penicillium mallochii</i>	69
Figura 51: Espectro en el IR del colorante extraído de biomasa de la cepa LMB-HP43 <i>Talaromyces brunneus</i>	70

Figura 52: Espectro en el IR del colorante extraído de biomasa de la cepa LMB-HU1 <i>Aspergillus amoenus</i>	70
Figura 53: Espectro en el IR del colorante extraído de biomasa de la cepa LMB-HL1 <i>Trichoderma reesei</i>	71
Figura 54: Espectro de absorción en el IR del colorante extraído de biomasa de la cepa LMB-HL2 <i>Trichoderma reesei</i>	71
Figura 55: Amplificación del gen AfIR de hongos productores de colorantes.	74
Figura 56: Amplificación del gen Nor1 de hongos productores de colorantes.....	75
Figura 57: Amplificación del gen OmtA de hongos productores de colorantes.	76
Figura 58: Amplificación del gen VER1 de hongos productores de colorantes.	77
Figura 59: Amplificación del gen IDH de hongos productores de colorantes.	79
Figura 60: Amplificación del gen KAOTA de hongos productores de colorantes.	80
Figura 61: Cepas aisladas de crecimiento in vitro no productoras de colorantes.	103

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Imágenes de las cepas aisladas a partir de basidiocarpo no productoras de colorantes.....	103
---	-----

RESUMEN

Los colorantes sintéticos son ampliamente utilizados debido a su alta estabilidad a diferentes condiciones en procesos industriales. Sin embargo, hay evidencia de su impacto negativo en el medio ambiente así como en la salud de las personas. El presente trabajo tuvo como finalidad aislar y seleccionar hongos productores de colorantes naturales, como una alternativa al uso de colorantes sintéticos. Ocho cepas de hongos provenientes de la selva peruana con capacidad de producir colorantes naturales amarillos (LMB-HL1, LMB-HL2), anaranjados (LMB-HP14, LMB-HP19, LMB-HP33, LMB-HP37, LMB-HP43) y marrones (LMB-HU1), fueron aisladas y seleccionadas. Dichas cepas fueron analizadas molecularmente y se identificaron como organismos de los géneros *Penicillium*, *Talaromyces*, *Aspergillus* y *Trichoderma*. Los colorantes producidos fueron analizados mediante Espectroscopía UV/Visible y Espectroscopía de absorción en el Infrarrojo por transformada de Fourier para su caracterización inicial. Los resultados obtenidos sugieren que los colorantes producidos por 5 de las cepas seleccionadas, fueron Quinonas.

Finalmente, se evaluó la presencia de genes de micotoxinas, dado que la biosíntesis de algunos colorantes puede estar relacionada con su producción. Para este fin se analizó, mediante PCR, genes involucrados en la biosíntesis de aflatoxinas, patulina y ocratoxina A. Se observó que la cepa LMB-HU1 *Aspergillus amoenus* no es aflatoxigénica. Esta cepa podría ser utilizada como candidata para la producción de colorantes naturales. Para las otras cepas no se detectaron productos específicos de amplificación de los genes evaluados.

Palabras clave: Hongos, selva peruana, colorantes naturales, quinonas, micotoxinas.

SUMMARY

Synthetic colorants are widely used in many industries due to their high stability at different conditions in industrial processes. However, there is evidence of its negative impact on the environment as well as on human health. This study aimed to isolate and select natural colorant producing fungi, as an alternative of the use of synthetic dyes. Eight fungal strains from peruvian rainforest were isolated and selected for their ability to produce yellow (LMB-HL1, LMB-HL2), orange (LMB-HP14, LMB-HP19, LMB-HP33, LMB-HP37, LMB-HP43) and brown natural colorants (LMB-HU1). These strains were molecularly analyzed and identified as organisms of the genera *Penicillium*, *Talaromyces*, *Aspergillus* and *Trichoderma*. Extracts from colorant-producing strains colorants were analyzed by UV / Visible spectroscopy and Fourier Transform infrared spectroscopy for initial characterization. Preliminary analysis suggest that colorants produced by 5 strains are quinones. Finally, the presence of mycotoxin genes was evaluated, since the biosynthesis of some colorants may be related to their production. For this purpose, the presence genes involved in the biosynthesis of aflatoxins, patulin and ochratoxin A was assessed by PCR. It was observed that the LMB.HU1 *Aspergillus amoenus* strain is non-aflatoxigenic. This strain could be used as candidate for the production of natural dyes.

Keywords: Fungi, Peruvian rainforest, natural colorants, quinones, mycotoxins

I. INTRODUCCIÓN

Los colorantes son sustancias utilizadas en diversas industrias, los cuales poseen diferentes estructuras químicas (Wesenberg 2003). Los colorantes más utilizados en procesos industriales son los sintéticos o xenobióticos, los cuales pueden ser tóxicos y potenciales agentes carcinógeno y mutagénicos (Lopes *et al.* 2013). Además, estos colorantes generan impacto negativo en el ambiente pues su tratamiento, como componente de aguas residuales, es ineficiente (Rodríguez-Couto 2013).

Los colorantes naturales provienen de diversas fuentes tales como plantas, animales y microorganismos. En el caso de plantas, la producción de dichos compuestos está influenciada por factores agro-climático; por ello, el perfil químico de los metabolitos sintetizados puede cambiar de una producción a otra de acuerdo a dichas condiciones (Mapari *et al.* 2009).

Los colorantes microbianos poseen ciertas ventajas frente a los provenientes de animales y plantas, ya que los microorganismos son de crecimiento rápido y tienen el potencial de ser utilizados en procesos industriales (Sharma *et al.* 2012). Algunos microorganismos pueden producir una gran cantidad de colorantes como antraquinonas, carotenoides, flavonoides, quinonas y rubraminas (Sharma *et al.* 2012).

Muchos de los colorantes naturales de uso comercial poseen ciertas desventajas en sus procesos de extracción, químicos o físicos. Por ejemplo, el color púrpura obtenido de antocianinas es sensible a la oxidación, al blanqueamiento con dióxido de azufre y varía con el pH. De igual manera, colorantes como clorofilas y carotenoides son sensibles a la exposición a luz, calor y oxígeno. Estas características limitan su aplicación en la industria. Por ello, es necesario identificar nuevas fuentes de colorantes naturales con posible uso industrial (Mapari *et al.* 2005).

Los estudios de bioprospección de hongos de la selva de nuestro país efectuados recientemente, han permitido la identificación de microorganismos de potencial uso industrial tales como productores de enzimas celulasas alcalinas (Vega *et al.* 2015) o posibles degradadores de colorantes azoicos, pigmentos sintéticos cuya naturaleza química no los hacen espontáneamente degradables y, por ende, no amigables con el medio ambiente (Cerrón *et al.* 2015).

La presente investigación tuvo como objetivo aislar y seleccionar hongos productores de colorantes naturales de la selva peruana y evaluar inicialmente su composición química, de manera tal que sean posibles fuentes de colorantes y puedan ser utilizados industrialmente.

1.1. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Usualmente, las industrias utilizan colorantes sintéticos para la tinción de productos textiles y de alimentos (Velmurugan *et al.* 2009). Se estima que, en efluentes, se pierde entre el 10 y 35% de tintes, generando contaminación de aguas y, por lo tanto, impacto negativo sobre el medio ambiente (Rai *et al.* 2005). Además, muchos de estos tintes utilizados en la industria pueden contener carcinógenos capaces de poner en riesgo la salud de humanos si se exponen de sobremanera (Osman *et al.* 2004). Es así que los colorantes naturales surgen como una alternativa al uso de los sintéticos (Sivakumar *et al.* 2009). Los colorantes naturales provenientes de plantas tales como antocianinas y carotenoides, son sensibles a la presencia de factores tales como pH, concentración de sales, reacciones de oxidación; los cuales limitan su uso en la industria de los alimentos (Mapari *et al.* 2005).

Los hongos han sido reportados como potenciales productores de colorantes (Babitha *et al.* 2008). Estudios previos han demostrado que dichos colorantes pueden ser utilizados en la tinción de algodón, seda y lana (Nagia y El-Mohamedy 2007), constituyendo una alternativa no tóxica y no contaminadora (Sharma *et al.* 2012). Adicionalmente, algunos investigadores han demostrado que los colorantes producidos por hongos poseen diversas propiedades biológicas de importancia biotecnológica tales como actividad

antimicrobiana (Teixeira *et al.* 2012) y antifúngica (Geweely 2011).

A nivel mundial, Perú es uno de los principales países exportadores de colorantes naturales como el carmín y bixina, sin embargo, la producción de dichos colorantes naturales puede verse afectada por factores agroclimáticos, lo cual implica ingresos económicos inestables, haciendo que los agricultores utilicen sus recursos para comercializar otros cultivos, por ello es necesario encontrar nuevas fuentes de colorantes naturales provenientes del territorio peruano.

Considerando que probablemente el 90% de la biodiversidad peruana proviene de bosques (Mittermeier *et al.* 2003) y que el valor actual de un gen es en promedio USD 30 millones (Gutiérrez-Correa 2009), es necesario realizar estudios de bioprospección de organismos, microorganismos y genes de dicho territorio, que puedan ser utilizados industrialmente para la generación de bienes y servicios de importancia económica para el país. Estos estudios no sólo generarán información acerca de la biodiversidad peruana sino que también generarán argumentos a favor de su conservación (Gutiérrez-Correa 2009).

1.1.1. Hipótesis

Mediante la bioprospección de hongos nativos provenientes de ambientes no perturbados de la selva peruana, es posible encontrar hongos productores de colorantes naturales.

1.1.2. Objetivos

- **Objetivo general**

Aislar y seleccionar cepas de hongos capaces de producir colorantes a partir de muestras de suelo y basidiocarpos de la selva peruana.

- **Objetivos específicos**

1. Identificar morfológica y molecularmente, las cepas seleccionadas de hongos nativos productores de colorantes naturales.
2. Extraer y realizar una caracterización inicial de los colorantes obtenidos por las cepas seleccionadas.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

El color es una de las características más importantes en la industria, especialmente en la de los alimentos (Mathias-Rettig y Ah-Hen 2014). Los colorantes son también utilizados en la industria cosmética, farmacéutica y textil. En la industria textil, los colorantes utilizados son sintetizados para ser resistentes al sudor, luz, agua, químicos y degradación por microorganismos (Wesenberg 2003), además de la estabilidad que muestran frente a diversos factores tales como pH, temperatura, presión, entre otros (Mahmoud *et al.* 2007). La mayoría de los colorantes utilizados en la industria son sintéticos, de tal manera que su degradación no es espontánea (Seshadri *et al.* 1994). Es por ello que, en la industria textil, se usa este tipo de colorantes a pesar de los efectos negativos que pueden ocasionar en la salud de las personas así como en el medio ambiente (Rai *et al.* 2005, Sharma *et al.* 2012). Debido a esto, es necesario encontrar nuevos colorantes naturales que no sean dañinos y, a su vez, sean estables ante diversos factores propios de algunos procedimientos industriales.

El uso de colorantes naturales ha aumentado significativamente en los últimos años. En la industria de los alimentos, por ejemplo, el mercado de colorantes se estimó en \$1.15 billones en el 2007, 2.5% más que en el 2004. De este monto, \$465 millones provinieron de colorantes naturales, 4.6% más que en el 2004 (Mapari *et al.* 2010).

Los colorantes naturales pueden provenir de diferentes fuentes, como animales, plantas, microorganismos y minerales (Joshi *et al.* 2003). Ejemplos conocidos son la curcumina, proveniente del rizoma de *Curcuma longa* y el carmín, proveniente del hemíptero *Dactylopius coccus* (Pintea 2008).

El Perú es productor de diferentes colorantes naturales tales como: carmín, bixina, marigold, curcumina, antocianinas, oleorresinas (provenientes de la cochinilla), achiote, marigold, palillo, maíz morado y páprika, respectivamente. El carmín es el colorante cuya

producción representa el 80% de la producción nacional, además de abastecer el 90% del mercado mundial. Sin embargo, el precio a nivel mundial es muy variante, por lo cual el agricultor de tunas (alimento de cochinilla), prefiere sembrar cultivos económicamente más atractivos y estables tales como la quinua (ADEX, 2015).

La producción de colorantes por plantas o dependientes de estas está influenciada por factores agro-climáticos y, el perfil químico de metabolitos sintetizados, puede cambiar de producción en producción de acuerdo a dichas condiciones (Mapari *et al.* 2010), lo cual implica una producción variable en términos de cantidad y calidad de metabolitos producidos.

Los microorganismos como levaduras, bacterias, y hongos, son capaces de producir colorantes naturales tales como: carotenoides, flavinas, melaninas, quinonas, específicamente, monascinas, violaceínas, ficocianinas, índigo, entre otros (Dufossé 2006). Los colorantes microbianos producidos cumplen diversas funciones en los microorganismos, tales como: protección contra la radiación ultravioleta, protección contra oxidantes, protección contra situaciones extremas de frío o calor, protección contra agentes antimicrobianos producidos por otros microorganismos, actividad antimicrobiana contra otros microorganismos, adquisición de nutrientes y, en el caso de Cianobacterias, participación en la fotosíntesis (Liu y Nizet 2009). La producción de colorantes microbianos, tales como xantofila, están siendo estudiados debido a su potencial uso en aplicaciones biotecnológicas (Martin *et al.* 2014).

Los colorantes microbianos producidos a escala industrial son: monascorubramina, rubropunctamina, rubropuctatina, monascorubrina, monascina, ankaflavina (*Monascus sp.*), β -caroteno (*Blakeslea trispora*), riboflavina (*Ashbya gossypi*), rojo arpink (*Penicillium oxalicum*), entre otros, cuyo escalamiento industrial ha sido estudiado (Dufossé 2006), (tabla 1). La figura 1 muestra algunas estructuras químicas de dichos colorantes.

A nivel de producción industrial, los colorantes sintetizados por microorganismos otorgan dos grandes ventajas frente a aquellos provenientes de otras fuentes naturales: mayores

cantidades de colorantes producidos por fermentación y fácil manipulación de las cepas productoras (Canizares *et al.* 1998). Otras ventajas son: crecimiento en medios de cultivo de bajo costo y procesos fáciles de extracción (Parekh *et al.* 2000).

Los hongos son organismos unicelulares o pluricelulares con la capacidad metabólica de sintetizar diferentes tipos de metabolitos. Los metabolitos secundarios se diferencian de los primarios en que no participan en reacciones básicas fundamentales que garanticen la vida del microorganismo. Generalmente son producidos en la fase exponencial del crecimiento fúngico y correlacionados a un determinado estado de diferenciación morfológica (Keller *et al.* 2005). Los terpenos, policétidos, péptidos y alcaloides son los grupos representativos de metabolitos secundarios producidos por hongos. Sus estructuras químicas se muestran en la figura 2.

Tabla 1: Colorantes naturales producidos por microorganismos (de uso o potencial uso alimenticio)

Molécula	Color	Microorganismo	Estado
Ankaflavina	Amarillo	<i>Monascus sp.</i> (Hongo)	IP
Antroquinona	Rojo	<i>Penicillium oxalicum</i> (Hongo)	IP
Astaxantina	Rojo-rosado	<i>Xantofilomices dendrorhous</i> (Levadura)	DS
		<i>Agrobacterium aurantiacum</i> (Bacteria)	RP
		<i>Paracoccus carotinifaciens</i> (Bacteria)	RP
Cantaxantina	Rojo oscuro	<i>Bradyrhizobium sp.</i> (Bacteria)	RP
Licopeno	Rojo	<i>Blakeslea trispora</i> (Hongo)	DS
		<i>Fusarium sporotrichioides</i> (Hongo)	RP
Melanina	Negro	<i>Saccharomyces neoformas var. nigricans</i> (Levadura)	RP
Monascorubramina	Rojo	<i>Monascus sp.</i> (Hongo)	IP
Naftoquinona	Rojo sangre profundo	<i>Cordyceps unilateralis</i> (Hongo)	RP
Riboflavina	Amarillo	<i>Ashbya gossypi</i> (Hongo)	IP
Rubrolona	Rojo	<i>Streptomyces echinoruber</i> (Bacteria)	DS
Rubropunctatina	Anaranjado	<i>Monascus sp.</i> (Hongo)	IP
Torularodina	Rojo-anaranjado	<i>Rhodotorula sp.</i> (Levadura)	DS
Zeaxantina	Amarillo	<i>Flavobacterium sp.</i> (Bacteria)	DS
		<i>Paracoccus zeaxanthinifaciens</i> (Bacteria)	RP

Continuación...

β-caroteno	Amarillo-anaranjado	<i>Blakeslea trispora</i> (Hongo)	IP
		<i>Fusarium sporotrichioides</i> (Hongo)	RP
		<i>Mucor circinelloides</i> (Hongo)	DS
		<i>Neurospora crassa</i> (Hongo)	RP
		<i>Phycomyces blakesleeanus</i> (Hongo)	RP
Desconocido	Rojo	<i>Penicillium purpurogenum</i> (Hongo)	DS
		<i>Paecilomyces sinclairii</i> (Hongo)	RP

*IP: Producción industrial, DS: Estado de desarrollo, RP: Proyecto de investigación.

FUENTE: Dufossé (2006).

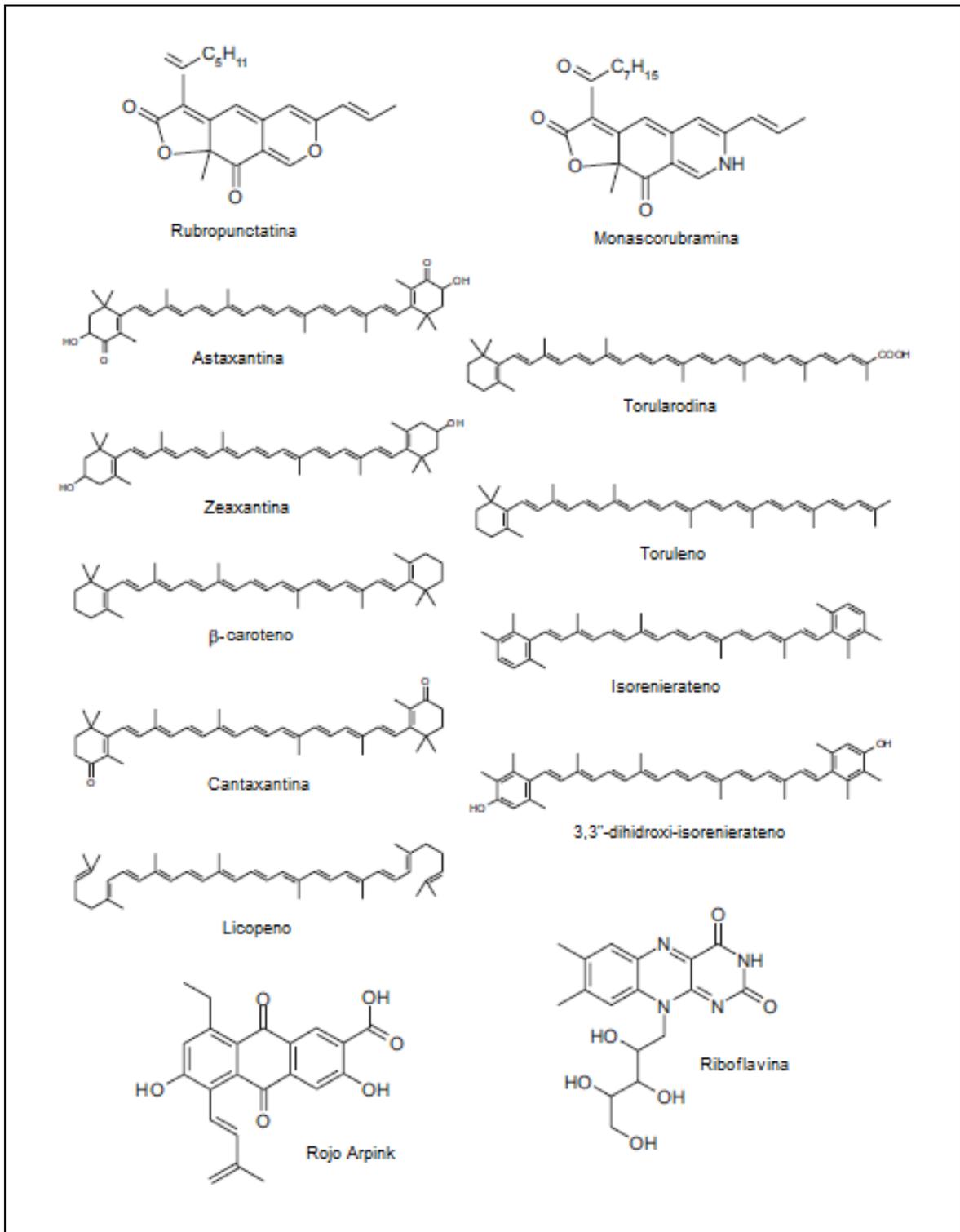


Figura 1: Estructura química de algunos colorantes de uso alimenticio producidos por microorganismos

FUENTE: Dufossé (2006)

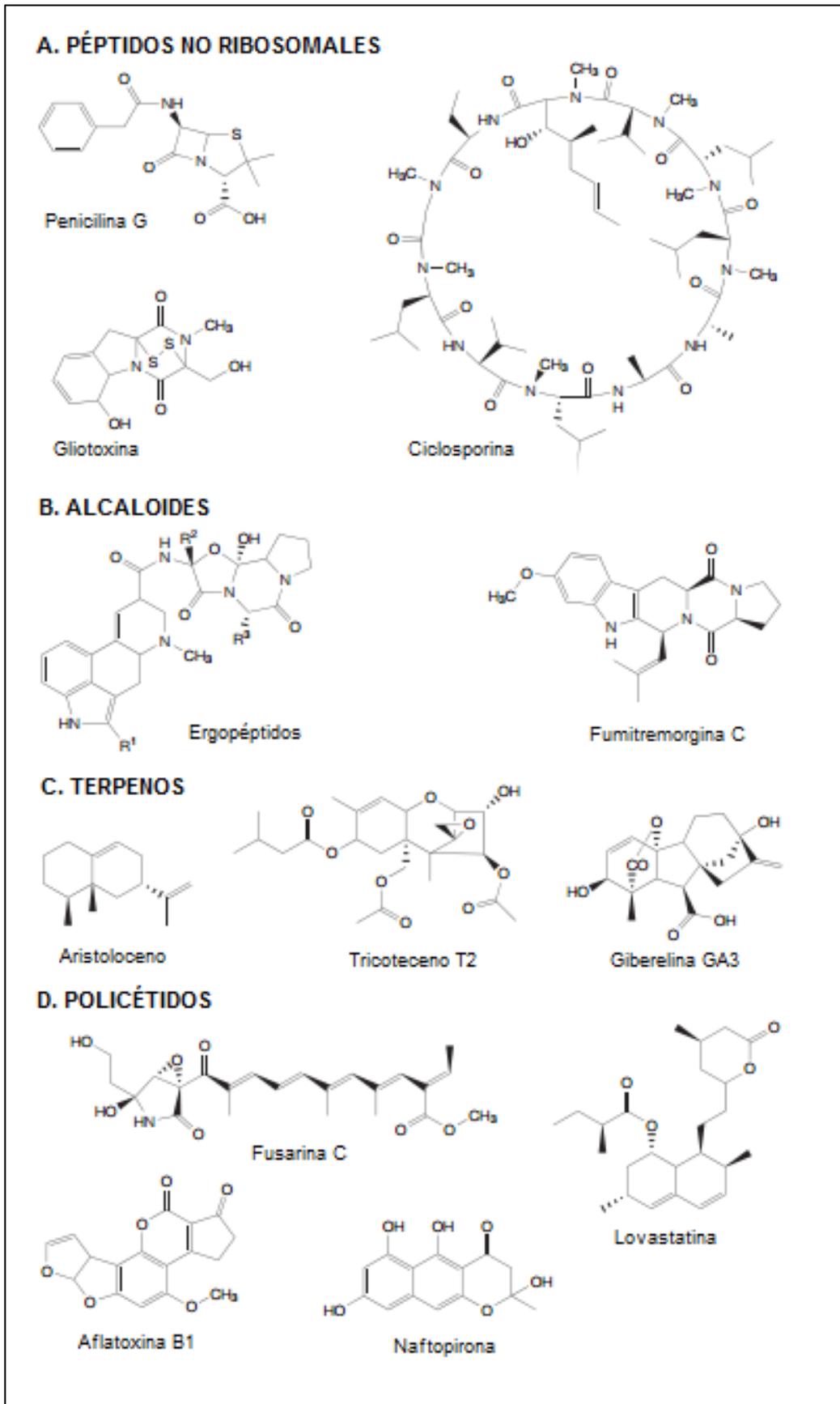


Figura 2: Estructura química de metabolitos secundarios producidos por hongos

FUENTE: Keller *et al.* (2005).

La identificación de metabolitos de diversa naturaleza y funciones se logra mediante el uso de herramientas analíticas tales como espectroscopía UV/Visible y espectroscopía en el Infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) (Sahu *et al.* 2014) (Malek *et al.* 2011) (Pervez *et al.* 2015). La espectroscopía UV/Visible brinda información acerca de la naturaleza de los enlaces químicos de un analito, los cuales vienen determinados por transiciones electrónicas, las cuales han sido relacionadas con diversos compuestos así como grupos funcionales (tablas 2 y 3) (Harvey 2000). Actualmente, la identificación de metabolitos secundarios también se viene realizando mediante el uso de técnicas analíticas tales como Resonancia magnética nuclear, Cromatografía líquida de alta resolución o de gases, complementada con técnicas de análisis como la espectrometría de masas (Visagie *et al.* 2014) (Dona *et al.* 2016). Así mismo, la espectroscopía de Infrarrojo otorga información sobre el comportamiento de los electrones presentes en los enlaces químicos de un metabolito frente a radiación infrarroja, el cual viene determinado por la fuerza de enlaces presentes en el analito así como la masa de los elementos a cada extremo de dichos enlaces. Es por ello que este método permite determinar la presencia de grupos funcionales en metabolitos de interés (Harvey 2000) (Sahu *et al.* 2014). Es así que, mediante el uso de la información otorgada por ambas técnicas es posible caracterizar inicialmente un determinado metabolito.

Tabla 2: Longitudes de onda de máxima absorción de algunos grupos de metabolitos secundarios conocidos

Grupos de metabolitos	Longitud de onda de máxima absorción	Referencia
Betalaínas	476nm - 600nm	Al-Alwani <i>et al.</i> 2015
Flavonoides	240nm - 280nm	Harborne <i>et al.</i> 1975
	300nm - 400nm	
Antocianinas	260nm - 280 nm	Giusti y Wrolstad 2001
	490nm - 550 nm	
Quinonas	290nm	Mistry 2009
	340nm-440 nm	

Tabla 3: Transiciones electrónicas de los orbitales moleculares n, σ y π correspondientes a grupos funcionales de diversos metabolitos

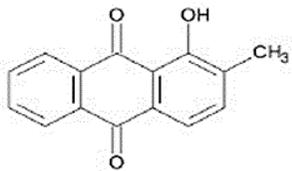
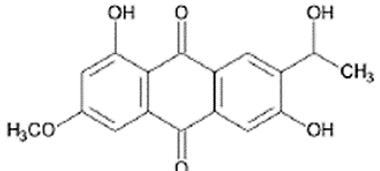
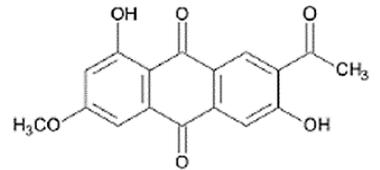
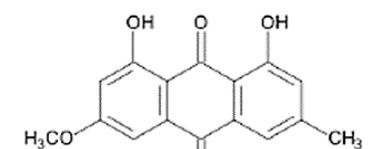
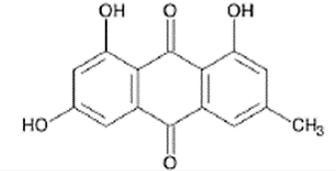
Transición	Rango de longitud de onda	Ejemplos
$\sigma \rightarrow \sigma^*$	<200 nm	C–C, C–H
$n \rightarrow \sigma^*$	160–260 nm	H ₂ O, CH ₃ OH, CH ₃ Cl
$\pi \rightarrow \pi^*$	200–500 nm	C=C, C=O, C=N, C \equiv C
$n \rightarrow \pi^*$	250–600 nm	C=O, C=N, N=N, N=O

FUENTE: Harvey (2000)

La Bioprospección es la búsqueda dirigida de nuevos microorganismos, los cuales pueden ser capaces de sintetizar metabolitos de interés, biocatalizadores u otros productos de importancia industrial, como enzimas (Strobel y Daysi 2003) (Mani *et al.* 2015). A la fecha, se han realizado estudios que han concluido que los hongos provenientes de muestras de suelo de la selva peruana producen metabolitos de potencial uso en la industria (Vega *et al.* 2012, Cerrón *et al.* 2015). Estudios de bioprospección de hongos productores de colorantes naturales se han reportado en otras regiones: Celestino *et al.* (2014) aislaron, a partir de muestras de suelo de la amazonía brasileña, cepas de *Penicillium sclerotiorum*, *Aspergillus calidoustus*, *Penicillium citrinum* y *Penicillium purpurogenum*, capaces de producir colorantes por fermentación sumergida. La cepa *P. sclerotiorum* 2AV2, fue la de mayor producción y el colorante producido por esta cepa fue identificado, mediante Resonancia magnética nuclear (NMR), como esclerotiorina. Además, Da Costa *et al.* (2016) aislaron y seleccionaron cepas productoras de colorantes provenientes de cuevas preservadas de Brasil, identificadas como *Aspergillus sydowii* (CML2967), *Aspergillus aureolatus* (CML2964), *Aspergillus keveii* (CML2968), *Penicillium flavigenum* (CML2965), *Penicillium chermesinum* (CML2966), las cuales producen colorantes amarillos, anaranjados y rojos.

Son varios los tipos de colorantes producidos por hongos. Estudios previos han demostrado que los principales compuestos fúngicos que otorgan color a estructuras en hongos son las hidroxiantraquinonas (Caro *et al.* 2012), que son derivados de las antraquinonas, pertenecientes a la familia de las Quinonas, los cuales, al ser analizados por el espectrómetro de absorción en el infrarrojo, presentan picos de absorción entre 1670-1620 cm⁻¹ (tabla 4).

Tabla 4: Hidroxiantraquinonas producidas por hongos y sus principales características químicas

NOMBRE	COLOR	ESTRUCTURA QUÍMICA	PROPIEDADES QUÍMICAS	REFERENCIA
Paquibasin 2-metil-1-hidroxi-antraquinona	Amarillo		UV (EtOH) max 403, 281, 252, 224 nm; IR (KBr) ν_{max} 3083, 2967, 2933, 2862, 1677, 1642, 1593, 1578, 1403, 1380, 1338, 1311, 1290, 1235, 1148, 1068, 1039, 1002, 929, 870, 805, 793, 769, 712 cm^{-1} 1H NMR (CDCl ₃ , 500 MHz) δ 12.67, 8.20, 7.74, 7.55, 7.17, 2.45.	Bick y Rhee 1966
2-(1-hidroxi-etil)-3,8-dihidroxi-6-metoxi-antraquinona	Anaranjado		UV (MeOH) max 466, 341, 305, 285, 219 nm IR (KBr) ν_{max} 3420, 1667, 1630, 1580, 1480, 1440, 1390, 1360, 1305, 1270, 1240, 1215, 1160, 1080, 1030, 1005, 970, 930, 900, 875, 835, 800 cm^{-1} 1H NMR (CDCl ₃ , 500 MHz) 12.96, 7.94, 7.76, 7.35, 6.70, 5.20, 3.93, 1.68.	Baker y Tatum 1998 Nagia y El-Mohamedy 2007
2-acetil-3,8-dihidroxi-6-metoxiantraquinona	Amarillo		UV (MeOH) max 420, 348, 307, 280, 233 nm IR (KBr) ν_{max} 1672, 1655, 1630, 1575, 1480, 1450, 1410, 1380, 1300, 1250, 1205, 1170, 1125, 1025, 970, 935, 905, 890, 865, 830, 805, 755, 745, 715, 695 cm^{-1} 1H NMR (CDCl ₃ , 500 MHz) 12.91, 12.72, 8.76, 7.81, 7.39, 6.74, 2.81.	Baker y Tatum 1998 Nagia y El-Mohamedy 2007
Parietin 6-metoxi-3-metil-1,8-dihidroxi-antraquinona	Amarillo		UV (EtOH) max 435, 283, 265, 253, 226 nm IR (CHCl ₃) ν_{max} 2929, 2854, 1626, 1568, 1483, 1140 cm^{-1} NMR (CDCl ₃ , 500 MHz) 7.08, 7.62, 7.36, 6.69, 3.94, 2.45.	Smetanina <i>et al.</i> 2007
Emodin 3-metil-1,6,8-trihidroxi-antraquinona	Anaranjado		UV (EtOH) max 437, 289, 265, 252, 222 nm IR (KBr) ν_{max} 3353, 3061, 1730, 1670, 1624, 1558, 1475, 1451, 759 cm^{-1} 1H NMR (CDCl ₃ , 500 MHz) 12.07, 11.99, 11.19, 7.45, 7.12, 7.09, 6.56, 2.40.	Manojlovic <i>et al.</i> 2006 Tanaka <i>et al.</i> 2002 Tang <i>et al.</i> 2007

Las azafilonas, son metabolitos secundarios fúngicos que cumplen diversos roles biológicos (Gao *et al.* 2013). Algunos de ellos son incoloros, mientras que otros compuestos son de color amarillo (Ankaflavina, monascina), anaranjado (monascorubrina, rubropuctatina) y púrpura (monascorubramina, rubropuctamina). (Caro *et al.* 2012). Huang *et al.* (2011), reportaron tres nuevas azafilonas producidas por la cepa *Penicillium chermesinum*, las cuales fueron identificadas utilizando Espectroscopía de absorción en el infrarrojo y Resonancia magnética nuclear. Sus propiedades químicas se presentan en la tabla 5.

Tabla 5: Azafilonas producidas por *Penicillium chermesinum* y sus principales propiedades químicas

NOMBRE	COLOR	PROPIEDADES QUÍMICAS	REFERENCIA
Quermesinona A	Incoloro	UV (MeOH) max 244 (3.73), 350 (4.33) nm IR (KBr) v _{max} 3428, 2968, 2903, 2877, 1711, 1675, 1596, 1544, 1183, 1183 cm ⁻¹	Huang <i>et al.</i> 2011
Quermesinona B	Blanco	UV (MeOH) max 244 (3.78), 349 (4.43) nm IR (KBr) v _{max} 2977, 2935, 2878, 1782, 1706, 1654, 1539, 1383, 1301, 1216, 1183, 1109, 1064 cm ⁻¹	Huang <i>et al.</i> 2011
Quermesinona C	Blanco	UV (MeOH) max 334 (4.14) nm IR (KBr) v _{max} 3404, 2969, 2928, 2879, 1778, 1708, 1673, 1619, 1570, 1387, 1305, 1221, 1118, 1095, 1039 cm ⁻¹	Huang <i>et al.</i> 2011

En general, se ha reportado que cepas del género *Penicillium* y *Talaromyces* son productoras de colorantes amarillos, anaranjados, rojo y marrones. En el caso de *Pencillium*, existen cepas provenientes de la Amazonía y de muestras de tierra que producen colorantes amarillos del tipo antraquinonas (Texeira *et al.* 2012, Duffosé 2006). Además, el colorante comercial Arpink red™ (rojo), producido por la cepa *Penicillium oxalicum* var. armeniaca CCM 8242, es también una hidroxiantraquinona (Sardaryan

2002). Por otro lado, son varias las cepas reportadas del género *Talaromyces* productoras de colorantes rojos del tipo azafilonas, los cuales guardan muchas similitudes con los colorantes producidos por *Monascus sp.* (Yilmaz *et al.* 2012).

En el caso del género *Aspergillus*, las siguientes especies han sido reportadas como posibles productoras de colorantes: *A. glaucus*, *A. cristatus* y *A. repens*. Los principales colorantes producidos por cepas de estas especies han sido identificados como hidroxiantraquinonas: emodin (colorante amarillo), questin (colorante entre amarillo y anaranjado-marrón), catenarin (colorante rojo), entre otros (Caro *et al.* 2012). Con referencia al género *Trichoderma*, se ha reportado que las especies *T. aureoviride*, *T. harzianum*, *T. polysporum*, y *T. viride* son productoras de colorantes antraquinonas como el paquibasin (amarillo), crisofanol (anaranjado), emodin (amarillo), entre otros (Caro *et al.* 2012).

Si bien muchos metabolitos producidos por hongos tienen potencial uso en la industria, la síntesis de otros son sumamente perjudiciales, tal es el caso de las micotoxinas. En regiones de Asia, *Monascus purpureus* ha sido usado ancestralmente para la elaboración de alimentos coloreados tales como queso rojo, anka (arroz rojo), entre otros (Lin *et al.* 2008). Los colorantes producidos por *Monascus sp.* son generalmente del tipo azafilonas (ankaflavina, monascina, monascorubrina, rubropunctamina, rubropunctina, monascorubramina) (Mapari *et al.* 2010). Existen reportes de que algunas cepas de *Monascus sp.* también coproducen citrinina, micotoxina nefrotóxica en humanos (Blanc *et al.* 1995), además de otros compuestos tóxicos, tales como monascopiridinas (Wild *et al.* 2003). Estudios previos han demostrado que los colorantes producidos por cepas de la especie *Penicillium marneffeii*, comparten la misma ruta biosintética que la micotoxina citrinina, (Woo *et al.* 2014) (Figura 3), es por ello que es necesario realizar un tamizado de potenciales cepas productoras de colorantes que no sean patogénicas ni productoras de toxinas (Mapari *et al.* 2005).

Tabla 6: Principales micotoxinas producidas por *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* y *Fusarium sp.*

Micotoxina	Principal organismo productor
Aflatoxina B1	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i> <i>Aspergillus nomius</i> , <i>Aspergillus niger</i>
Aflatoxina B2	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i> <i>Aspergillus nomius</i> , <i>Aspergillus niger</i>
Aflatoxina G1	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i> <i>Aspergillus nomius</i> , <i>Aspergillus niger</i>
Aflatoxina G2	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i> <i>Aspergillus nomius</i> , <i>Aspergillus niger</i>
Esterimagtocistina	<i>Aspergillus versicolor</i>
Ocratoxina A	<i>Aspergillus ochraceus</i>
Ácido aspergílico	<i>Aspergillus flavus</i>
Ácido kojico	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Ácido terreico	<i>Aspergillus terreus</i>
Fumagilina	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Citreoviridina	<i>Penicillium citreoviride</i>
Citrinina	<i>Penicillium citrinum</i>
Ácido penicílico	<i>Penicillium puberulum</i>
Ácido micofenólico	<i>Penicillium brevicompactum</i>
Griseofulvina	<i>Penicillium janczewski</i>
Rubratoxina A	<i>Penicillium rubrum</i>
Rubratoxina B	<i>Penicillium rubrum</i>
Ácido Ciclopiazónico	<i>Penicillium cyclopium</i>
Patulina	<i>Penicillium patulum</i>
Brevianamida A	<i>Penicillium viridicatum</i>
Deoxinivalenol	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium crookwellense</i>
Tonina T2	<i>Fusarium poae</i> , <i>Fusarium sporotrichioides</i>
Fumonisina B1	<i>Fusarium moniliforme</i> , <i>Fusarium proliferatum</i>
Zearalenona	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium crookwellense</i>

FUENTE: Oancea y Stoia (2008).

Varios son los métodos usados para la identificación de micotoxinas en alimentos: ELISA, identificación microbiológica, cromatografía y fluorescencia. Sin embargo, para estas pruebas se requieren de laboratorios bien equipados, el manejo de reactivos controlados, de personal calificado y, sobre todo, de largos períodos de tiempo para realizar una prueba de identificación (Hussain *et al.* 2015). Es por ello que se hace necesario el desarrollo de

técnicas rápidas de detección de micotoxinas. Muchos son los estudios reportados en los que se usa técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como método de detección rápida de aflatoxinas (Hadi *et al.* 2011), así como de patulina (Dombrik-Kurtzman 2007).

Las aflatoxinas son micotoxinas producidas por miembros del grupo *Aspergillus* sección *Flavus*, particularmente *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus nomius*, *Aspergillus oryzae* (Pitt 2000, Gallo *et al.* 2013). Son las sustancias mutagénicas y carcinógenas más potentes conocidas (Gareis y Wolf 2000). La aflatoxina B1, al entrar a las células vivas de los animales, es oxidada enzimáticamente a epóxido, que reacciona con residuos de guanina del ADN, lo cual le confiere un gran potencial carcinógeno. Sin embargo, este complejo puede ser degradado posteriormente a cadenas dihidroxiladas levemente tóxicas que reaccionan con residuos de lisina de enzimas. Es esa la manera en la que es metabolizada y la reacción global del metabolismo de Aflatoxina B1, es determinante de su toxicidad en el organismo (Moss 2002). La ruta de biosíntesis de Aflatoxina ha sido muy estudiada y ya ha sido establecida (Bennet *et al.* 1997, Minto *et al.* 1997, Prieto *et al.* 1996, Woloshuk y Prieto 1998).

Es importante resaltar que, si bien determinada especie ha podido ser denominada como productora de alguna micotoxina, no todas las cepas de dicho grupo pueden tener esta característica. Tal es el caso de *Aspergillus flavus*, cuyas cepas pueden ser diferenciadas en aflatoxigénicas y no aflatoxigénicas (Mayer *et al.* 2003). Además, mediante técnicas de PCR, se han determinado cuatro genes que codifican enzimas de la ruta de biosíntesis de aflatoxinas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*: AflR, de función reguladora y activador de la transcripción; Nor1, Ver1 y OmtA, cuyo sustrato son ácido norsolorínico, versicolorin y O-metilesterigmatocistina, respectivamente (Chen *et al.* 2002). La Figura 4 muestra la ruta de biosíntesis de aflatoxina.

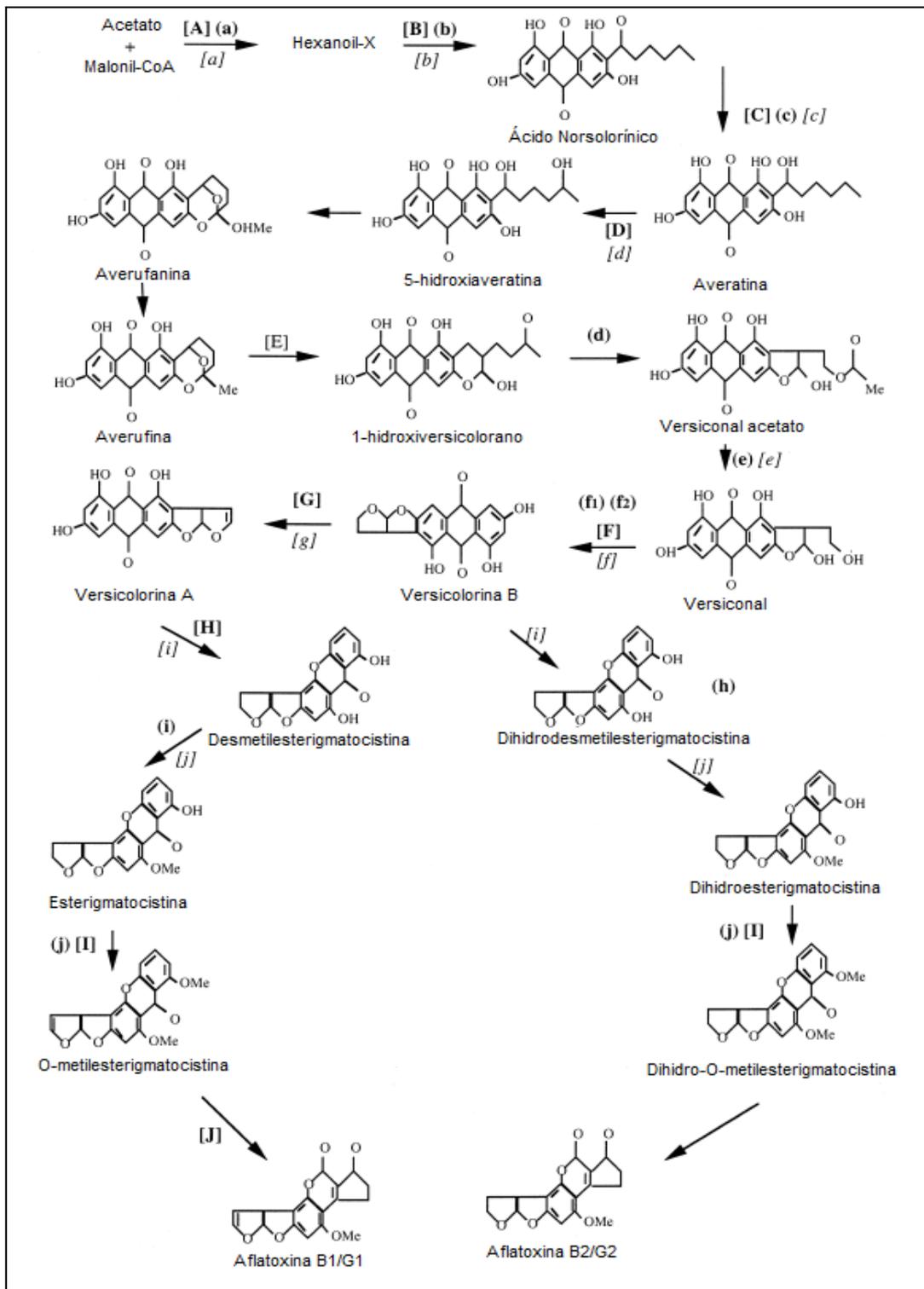


Figura 4: Ruta de biosíntesis de aflatoxina y esterigmatocistina

Enzimas involucradas: (a) Ácido graso sintasa, (b) Policétido sintasa, (c) Ácido norsolorínico reductasa, (d) hemiacetal versiconal acetato reductasa, (e) esterasa, (f1) Versicolorina B sintasa, (f2) versiconyl cyclase, (g) desaturase, (h) O-metiltransferasa (MT-II), (i) O-metiltransferasa, (j) O-metiltransferasa (MT-I). Genes involucrados en la Biosíntesis de Aflatoxina: [A] *fas1A* y *fas2A*, [B] *pkSA*, [C] *nor1*, *norA*, [D] *avnA*, [E] *avf1* (*af1B* y *af1W*), [F] *vbs*, [G] *verB*, [H] *ver1A*, *af1S*, [I] *omtA* y [J] *ord1*. Genes involucrados en la Biosíntesis de Esterigmatocistina: [a] *stcJ* y *stcK*, [b] *stcA*, [c] *stcE*, [d] *stcF*, [e] *stcI*, [f] *stcN*, [g] *stcL*, [h] *stcS*, [i] *stcU* y [j] *stcP*.

FUENTE: Sweeney y Dobson (1999).

La ocratoxina A (OTA) es una micotoxina producida por diferentes especies de *Aspergillus*. En clima temperado, es producido por *Penicillium verrucosum* y *Penicillium nordicum* (Larsen *et al.* 2001). Este metabolito tiene un tiempo de residencia prolongado en animales, pudiendo ser encontrado en carne de ganado comercial proveniente de animales previamente alimentados con comida contaminada con esta micotoxina. Su toxicidad radica en que es nefrotóxico, asociado a nefropatologías en cerdos y posiblemente en humanos, además de ser un posible carcinógeno (Moss 2002).

La ruta de biosíntesis de OTA no ha sido aún establecida, por lo cual no existe información disponible acerca de las enzimas o genes involucrados en cada paso de la biosíntesis, sin embargo, se ha determinado la posible participación del gen *pks* (policétido sintasa), cuya ausencia en cepas productoras de OTA genera la interrupción de la biosíntesis de la misma (O'Callaghan *et al.* 2003). Estudios previos han demostrado que el uso de cebadores degenerados puede ser de gran ayuda en la identificación del potencial genético de producción de policétidos en hongos (Amnuaykanjanasin *et al.* 2005).

La patulina es un metabolito producido por ciertas especies del género *Penicillium* y *Aspergillus*. Es contaminante de cultivos tales como cereales, leguminosas, frutas, además de encontrarse en alimentos procesados y comida para animales domésticos. Ha sido encontrado en manzanas y jugos de manzana de consumo humano (Oancea y Stoia 2008). Además, es fácilmente excretado del cuerpo y no hay evidencias claras que comprueben que es carcinógeno al consumirlo directamente de forma oral. Sin embargo, su presencia en productos procesados es un indicador de malas prácticas de manufactura (Moss 2002). Son aproximadamente 15 los genes involucrados en su biosíntesis y sólo unos pocos han sido identificados (Puel *et al.* 2010), tal es el caso del gen *idh*, el cual codifica la enzima IDH, encargada de la conversión de isoepoxidon a filostina, en la ruta de biosíntesis de patulina (Fedeshko 1992). En la figura 5 se describe la ruta de biosíntesis de patulina.

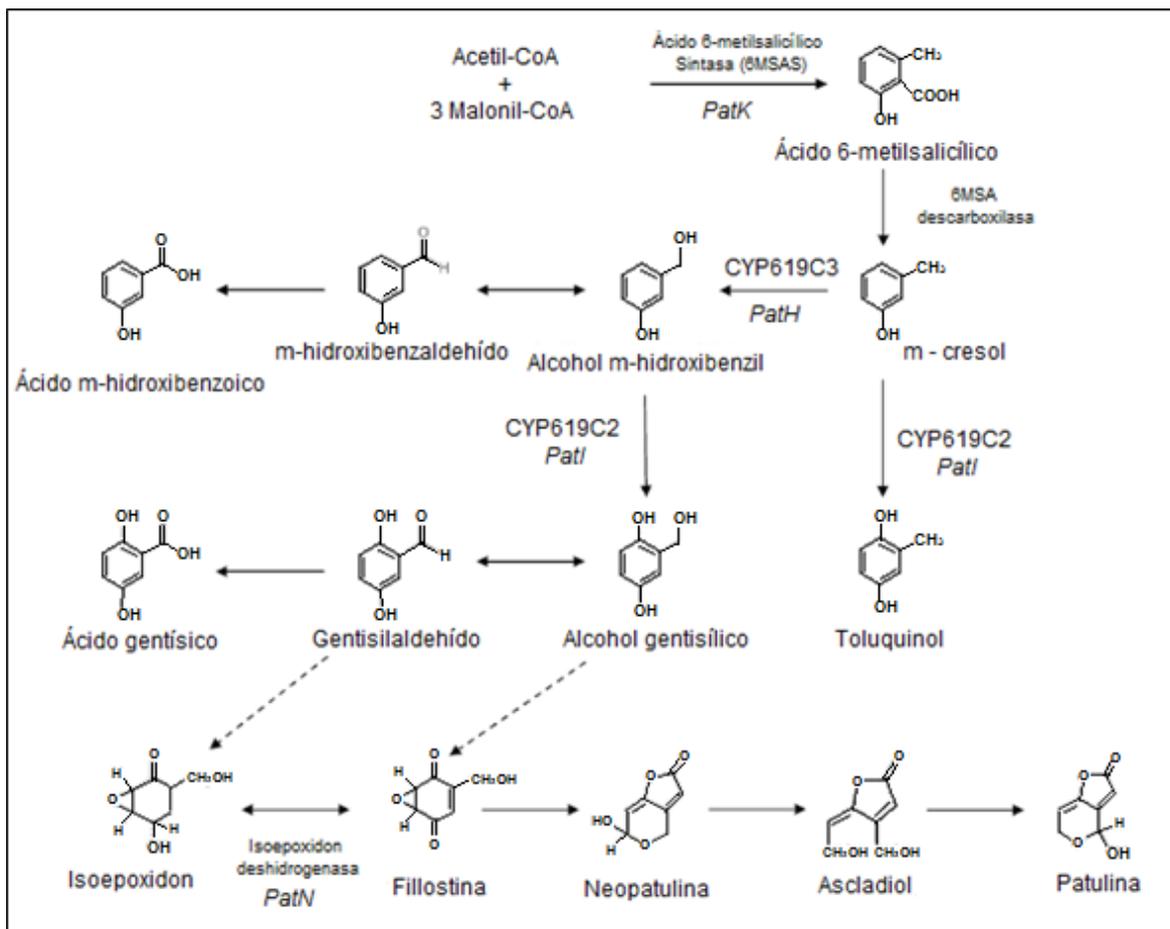


Figura 5: Ruta de biosíntesis de patulina

FUENTE: Puel *et al.* (2010).

Históricamente, la morfología era la herramienta de la taxonomía utilizada en la clasificación de hongos en especies y géneros. Sin embargo, cada especie puede desarrollar diferentes morfologías ya que estas son influenciadas por las condiciones de inoculación, los métodos de siembra, entre otras variables. Es por ello que la morfología de cepas de la misma especie difiere de un laboratorio en otro, por lo tanto es necesario el uso de otras herramientas que permitan la identificación y que no sean tan sensibles a variaciones en sus resultados (Okuda *et al.* 2000). La caracterización morfológica (micro y macromorfología) debe ser realizada en condiciones de inoculación complementada con técnicas analíticas de identificación de extrolitos así como con estudios de identificación molecular, para lograr la correcta identificación de especies (Visagie *et al.* 2014).

La región espaciadora interna transcrita del ADN ribosomal (ITS) ha sido denominada como el código de barras oficial de hongos (Schoch *et al.* 2012), por ello es que los cebadores ITS amplifican ADN de una gran variedad de especies y, por ello, son los más utilizados en estudios de identificación (Samson *et al.* 2014). Sin embargo, el grado de discriminación entre especies filogenéticamente cercanas es bajo, tal y como ocurre en especies de la sección Fumigati del género *Aspergillus*, reportado por Hubka *et al.* (2013). Por ello, se recomienda complementar los estudios de identificación molecular utilizando otros cebadores tales como Beta tubulina (*BenA*) y Calmodulina (*CaM*), los cuales amplifican ADN sólo de Ascomicetos y Deuteromicetos, con lo cual es posible que su uso sea exclusivo para determinar especies de estos grupos específicos (Glass y Donaldson 1995). Los tamaños de los productos amplificados en términos de pares de bases (pb) de los cebadores antes mencionados son los siguientes: 500 a 600 pb para gen de ITS (White *et al.* 1990), 340 a 500 pb para el gen *BenA* (Glass y Donaldson 1995) y de 500 a 600 pb para el gen *CaM* (Hong *et al.* 2006).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

- **Materiales de uso rutinario**

- Algodón
- Asa de Khole
- Bolsas de muestreo
- Cámara de Newbauer
- Cinta de embalaje
- Gorra
- Guantes
- Láminas porta y cubre objeto.
- Mascarilla
- Matraces de 125 y 250 mL
- Microtubos de 1.5 mL
- Microtubos de 2.0 mL
- Papel filtro de paso rápido
- Pipetas graduadas
- Placas de vidrio de 10cmx15cm
- Probetas
- Puntas de micropipeta de 1-10 μ l, 10-200 μ l, 100-1000 μ l
- Sacabocado
- Tubos de centrifuga de 15 mL y 50 mL
- Tubos de ensayo 25 x 250 mm
- Vasos de precipitado
- Viales de 5 mL

- **Medios de Cultivo**
 - Agar papa dextrosa (PDA)
 - Caldo papa dextrosa
 - Agar extracto de malta (MEA)
 - Agar czapeck extracto de levadura (CYA)
 - Agar creatina sucrosa (CREA)

- **Soluciones**
 - Acetonitrilo
 - Etanol al 70% y al 95%
 - Etil acetato
 - Tolueno
 - Tween 80
 - Metanol
 - Tetraciclina 10 mg/ml
 - Solución de lejía al 50% v/v
 - Suero fisiológico 0.85% p/v

- **Reactivos de Biología Molecular**
 - Agarosa
 - Agua Libre de Nucleasas
 - Cloroformo/ alcohol isoamílico
 - Cloruro de etidio
 - Dinucleotidos Trifosfatados (dNTPS)
 - GoTaq Polimerasa
 - Marcador de corrida
 - Tampón acetato de sodio 3M
 - Tampón de corrida de ADN para electroforesis
 - Tampón de extracción
 - Tampón de reacción GoTaq
 - Tampón TrisHCl 10mM
 - Cebadores

- **Equipos**

- Agitador mecánico orbital
- Autoclave
- Balanza analítica
- Balanza de platillo
- Baño María
- Cámara de flujo laminar
- Cámara de Newbauer
- Cámara fotográfica digital
- Cámara y peines de electroforesis
- Centrífuga
- Congeladora de -20°C
- Congeladora de -80°C
- Desionizador de agua
- Equipo de Baño María
- Espectrofotómetro de absorción en el Infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)
- Espectrofotómetro de absorción UV/Visible
- Horno de secado
- Horno microondas
- Incubadora de 28°C
- Microcentrífuga
- Micropipetas
- Potenciómetro
- Purificador de H₂O
- Refrigeradora
- Shaker
- Sonificador
- Termociclador
- Transiluminador
- Vórtex

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Aislamiento y tamizado de cepas productoras de colorantes

Se recolectó basidiocarpos y muestras de tierra de bosques de Contamana e Iquitos con el fin de encontrar hongos productores de colorantes. Los basidiocarpos fueron desinfectados con una solución de lejía y agua destilada (1:1) por 10 minutos, y luego fueron enjuagados con agua destilada estéril para remover las impurezas faltantes. Los basidiocarpos limpios y desinfectados fueron cortados, en condiciones de esterilidad, y sembrados en agar PDA (papa 5% p/v, glucosa 20% p/v, tetraciclina 0,1 g/L, agar 0.15% p/v). Las muestras de tierra fueron sembradas en este mismo medio por el método de las diluciones sucesivas (1:2; 1:10; 1:20; 1:50; 1:100), a 28°C por siete días.

Adicionalmente, se evaluó la capacidad de producción de colorantes de hongos provenientes del cepario del Laboratorio de micología y biotecnología. Para esto, se reactivaron los microorganismo del cepario en agar papa dextrosa por 72 horas a 28°C. Las cepas reactivadas fueron nuevamente sembradas en Agar PDA e incubadas a 28°C por 7 días. Las cepas en las que se evidenció la producción de colorantes fueron seleccionadas.

3.2.2. Caracterización morfológica y fisiológica de cepas productoras de colorantes

Para reconocer los caracteres taxonómicos de importancia en las cepas seleccionadas, se hicieron cultivos en agar extracto de malta (MEA) por el método de Cámara húmeda para dilucidar la micromorfología de estas. Además, las cepas productoras fueron sembradas en diferentes medios de cultivo tales como: agar czapek extracto de levadura (CYA), agar extracto de malta (MEA), agar creatina sucrosa (CREA) para determinar sus características fisiológicas, según lo reportado por Visagie *et al.* (2014).

3.2.3. Extracción de ADN

El procedimiento para la obtención de ADN se desarrolló de la siguiente manera: inicialmente, se pesó 300 µg de biomasa molida con nitrógeno líquido en microtubos de 1.5 mL. Se agregaron 700 µL de tampón de extracción (50 mM TrisHCl a pH 7.2, 50 mM EDTA, dodecil sulfato sódico 3%, 2-mercaptoetanol 1%). Se llevó al vórtex por 2 minutos y se incubó a 65°C por 1 hora. Luego, se agregaron 600 µL de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se mezcló por inversión y se centrifugó a 14000 rpm a 4°C por 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante de cada microtubo y se trasladó a uno nuevo. Se adicionó a cada nuevo microtubo tampón acetato de sodio 3M a pH 5.8 (cantidad igual a la mitad del volumen del sobrenadante recuperado), se mezcló por inversión y se refrigeró a 4°C por 30 minutos. Posteriormente, la mezcla fue centrifugada a 14000 rpm por 10 minutos y el sobrenadante fue recuperado. Luego, se agregó isopropanol (cantidad igual al doble del volumen del sobrenadante recuperado), se mezcló por inversión y se refrigeró a -20°C por una hora para permitir la precipitación del material genético. Se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet fue lavado con 500 µL de etanol al 70%, se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante fue descartado. El pellet obtenido secó a temperatura ambiente y se eluyó en 20 µL de tampón Tris (TrisHCl 10 mM a pH 8.2). Se colectaron las 4 repeticiones de una misma muestra en un solo microtubo y finalmente, se agregaron 15 µL de RNAsa (10mg/mL) a cada microtubo, se incubó a 37°C por 15 minutos.

a. Análisis Cualitativo

Este análisis permitió obtener información sobre la calidad del ADN extraído. Se realizó electroforesis horizontal en gel de agarosa con tampón de corrida TAE 1X (Tris, acetato, EDTA) y se agregó 1% de una solución de bromuro de etidio 5 µg/mL en el gel. Cada pozo fue cargado con 6 µL volumen final (5 µL de ADN y 1 µL de tampón de carga). Se utilizó como marcador de peso el fago lambda digerido con la enzima de restricción Hind III. Se corrieron las muestras a 90 V por 60 minutos y, posteriormente, el gel se llevó al documentador de imágenes (ChemiDoc XRS - BioRad) para capturar la imagen y evaluar el tamaño de bandas.

b. Análisis Cuantitativo

Con este análisis se determinó la concentración de ADN extraído. Se leyeron las absorbancias de las muestras de ADN extraídas en el espectrofotómetro Nanodrop 2000 de la marca Thermo Scientific™.

3.2.4. Amplificación de la región espaciadora interna (ITS) mediante pcr convencional y genes Beta tubulina (*BenA*), Calmodulina (*CaM*)

Se preparó la mezcla inicial para cada reacción de acuerdo a la tabla 7:

Tabla 7: Reactivos y cantidades utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Reactivos	Volumen final	Concentración final
Tampón de reacción 5X	4 µL	1X
Cloruro de magnesio	1 µL	2.5 mM
Mix de dNTP, 5mM cada uno	1 µL	0.25 mM
Cebador Forward 10µM	1 µL	0.5 µM
Cebador Reverse 10µM	1 µL	0.5 µM
Go Taq Polimerasa 5U/uL	0.15 µL	0.75 U
ADN 50 ηg/µL	2 µL	200 ng/uL
Volumen de la reacción	20 µL	

Se programó el Termociclador S1000 (BioRad) utilizando los siguientes parámetros de amplificación (tabla 8):

Tabla 8: Parámetros de amplificación de genes de identificación en hongos productores de colorantes

Proceso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5 minutos	1
Desnaturalización	95°C	1 minuto	30
Alineamiento	57°C	1 minuto	
Extensión	72°C	1 minuto	
Extensión final	72°C	5 minutos	1

FUENTE: Visagie *et al.* (2014)

Los cebadores utilizados en la amplificación de los genes de identificación se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 9: Cebadores utilizados en la identificación molecular de hongos productores de colorantes seleccionados

Dominio	Locus	Cebador	Secuencia (5´-3´)
Eukarya	Región espaciadora interna (ITS)	ITS 1_f	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G
		ITS4_r	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC
	β -tubulina (<i>BenA</i>)	Bt2a_f	GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC
		Bt2b_r	ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC
	Calmodulina (<i>CaM</i>)	CMD5_f	CCG AGT ACA AGG AGG CCT TC
		CMD5_r	CCG ATA GAG GTC ATA ACG TGG

FUENTE: Visagie *et al.* (2014)

3.2.5. Análisis filogenético

Los productos de amplificación fueron enviados a Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur) para el secuenciamiento. Las secuencias obtenidas fueron leídas y editadas en el programa BioEdit 7.2.5. Dichas secuencias fueron comparadas por el buscador BLASTN con la base de datos del NCBI GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). La búsqueda en la base de datos fue limitada de la siguiente manera: se consideró que las secuencias de la base de datos sean de material tipo, se excluyó aquellas provenientes de muestras ambientales /no

cultivables y la selección se optimizó a Secuencias de alta similitud (MEGABLAST).

El análisis filogenético fue llevado a cabo con el programa MEGA 6 usando el método neighbor-joining con 1000 bootstraps.

3.2.6. Producción de colorantes en cultivo sumergido

Las cepas productoras seleccionadas fueron sembradas en agar papa dextrosa y se dejaron crecer a 28°C por 72 horas. Las esporas formadas fueron recuperadas en tween 80 al 0.1% y, posteriormente, se contabilizaron utilizando la cámara de Neubauer. Se inoculó 10^6 esporas en un volumen equivalente al 3% del volumen final del medio caldo papa dextrosa (papa 5% p/v, glucosa 20% p/v) durante un período de 7 días a 28°C, a 180 rpm en agitador orbital. Después de terminado el período de incubación, la biomasa y los colorantes producidos en el medio de producción fueron separados por filtración al vacío utilizando papel filtro de paso rápido. Posteriormente, los medios de producción conteniendo los colorantes fueron almacenados en tubos de centrífuga de 50 mL a condiciones de refrigeración (0°C-4°C). Finalmente, para verificar la producción de colorantes en medio de producción, se utilizó como control negativo el medio Caldo papa dextrosa filtrado.

3.2.7. Extracción de colorantes

Se inocularon esporas de las cepas productoras seleccionadas en medio caldo papa dextrosa (papa 5% p/v, glucosa 20% p/v) y se dejaron crecer durante un período de 7 días a 28°C, a 180 rpm en agitador orbital. Luego, se filtró el contenido y la biomasa obtenida se congeló a -20°C en tubos estériles. La biomasa congelada fue molida con nitrógeno líquido y almacenada en tubos limpios y estériles. Para la extracción de colorantes se utilizó el método de Velmurugan *et al.* (2009) modificado: Se pesó 1g de biomasa molida con nitrógeno líquido en un tubo de centrífuga y se añadió 5 mL de etanol al 96% de pureza, se mezcló por inmersión y se llevó a baño maría a 50°C por 30 minutos. Posteriormente, los tubos con biomasa y etanol se centrifugaron a 1300 rpm por 5 minutos. Luego, los tubos fueron retirados y se recuperaron los sobrenadante, los cuales fueron almacenados para futuros ensayos analíticos en condiciones de refrigeración (0-4°C).

3.2.8. Análisis espectrofotométrico de los colorantes producidos y extraídos

Se obtuvieron los espectros de absorción en el rango UV-VIS (200nm – 800nm) de los colorantes producidos por fermentación sumergida así como los extraídos a partir de biomasa, utilizando el espectrofotómetro de UV/Visible con arreglo de diodos y se determinaron las longitudes de onda de mayor absorbancia, para cada uno de ellos. Se determinaron como datos válidos aquellos valores cuya absorbancia fue menor a 1. Los blancos utilizados fueron caldo papa dextrosa (fermentación sumergida) y etanol (biomasa).

De igual manera, se determinó la productividad de colorante en cultivo sumergido de cada cepa en unidades de colorante producido (UCP), el cual se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{UCP} = \text{Absorbancia} \times 1/\text{Dilución} \times \text{biomasa/volumen}$$

3.2.9. Caracterización inicial de colorantes producidos por espectrofotometría de absorción en el infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)

Los colorantes extraídos de biomasa en etanol fueron diluidos con acetonitrilo (1:1), se mezclaron por inmersión y se dejaron en refrigeración por 24 horas. Posteriormente se centrifugaron a 1300 rpm por 5 minutos. Los sobrenadantes fueron recuperados y filtrados utilizando membranas de 0.45 µm. Los sobrenadantes recolectados fueron leídos en el espectrofotómetro de absorción en el infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) Nicolet iS10 de la marca Thermo Scientific™ y posteriormente analizados en el programa OMNIC Specta™.

3.2.10. Amplificación de genes de biosíntesis de micotoxinas

Para verificar si las cepas seleccionadas como productoras de colorantes son potencialmente productoras de micotoxinas, se diseñaron cebadores de acuerdo a la bibliografía señalada en la tabla 10. Las micotoxinas a determinar fueron: aflatoxina, ocratoxina A y patulina. En la

producción de aflatoxina se utilizaron como control positivo las siguientes cepas: INS–*Aspergillus oryzae* y INS–*Aspergillus flavus*.

En el caso de aquellas amplificaciones inespecíficas (presencia de más de una banda de amplificación) se utilizó el método de purificación de ADN a partir de gel de agarosa (Grey y Brendel 1992).

3.2.11. Análisis estadístico

Las desviaciones estándar, coeficientes de variación y comparación de medias de los datos obtenidos en el presente trabajo (absorbancias, biomasa, UCP) fueron analizados estadísticamente por el método de Análisis de varianza (ANOVA) y procesados por el programa estadístico MINITAB V.15.

Tabla 10: Cebadores utilizados en la amplificación de genes de biosíntesis de micotoxinas de hongos productores de colorantes seleccionados

Gen	Nombre del cebador	Secuencia (5'-3')	T ^m	Referencia
Proteína reguladora de Aflatoxina (<i>AflR</i>)	AflR_f	CGA GTT GTG CCA GTT CAA AA	65°C	Abdel – Hadil <i>et al.</i> 2010
	AflR_r	AAT CCT CGC CCA CCA TAC TA		
Ácido Norsolorinico reductasa (<i>Nor1</i>)	Nor1_f	ACC GCT ACG CCG GCA CTC TCG GCA C	72°C	Farber <i>et al.</i> 1997
	Nor1_r	GTT GGC CGC CAG CTT CGA CAC TCC G		
Ver1	Ver1_f	GCC GCA GGC CGC GGA GAA AGT GGT	65°C	Rashid <i>et al.</i> 2008
	Ver1_r	GGG GAT ATA CTC CCG CGA CAC AGC C		
O-methyltransferasa (<i>OmtA</i>)	OmtA_f	GTG GAC GGA CCT AGT CCG ACA TCA C	65°C	Geisen 1996
	OmtA_r	GTC GGC GCC ACG CAC TGG GTT GGG G		
Isoepoxidon deshidrogenasa	IDH_2195f	CAA TGT GTC GTA CTG TGC CC	50°C	Dombrink-Kurtzman 2007
	IDH_2793r	ACC TTC AGT CGC TGT TCC TC		
Policétido sintasa	KAF1_f	GAR KSI CAY GGI ACI GGI AC	58°C	Amnuaykanjanasin <i>et al.</i> 2006
	KAR2_r	CCA YTG IGC ICC YTG ICC IGT RAA		
	KAOTAF_f	GAR GCI CAY GGC ACI GGI AC	60°C	Storari <i>et al.</i> 2010
	KAOTAR_r	CCA RTT IGC ICC YTG ICC IGT RAA		

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. AISLAMIENTO Y TAMIZADO DE CEPAS PRODUCTORAS DE COLORANTES

Se seleccionaron cepas de hongos productoras de colorantes de basidiocarpos frescos y muestras de tierra de dos zonas de la Amazonía peruana: Iquitos y Ucayali, respectivamente. De un total de 25 muestras en fresco, 8 pudieron crecer en condiciones *in vitro* y sólo 2 produjeron colorantes, además, sólo se pudo aislar una cepa productora de colorante a partir de las muestras de suelo. Las fotografías de las cepas aisladas no productoras de colorantes se encuentran en el anexo 1.

Aislamiento a partir de basidiocarpos del Arboretum “El Huayo”- Iquitos

De un total de 25 muestras provenientes de esta zona, 8 pudieron crecer en condiciones *in vitro* y sólo 2 de estas generaron colorantes en medio PDA. Esta información se resume en la tabla 11 y las figuras 6 y 7.

Tabla 11: Relación de hongos de crecimiento *in vitro* aislados de basidiocarpos de la zona “El Huayo” - Iquitos

Código	Coloración	Coordenadas de muestreo
LMB-HL1	Amarillo	7°11'53.3'' S; 74°57'11.0'' O
LMB-HL2	Amarillo	7°11'52.0'' S; 74°57'17.7'' O
LMB-HL3	No presentó	7°11'53.8'' S; 74° 57'10.3'' O
LMB-HL4	No presentó	7° 11'53.4'' S; 74° 57'10.3'' O
LMB-HL5	No presentó	7°11'53.6'' S; 74°57'10.4'' O
LMB-HL6	No presentó	7°11'51.6'' S; 74°57'17.4'' O
LMB-HL7	No presentó	7°11'51.5'' S; 74°57'17.5'' O
LMB-HL8	No presentó	7°11'52.4'' S; 74°57'14.4'' O

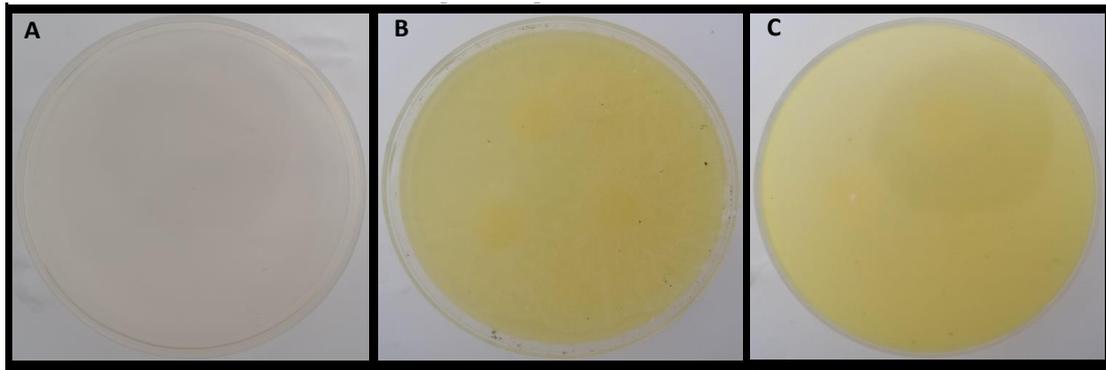


Figura 6: Crecimiento del hongo LMB-HL1 en agar papa dextrosa (PDA) luego de 7 días de incubación.

Donde: A, Placa PDA control negativo; B y C, placas PDA cultivadas (vista frontal y base de la placa, respectivamente).

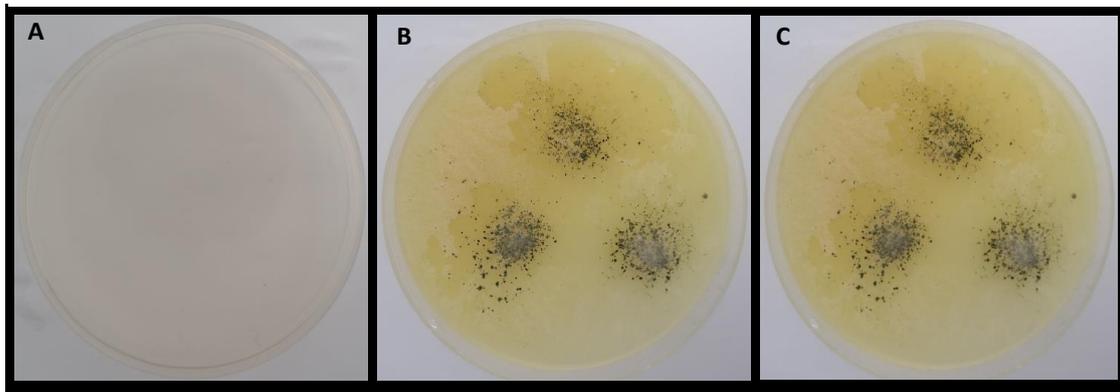


Figura 7: Crecimiento del hongo LMB-HL2 en agar papa dextrosa (PDA) luego de 7 días de incubación.

Donde: A, Placa PDA control negativo; B y C, placas PDA cultivadas (vista frontal y base de la placa, respectivamente).

Aislamiento a partir de Muestras de Suelo

Se trabajaron con 8 muestras del bosque de “Aguas Calientes” en Contamana – Ucayali. Sólo en una de ellas creció una cepa productora de colorante y sus características se observan en la tabla 12 y la figura 8.

Tabla 12: Hongos productores de colorantes aislados de muestras de tierra de la zona “Contamana”

Código	Coloración	Coordenadas de muestreo
LMB-HU1	Marrón	7°11'51.4'' S; 74°57'17.5'' O

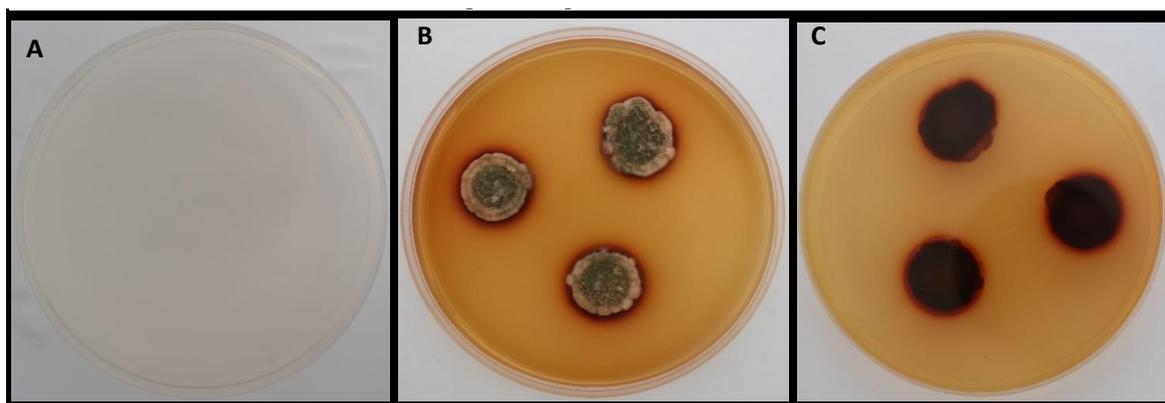


Figura 8: Crecimiento del hongo LMB-HU1 en agar papa dextrosa (PDA) luego de 7 días de incubación.

Donde: A, Placa PDA control negativo; B y C, placas PDA cultivadas (vista frontal y base de la placa, respectivamente).

Cepario del Laboratorio de Micología y Biotecnología, UNALM (LMB)

Se complementó la selección tomando en consideración los hongos del cepario del LMB. Del total de 14 cepas aisladas previamente de muestras de suelo de bosque de la selva de Pucallpa, se encontraron 5 cepas productoras de colorantes. La tabla 13 resume las cepas seleccionadas:

Tabla 13: Cepas productoras de colorantes provenientes del cepario del LMB

Código	Coloración	Coordenadas de muestreo	Especie
LMB-HP14	Anaranjado	8°52'35.9'' S; 75°00'37.1'' O	<i>Talaromyces wortmannii</i>
LMB-HP19	Amarillo	8°53'0.33'' S; 75°00'27.3'' O	No identificado
LMB-HP33	Amarillo	8°53'0.33'' S; 75°00'27.3'' O	No identificado
LMB-HP37	Amarillo	8°52'39.6'' S; 75°00'29.7'' O	<i>Penicillium mallochii</i>
LMB-HP43	Anaranjado	8°52'35.9'' S; 75°00'37.1'' O	No identificado

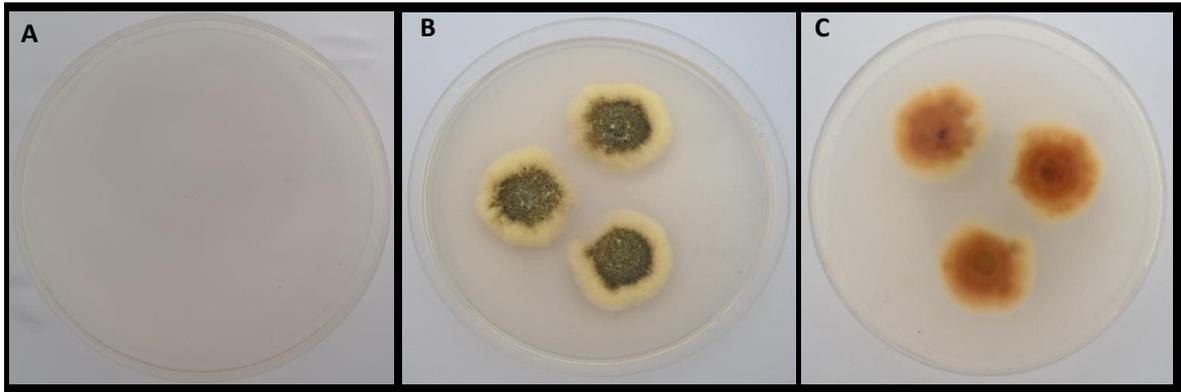


Figura 9: Crecimiento del hongo LMB-HP14 en agar papa dextrosa (PDA) luego de 7 días de incubación.

Donde: A, Placa PDA control negativo; B y C, placas PDA cultivadas (vista frontal y base de la placa, respectivamente).

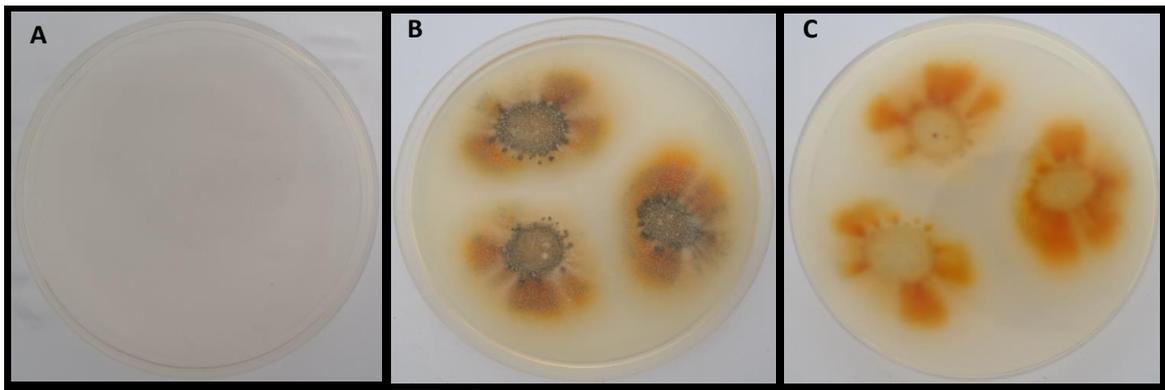


Figura 10: Crecimiento del hongo LMB-HP19 en agar papa dextrosa (PDA) luego de 7 días de incubación.

Donde: A, Placa PDA control negativo; B y C, placas PDA cultivadas (vista frontal y base de la placa, respectivamente).

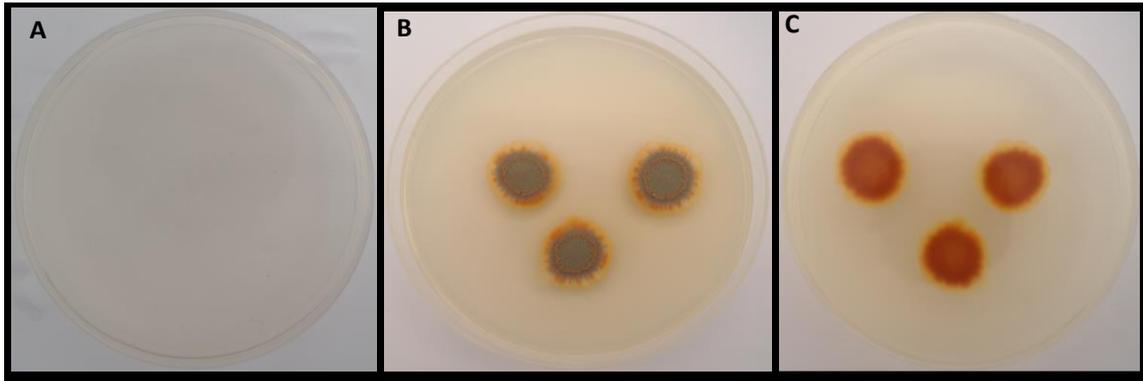


Figura 11: Crecimiento del hongo LMB-HP33 en agar papa dextrosa (PDA) luego de 7 días de incubación.

Donde: A, Placa PDA control negativo; B y C, placas PDA cultivadas (vista frontal y base de la placa, respectivamente).

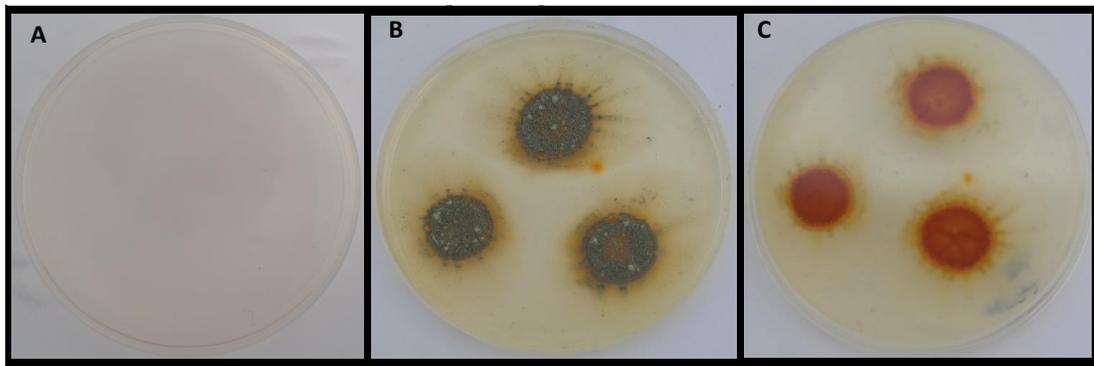


Figura 12: Crecimiento del hongo LMB-HP37 en agar papa dextrosa (PDA) luego de 7 días de incubación.

Donde: A, Placa PDA control negativo; B y C, placas PDA cultivadas (vista frontal y base de la placa, respectivamente).

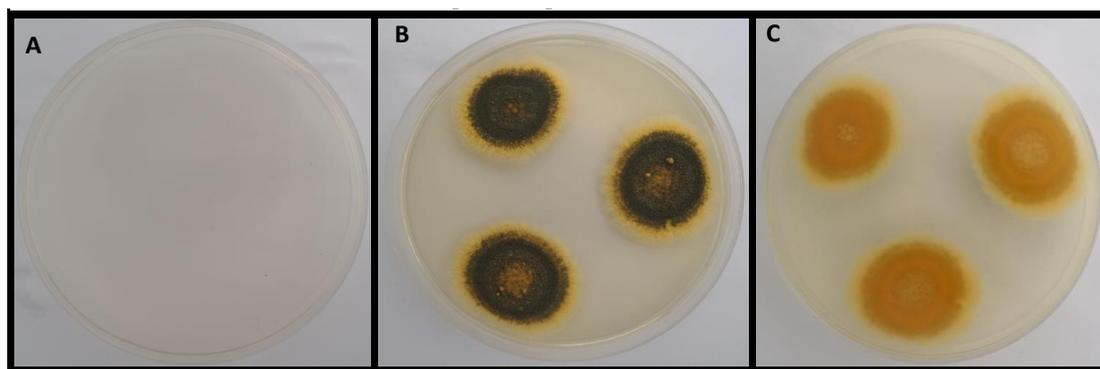


Figura 13: Crecimiento del hongo LMB-HP43 en agar papa dextrosa (PDA) luego de 7 días de incubación.

Donde: A, Placa PDA control negativo; B y C, placas PDA cultivadas (vista frontal y base de la placa, respectivamente).

Como resultado del aislamiento se obtuvieron 8 cepas productoras de colorantes, de las cuales 6 provinieron de muestras de suelo (LMB-HP14, LMB-HP19, LMB-HP33, LMB-HP37, LMB-HP43 y LMB-HU1). La significativa proporción de cepas seleccionadas a partir de muestras de tierra posiblemente se debe a que, los suelos en bosques poseen una alta cantidad y variedad de materia orgánica, lo cual promueve el crecimiento de diversos microorganismos así como la biosíntesis de diferentes de metabolitos de importancia económica (Akilandeswari y Pradeep 2016), por ello había mayor posibilidad de aislar hongos productores de colorantes de muestras de tierra que a partir de muestras en fresco (basidiocarpos).

Adicionalmente, se evidencia que la selección de hongos productores de colorantes a partir de su crecimiento en agar PDA es un método efectivo de selección con el cual se han encontrado 8 cepas productoras de colorantes de la selva peruana. Estos resultados concuerdan con otros estudios en los que, utilizando PDA, se han seleccionado hongos productores de colorantes de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Trichoderma*, provenientes de muestras de tierra (Celestino *et al.* 2014, Aishwarya 2014). Además, es un método altamente reproducible dado que, dicho medio de cultivo, es económico y fácil de preparar.

4.2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA, MOLECULAR Y FILOGENIA DE LAS CEPAS PRODUCTORAS DE COLORANTES

La tabla 14 resume las características del crecimiento de las 8 cepas productoras de colorantes. De igual manera, las fotografías de cada una de las especies seleccionadas se encuentran en las siguientes figuras:

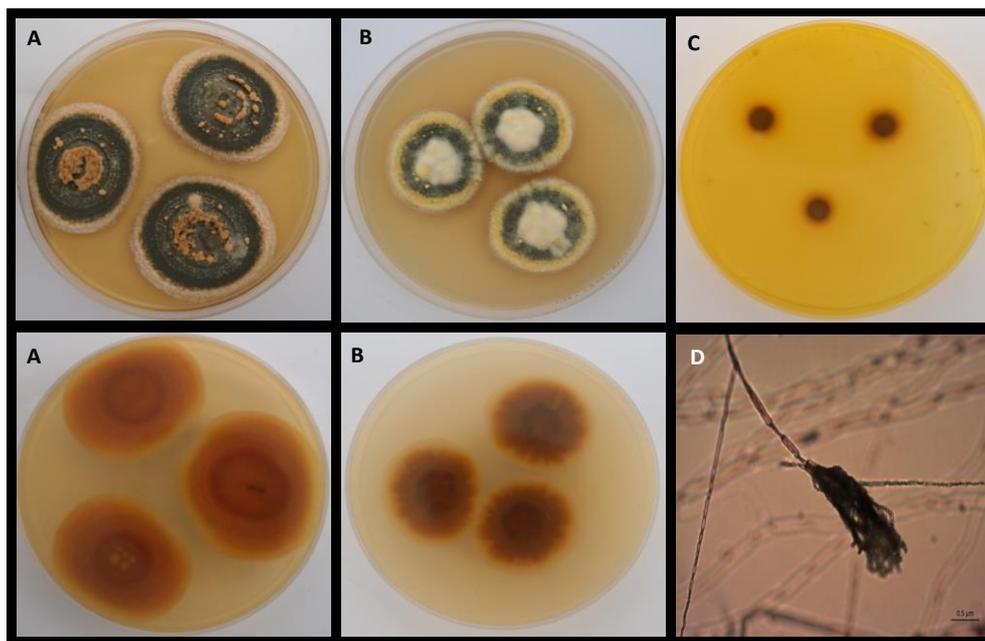


Figura 14: Características fisiológicas y morfológicas del hongo LMB-HP14 en diferentes medios de cultivo

Donde: A, crecimiento en agar CYA (vista frontal y base de la placa) donde se aprecia la producción de colorantes y exudados; B, crecimiento en agar MEA (vista frontal y base de la placa) donde se aprecia los colorantes producidos; C, crecimiento en agar CREA (vista de la base de la placa) donde se verifica la producción de ácidos; D, Microfotografía en agar MEA, escala 0.5 μm .

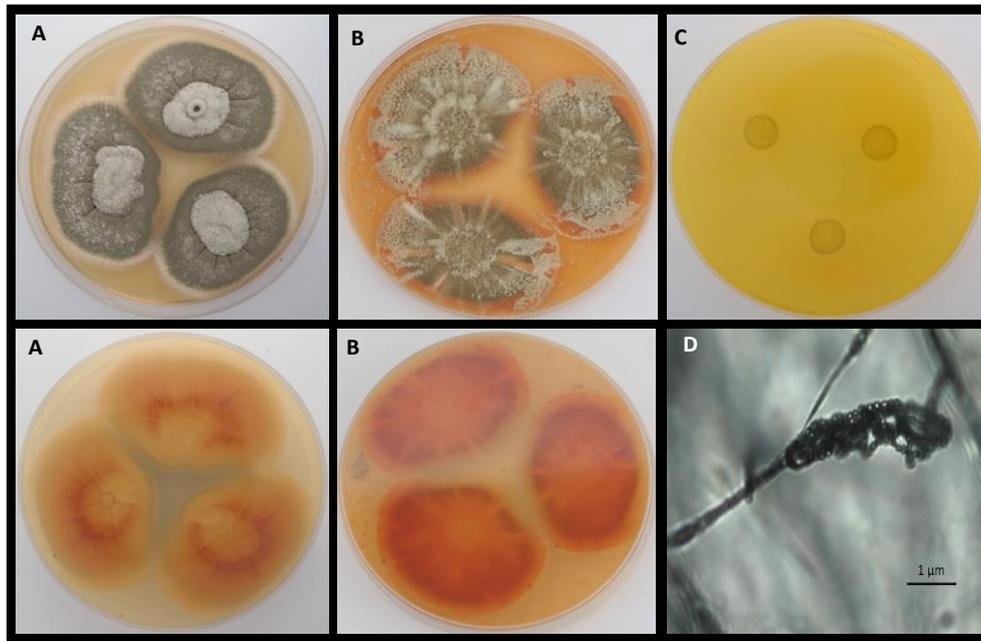


Figura 15: Características fisiológicas y morfológicas del hongo LMB-HP19 en diferentes medios de cultivo

Donde: A, crecimiento en agar CYA (vista frontal y base de la placa) donde se aprecia la producción de colorantes y exudados; B, crecimiento en agar MEA (vista frontal y base de la placa) donde se aprecia los colorantes producidos; C, crecimiento en agar CREA (vista de la base de la placa) donde se verifica la producción de ácidos; D, Microfotografía en agar MEA, escala 1 μm .

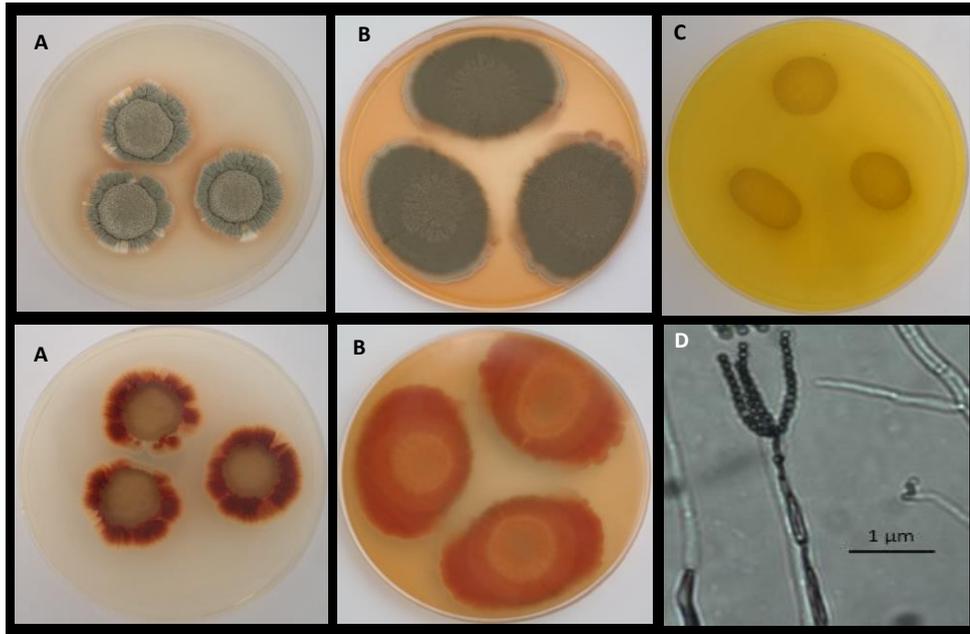


Figura 16: Características fisiológicas y morfológicas del hongo LMB-HP33 en diferentes medios de cultivo

Donde: A, crecimiento en agar CYA (vista frontal y base de la placa) donde se aprecia la producción de colorantes y exudados; B, crecimiento en agar MEA (vista frontal y base de la placa) donde se aprecia los colorantes producidos; C, crecimiento en agar CREA (vista de la base de la placa) donde se verifica la producción de ácidos; D, Microfotografía en agar MEA, escala 1 μm .

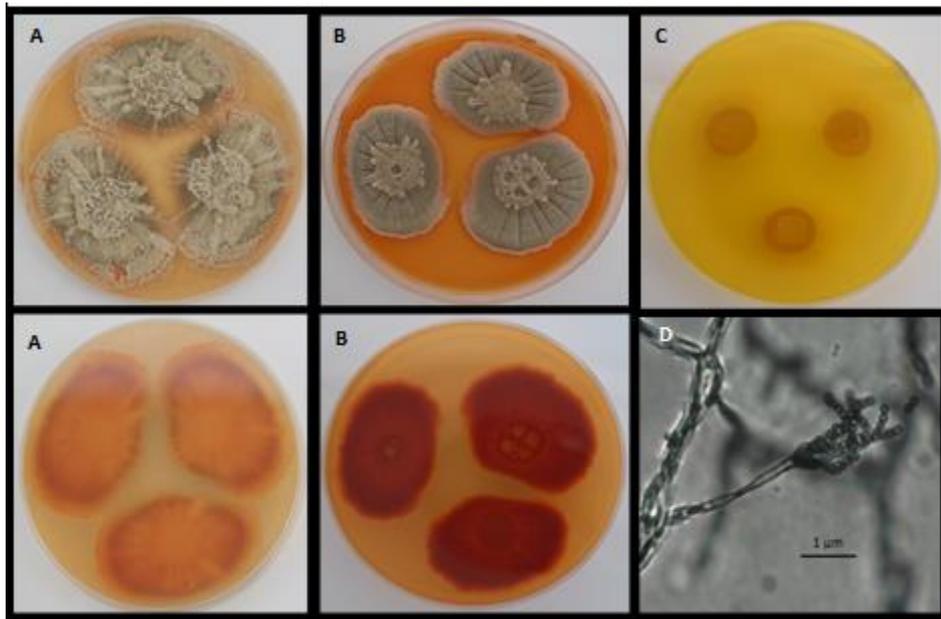


Figura 17: Características fisiológicas y morfológicas del hongo LMB-HP37 en diferentes medios de cultivo

Donde: A, crecimiento en agar CYA (vista frontal y base de la placa) donde se aprecia la producción de colorantes y exudados; B, crecimiento en agar MEA (vista frontal y base de la placa) donde se aprecia los colorantes producidos; C, crecimiento en agar CREA (vista de la base de la placa) donde se verifica la producción de ácidos; D, Microfotografía en agar MEA, escala 1 μm .

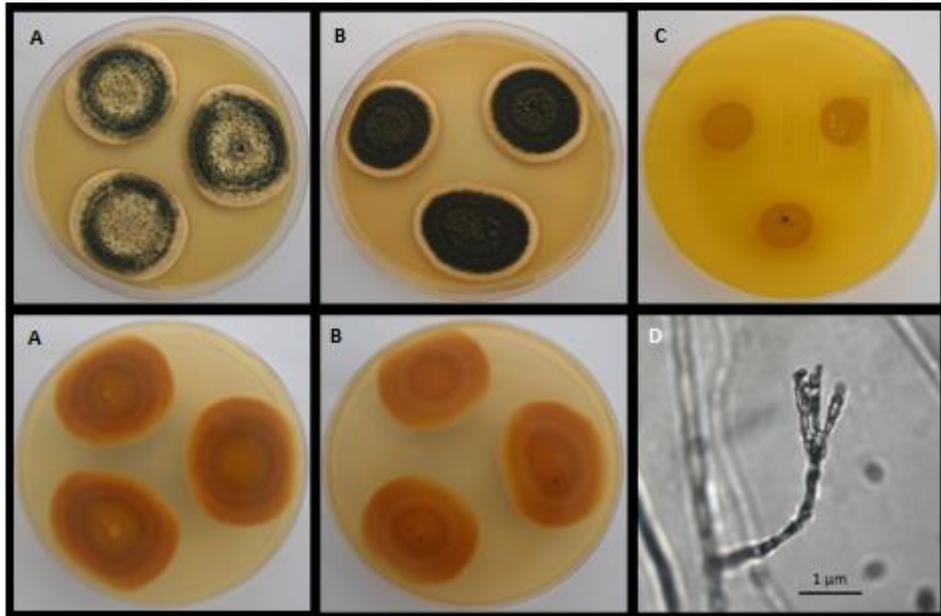
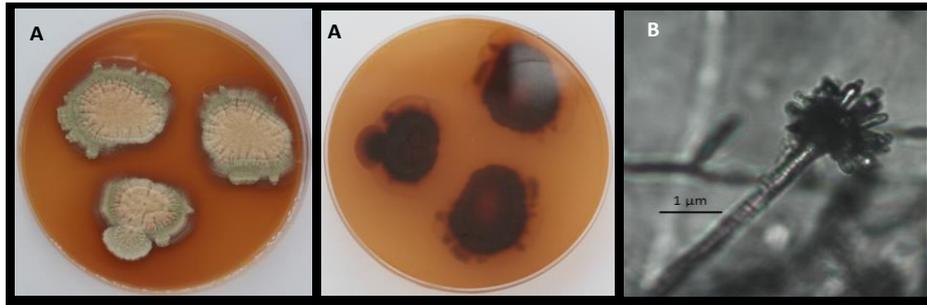


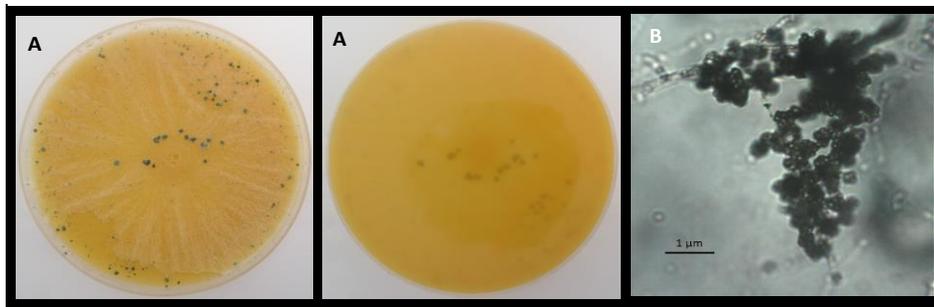
Figura 18: Características fisiológicas y morfológicas del hongo LMB-HP43 en diferentes medios de cultivo

Donde: A, crecimiento en agar CYA (vista frontal y base de la placa) donde se aprecia la producción de colorantes y exudados; B, crecimiento en agar MEA (vista frontal y base de la placa) donde se aprecia los colorantes producidos; C, crecimiento en agar CREA (vista de la base de la placa) donde se verifica la producción de ácidos; D, Microfotografía en agar MEA, escala: 1 µm.



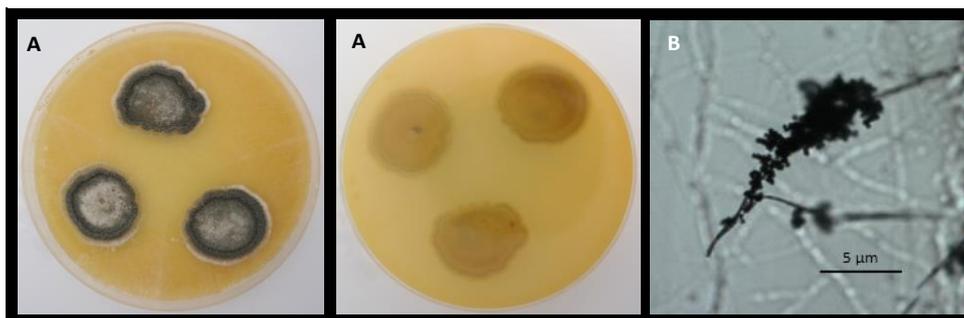
**Figura 19: Características fisiológicas y morfológicas del hongo
LMB-HU1 en agar malta**

Donde: A, crecimiento en agar MEA (vista frontal y base de la placa); B,
Microfotografía en agar MEA, escala 1 µm.



**Figura 20: Características fisiológicas y morfológicas del hongo
LMB-HL1 en agar malta**

Donde: A, crecimiento en agar MEA (vista frontal y base de la placa); B,
Microfotografía en agar MEA, escala 5 µm.



**Figura 21: Características fisiológicas y morfológicas del hongo
LMB-HL2 en agar malta**

Donde: A, crecimiento en agar MEA (vista frontal y base de la placa); B,
Microfotografía en agar MEA, escala 1 µm.

Tabla 14: Características morfológicas y fisiológicas del crecimiento de las cepas productoras de colorantes seleccionadas en diferentes medios de cultivo

CEPA	MEDIO DE CULTIVO			
	PDA	MEA	CYA	CREA
LMB-HP14	Hifas de color verde (más desarrolladas) y amarillezas (en crecimiento). Colonias de textura algodonosa. Se observa la producción de pigmento rojo-anaranjado al reverso de la placa.	Hifas de color verde (más desarrolladas) y blancas (en crecimiento). Colonias de textura algodonosa, con exudados color amarillos intenso de textura algodonosa. Se observa la producción de pigmento amarillo-anaranjado al reverso de la placa.	Hifas de color amarillo tenue y, con esporas verde oscuras dispersas en toda la colonia, predominantemente la zona central. Colonias de textura algodonosa. Se observa la producción de pigmento anaranjado-amarillo al reverso de la placa.	Producción de ácidos (reacción positiva)
LMB-HP19	Hifas de color verde (más desarrolladas) y blancas (en crecimiento). Colonias de textura pulverulenta. Se observa la producción de pigmento anaranjado al reverso de la placa.	Hifas de color verde-grisáceo, de color blanco aquellas en desarrollo. Colonias de textura pulverulenta, con exudados blancos de textura algodonosa. Se observa la producción de pigmento anaranjado al reverso de la placa.	Hifas de color verde-grisáceo, de color blanco aquellas en desarrollo. Colonias de textura pulverulenta, con exudados blancos de textura algodonosa. Se observa la producción de pigmento anaranjado al reverso de la placa.	Producción de ácidos (reacción positiva)
LMB-HP33	Hifas de color verde (más desarrolladas) y blancas (en crecimiento). Colonias de textura pulverulenta. Se observa la producción de pigmento anaranjado al reverso de la placa.	Hifas de color verde-grisáceo, de color blanco aquellas en desarrollo. Colonias de textura pulverulenta. Se observa la producción intensa de pigmento anaranjado al reverso de la placa.	Hifas de color verde-grisáceo, de color blanco aquellas en desarrollo. Colonias de textura pulverulenta. Se observa la producción de pigmento anaranjado al reverso de la placa.	Producción de ácidos (reacción positiva). Hifas de color verde, de textura pulverulenta.
LMB-HP37	Hifas de color verde (más desarrolladas) y traslúcidas (en crecimiento). Colonias de textura pulverulenta. Se observa la producción de pigmento anaranjado-amarillo al reverso de la placa.	Hifas de color verde-grisáceo. Colonias de textura pulverulenta. Se observa la producción intensa de pigmento anaranjado-rojo al reverso de la placa.	Hifas de color verde-grisáceo, de color blanco aquellas en desarrollo. Colonias de textura pulverulenta, con exudados blancos de textura algodonosa. Se observa la producción de pigmento anaranjado al reverso de la placa.	Producción de ácidos (reacción positiva). Hifas de color verde, de textura pulverulenta.
LMB-HP43	Hifas de color verde (más desarrolladas) y amarillezas (en crecimiento). Colonias de textura algodonosa. Se observa la producción de pigmento amarillo al reverso de la placa.	Hifas de color verde (más desarrolladas) y amarillas (en crecimiento). Colonias de textura algodonosa. Se observa la producción de pigmento anaranjado-amarillo al reverso de la placa.	Hifas de color amarillo tenue, con esporas verde oscuras dispersas en toda la colonia, predominantemente la zona central. Colonias de textura algodonosa. Se observa la producción de pigmento anaranjado-amarillo al reverso de la placa.	Producción de ácidos (reacción positiva).
LMB-HU1	Hifas de color verde oscuro, colonias de textura pulverulenta. Se observa la producción de pigmentos marrón-anaranjado en toda la placa.	Hifas de color blanco-marrones (centro) y verde (en desarrollo). Colonias de textura pulverulenta. Se observa la producción de pigmento marrón-rojo alrededor de las colonias y al reverso de la placa.	No aplica	No aplica
LMB-HL1	Hifas finas de color blanco y textura algodonosa, se observa pigmentación amarilla en toda la placa, además de esporas verde oscuras mayoritariamente en el borde de la placa.	Hifas finas de color blanco y textura algodonosa, se observa intensa pigmentación amarilla en toda la placa, se encuentran esporas verde oscuras dispersas en toda la placa.	No aplica	No aplica
LMB-HL2	Hifas finas de color blanco y textura algodonosa, se observa pigmentación amarilla en toda la placa, además de esporas verde oscuras mayoritariamente en los puntos de siembra.	Hifas de color verde (más desarrolladas) y blancas (en crecimiento), estas últimas se encuentran dispersas en toda la placa. Colonias de textura algodonosa, se observa intensa pigmentación amarilla en toda la placa.	No aplica	No aplica

Con el objetivo de complementar la caracterización morfológica de las cepas seleccionadas, se realizó la identificación molecular de estas mediante la amplificación de genes de identificación usando los cebadores ITS, BenA y CaM. La figura 22 muestra las amplificaciones de la región ITS para las 8 cepas seleccionadas. Así mismo, las tablas 16 y 17 muestran los tamaños de bandas de los productos amplificados, los cuales coincidieron con lo reportado en la literatura (White *et al.* 1990, Glass y Donaldson 1995, Hong *et al.* 2006).

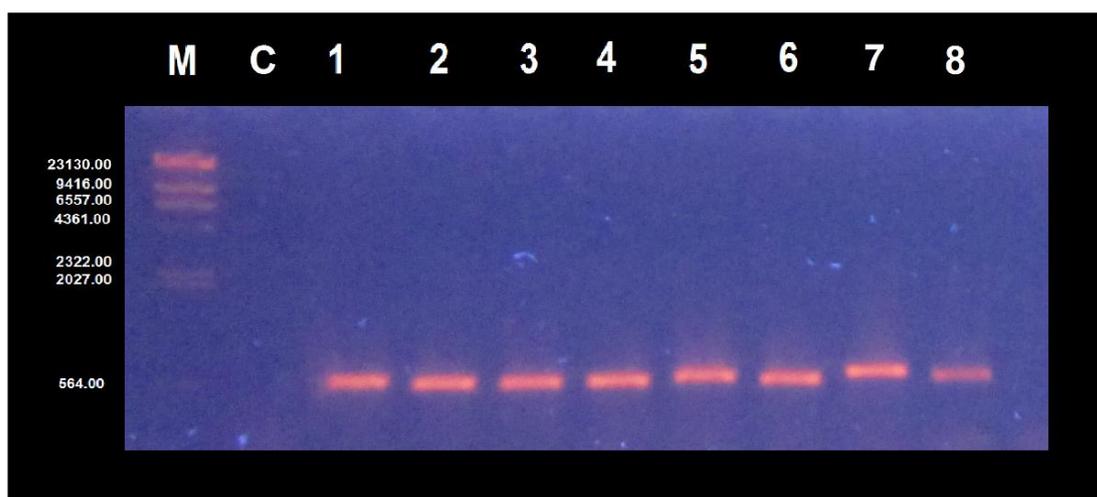


Figura 22: Amplificación de la región ITS de hongos productores de colorantes.

Electroforesis horizontal en gel de agarosa (1 %). M: marcador de peso Fago lambda digerido con Hind III, C: control negativo, 1: región ITS de LMB-HP14, 2: región ITS de LMB-HP19, 3: región ITS de LMB-HP33, 4: región ITS de LMB-HP37, 5: región ITS de LMB-HP43, 6: región ITS de LMB-HU1, 7: región ITS de LMB-HL1, 8: región ITS de LMB-HL2.

Tabla 15: Tamaño de banda en pares de bases (pb) de productos de amplificación de la región ITS, de cepas productoras de colorantes

Cepa	Tamaño de banda encontrado	Tamaño de banda esperado
LMB-HP14	545 pb	500 pb - 600 pb
LMB-HP19	542 pb	500 pb - 600 pb
LMB-HP33	540 pb	500 pb - 600 pb
LMB-HP37	539 pb	500 pb - 600 pb
LMB-HP43	604 pb	500 pb - 600 pb
LMB-HU1	558 pb	500 pb - 600 pb
LMB-HL1	608 pb	500 pb - 600 pb
LMB-HL2	600 pb	500 pb - 600 pb

Tabla 16: Alineamiento de secuencias de genes de beta tubulina 2, calmodulina y la región espaciadora del transcrito interno (ITS) de los hongos productores de colorantes seleccionados mediante análisis BLAST

CÓDIGO	CEBADORES	TAMAÑO DE SECUENCIA (pb)	IDENTIFICACIÓN NCBI	% COBERTURA	% IDENTIDAD	ACCESIÓN
LMB-HP19	Bt2_f Bt2_r	551	<i>Penicillium mallochii</i> cepa DAOM 239917 gen beta-tubulina (benA), cds parcial	100%	98%	JN625973.1
	CMD5_f CMD6_r	577	<i>Penicillium mallochii</i> cepa DAOM 239917 gen calmodulina (cmd), cds parcial	100%	99%	JN626016.1
LMB-HP33	Bt2_f Bt2_r	499	<i>Penicillium maximae</i> cepa NRRL2060 gen beta-tubulina, cds parcial	100%	95%	KC773795.1
	CMD5_f CMD6_r	652	<i>Penicillium maximae</i> cepa NRRL2060 gen calmodulina (cmd), cds parcial	99%	99%	KC773821.1
LMB-HP43	Bt2_f Bt2_r	455	<i>Talaromyces brunneus</i> cepa CBS 227.60 gen beta-tubulina (tub2), cds parcial	100%	99%	KJ865722.1
	CMD5_f CMD6_r	723	<i>Talaromyces brunneus</i> cepa CBS 227.60 gen calmodulina (cmdA), cds parcial	100%	100%	KJ885264.1
LMB-HU1	Bt2_f Bt2_r	451	<i>Aspergillus amoenus</i> cultivo NRRL 236 gen beta-tubulina, cds parcial	100%	100%	JN853940.1
LMB-HL1	ITS1_f ITS4_r	360	<i>Trichoderma reesei</i> región ITS; de material tipo.	100%	100%	NR_120297.1
LMB-HL2	CMD5_f CMD6_r	686	<i>Trichoderma reesei</i> strain Qm 6a gen calmodulina (CAL), cds parcial	75%	99%	JN180917.2

Posteriormente, se realizó el análisis de alineamiento múltiple y filogenético que finalmente permitieron identificar las cepas productoras de colorantes seleccionadas. Considerando las cepas provenientes del cepario del LMB previamente identificadas, se obtuvo 2 cepas del género *Talaromyces*, 3 cepas del género *Penicillium*, 1 cepa del género *Aspergillus* y 2 cepas del género *Trichoderma*, haciendo un total de 8 cepas seleccionadas.

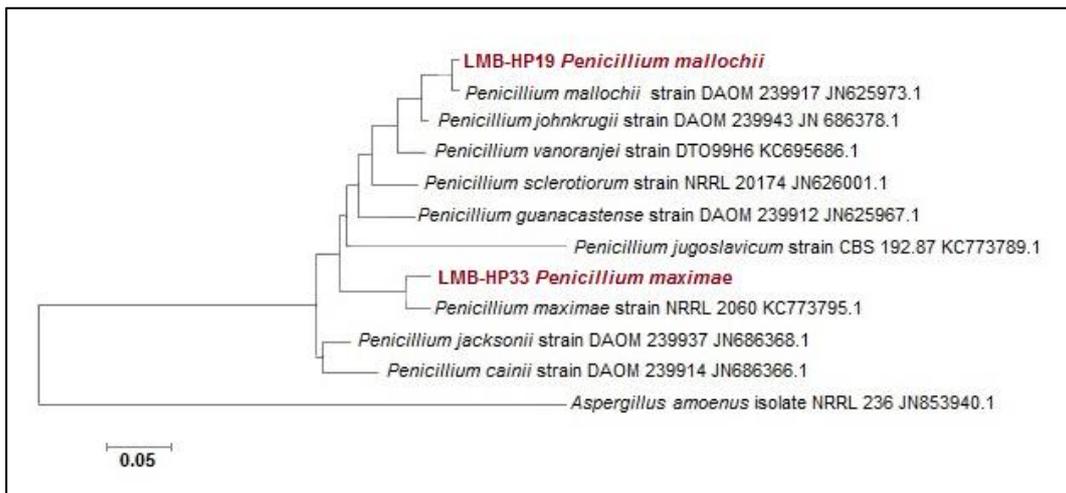


Figura 23: Árbol filogenético de las cepas LMB-HP19 y LMB-HP33 utilizando cebadores del gen Beta tubulina 2

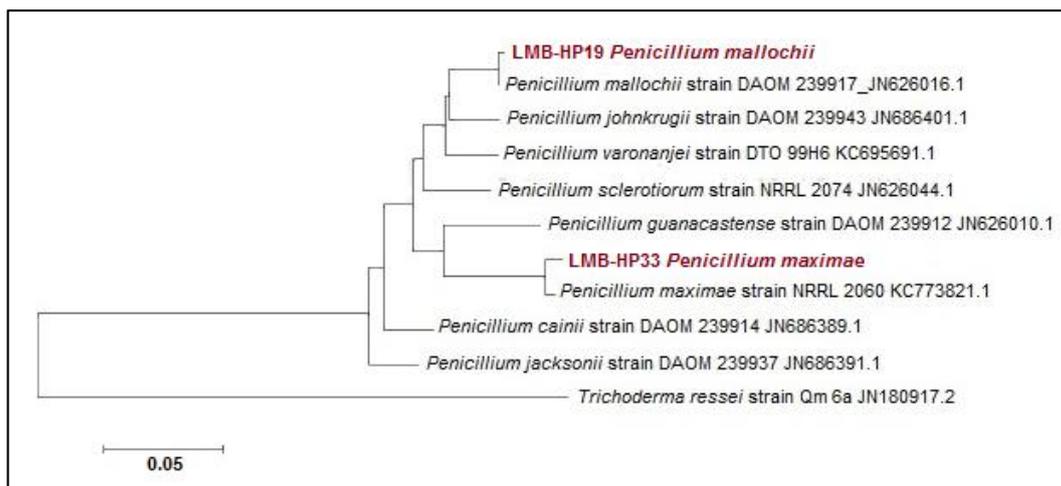


Figura 24: Árbol filogenético de las cepas LMB-HP19 y LMB-HP33 utilizando cebadores del gen Calmodulina

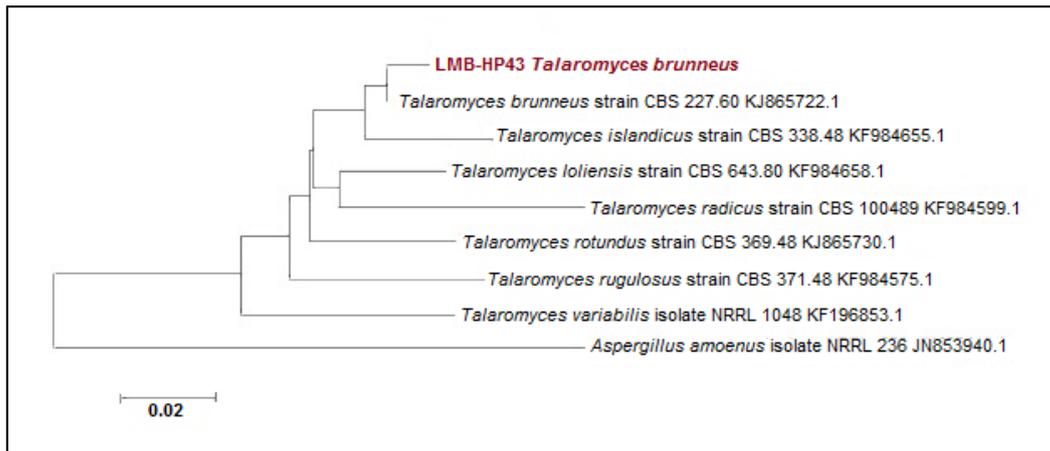


Figura 25: Árbol filogenético de la cepa LMB-HP43 utilizando cebadores del gen Beta tubulina 2

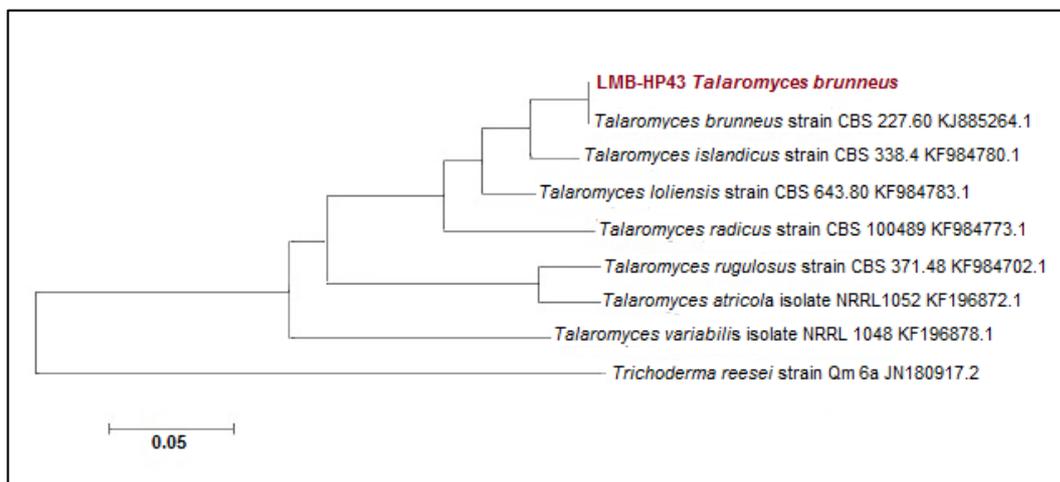


Figura 26: Árbol filogenético de la cepa LMB-HP43 utilizando cebadores del gen Calmodulina

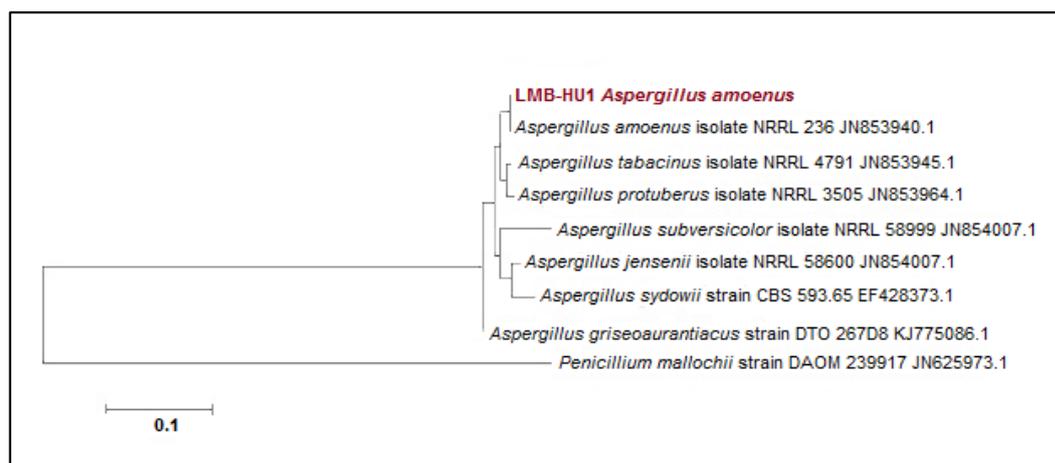


Figura 27: Árbol filogenético de la cepa LMB-HU1 utilizando cebadores del gen Beta tubulina 2

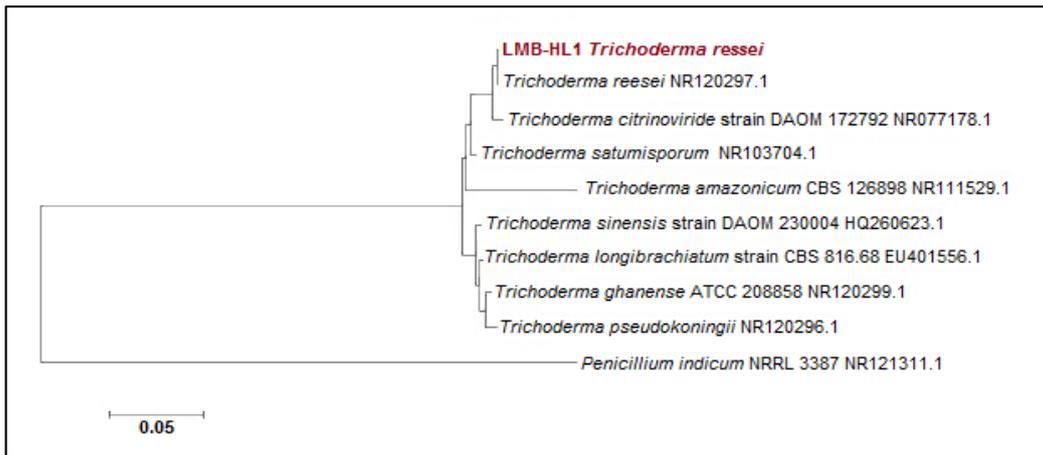


Figura 28: Árbol filogenético de la cepa LMB-HL1 utilizando cebadores de la región ITS

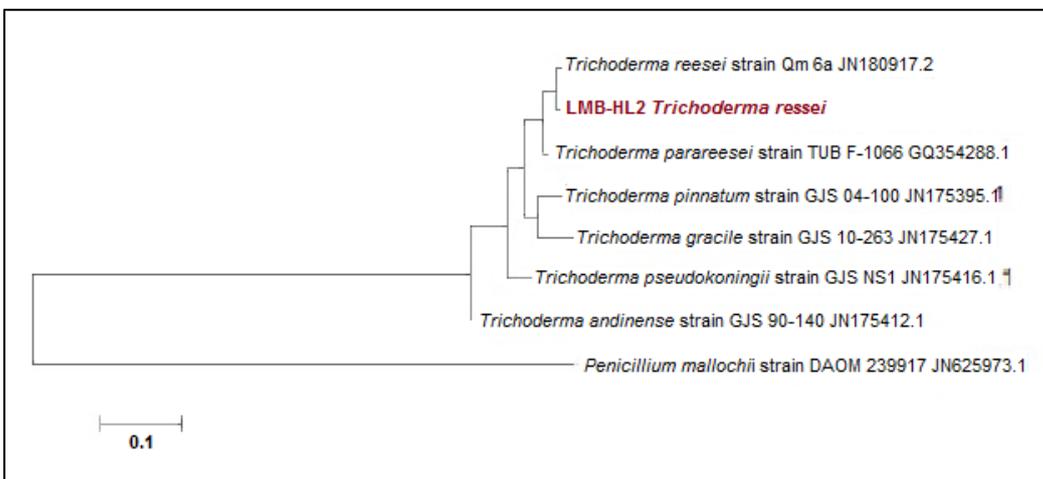


Figura 29: Árbol filogenético de la cepa LMB-HL2 utilizando cebadores del gen Calmodulina

En la figura 22 se observa que todas las cepas amplificaron los genes de identificación ITS. Sin embargo, sólo la cepa LMB-HL1 fue identificada como *Trichoderma reesei* con 100% de cobertura y similaridad (tabla 16) utilizando este par de cebadores. Respecto a las otras cepas, había más de una posibilidad de identificación debido a que, mediante el uso de este par de cebadores, no se puede diferenciar especies filogenéticamente cercanas (Hubka *et al.* 2013). Es por ello que se complementó la identificación utilizando cebadores Bt2 y CaM, que amplifican ADN sólo de Ascomycetos y Deuteromicetos, y cuyo uso viene dando nuevos alcances en la re-identificación de especies. Tal es el caso de cepas de *Neosartorya glabra*, quienes fueron separadas en 5 grupos utilizando estos

dos pares de cebadores (Hong *et al.* 2006).

Se verificó que los resultados de identificación de las cepas LMB-HP19, LMB-HP33, LMB-HP43 fueron los mismos para ambos cebadores Bt2 y CaM (Figuras 23, 24, 25 y 26) y sus porcentajes de cobertura e identidad fueron 100% o cercanas a este porcentaje, con lo cual se logró realizar la identificación molecular de dichas cepas. En el caso de las cepas LMB-HU1, LMB-HL1 y LMB-HL2, se obtuvieron resultados sólo de un par de cebadores para cada una de ellas (Figuras 27, 28 y 29). En el caso de la cepa LMB-HL2, los porcentajes de cobertura e identidad fueron de 75% y 100%, respectivamente, para la especie *Trichoderma reesei*, probablemente no se obtuvo mayor porcentaje de cobertura con otra especie debido a que la base de datos del gen CaM aún no está completa, tal como lo indica Visagie *et al.* (2014), por ello sería recomendable complementar su identificación con otros cebadores de identificación tales como TEF1 (factor 1-alfa de elongación de la traducción *ith*), *ech42* (endoquitinasa), RPB1b (subunidad larga de polimerasa ribosomal 11) y ACT (actina), los cuales han sido utilizados para identificar cepas de *Trichoderma sp.* e *Hypocrea sp.* a nivel de especie (Asis y Siddiquee 2016).

La cepa LMB-HP14 ha sido identificada como *Talaromyces wortmannii*. Sus características morfológicas han sido reportadas previamente por Yilmaz *et al.* (2014): producción de colorante amarillo-anaranjado insoluble en los medios CYA y MEA, textura aterciopelada de colonias en medio MEA, producción ausente o moderada de ácidos (medio CREA), ramificación de conidióforos biverticiliada. Estas características concuerdan con las descritas en la tabla 14 y la figura 14 para la cepa LMB-HP14 *Talaromyces wortmannii*. Esta especie ha sido estudiada por su capacidad de producción de compuestos bioactivos de potencial uso medicinal como los alcaloides (Bara *et al.* 2013, De Medeiros *et al.* 2015). Así mismo, la cepa LMB-HP43 ha sido identificada como *Talaromyces brunneus*, la cual posee las siguientes características morfológicas: producción de colorante amarillo-marrón insoluble en medio CYA, textura aterciopelada y algodonosa de colonias en medio MEA, producción de ácidos (medio CREA), ramificación de conidióforos biverticiliada (Yilmaz *et al.* 2014). De igual manera, estas características concuerdan con las descritas en la tabla 14 y la figura 18 para la cepa LMB-HP43 *Talaromyces brunneus*. Esta especie ha sido reportada como productora de rugulosina, eskyrin, mitorubrin, mitorubrinol y acetato de mitorubrinol.

Las cepas LMB-HP19 y LMB-HP37 fueron identificadas como *Penicillium mallochii*. Rivera y Seifert (2011) reportaron las principales características morfológicas de la especie *P. mallochii*: producción o ausencia de exudados amarillos, producción de colorante anaranjado soluble o su ausencia en medio CYA; ausencia de exudados, presencia o ausencia de colorante amarillo o anaranjado soluble en medio MEA; conidióforos monoverticiliados. Estas características coinciden con lo reportado en la tabla 14 y en las figuras 15 y 17. *Penicillium mallochii* ha sido reportado como productor de enzimas celulasas alcalinas con posible uso en la industria textil (Vega *et al.* 2015). Sin embargo, no hay reportes de estudios de los colorantes producidos por esta especie, con lo cual este trabajo aportaría información acerca de los metabolitos de interés industrial que pueden ser generados por esta especie.

La cepa LMB-HP33 fue identificada como *Penicillium maximae*. Las principales características morfológicas de la especie *P. maximae* han sido reportadas por Visagie *et al.* (2014): ausencia de esporulación, presencia de exudados anaranjado, presencia de colorante anaranjado, pigmentación en el reverso de la placa color rojo-marrón, colonias de textura algodonosa en medio CYA; producción de exudados claros, pigmentación en el reverso de la placa de rojo a marrón, colonias de textura algodonosa en medio MEA; ausencia de producción de ácidos en medio CREA; conidióforos monoverticiliados. Estas características no coinciden en su totalidad con lo reportado en la tabla 14 y la figura 16. Si bien ciertas características morfológicas descritas por Visagie *et al.* (2014), como la producción de ácidos en medio CREA, no corresponden a LMB-HP33 *Penicillium maximae*, el análisis molecular con cebadores CMD sí la identifica como cepa de dicha especie (tabla 16), es por ello que el presente trabajo reporta una cepa de *P. maximae* con capacidad de producción de ácidos. Adicionalmente, al igual que las cepas LMB-HP19 *Penicillium mallochii* y LMB-HP37 *Penicillium mallochii*, no hay reportes de estudios de los metabolitos producidos por esta especie, con lo cual este trabajo aportaría nueva información acerca la capacidad de producción de metabolitos de posible uso industrial por la especie *Penicillium maximae*.

La cepa LMB-HU1 fue identificada como *Aspergillus amoenus*. Jurjevic *et al.* (2012) reportaron las características morfológicas de la especie *A. amoenus*: esporas verdes-grisáceas, producción de colorante amarillo-marrón, ausencia de exudados en medio

MEA, las cuales coincidieron con lo descrito en el presente estudio (tabla 14 y la figura 19). Adicionalmente, no hay reportes previos de estudios de la producción de colorante a partir de esta especie pero sí de la producción de compuestos de actividad biológica como notoamida S y 6-*epi*-estefacidin A (Kato *et al.* 2015).

Las cepas LMB-HL1 y LMB-HL2 fueron identificadas como *Trichoderma ressei*. *Trichoderma spp.* se caracterizan por ser de crecimiento rápido, poseen conidios verdes y la estructura de sus conidióforos es repetitivamente ramificada (Gams y Bissett 1998). Esta descripción coincide con las reportadas en el presente trabajo (tabla 14, figuras 20 y 21). Esta especie puede crecer en variedad de ecosistemas, desde bosques tropicales hasta en condiciones de laboratorio (Schuster y Schmoll 2010). Además, es muy estudiada debido a que puede producir metabolitos de importancia económica como antibióticos y enzimas, siendo las celulasas y hemicelulasas de amplio uso en la industria del papel, textil, de los alimentos y en la producción de biocombustibles (Adav *et al.* 2012, Schuster y Schmoll 2010). Se ha reportado la excreción de colorante amarillo por cepas de *Trichoderma ressei*, en producciones de enzimas a gran escala, sin embargo, su co-producción dificulta la obtención del metabolito de interés e implica un incremento en los gastos de producción (Derntl *et al.* 2016). Por ello, no hay muchos estudios enfocados en el posible uso del colorante producido por *Trichoderma ressei*.

4.3. PRODUCCIÓN DE COLORANTES POR CEPAS PRODUCTORAS SELECCIONADAS

Previamente se seleccionaron 8 cepas con la capacidad de producir colorantes en el medio sólido agar papa dextrosa. Posteriormente, con la finalidad de analizar la producción de colorantes en medio líquido por dichas cepas seleccionadas, se realizó la fermentación sumergida en caldo papa dextrosa. La figura 30 muestra los medios líquidos con los colorantes producidos por las cepas seleccionadas luego de 7 días de crecimiento:

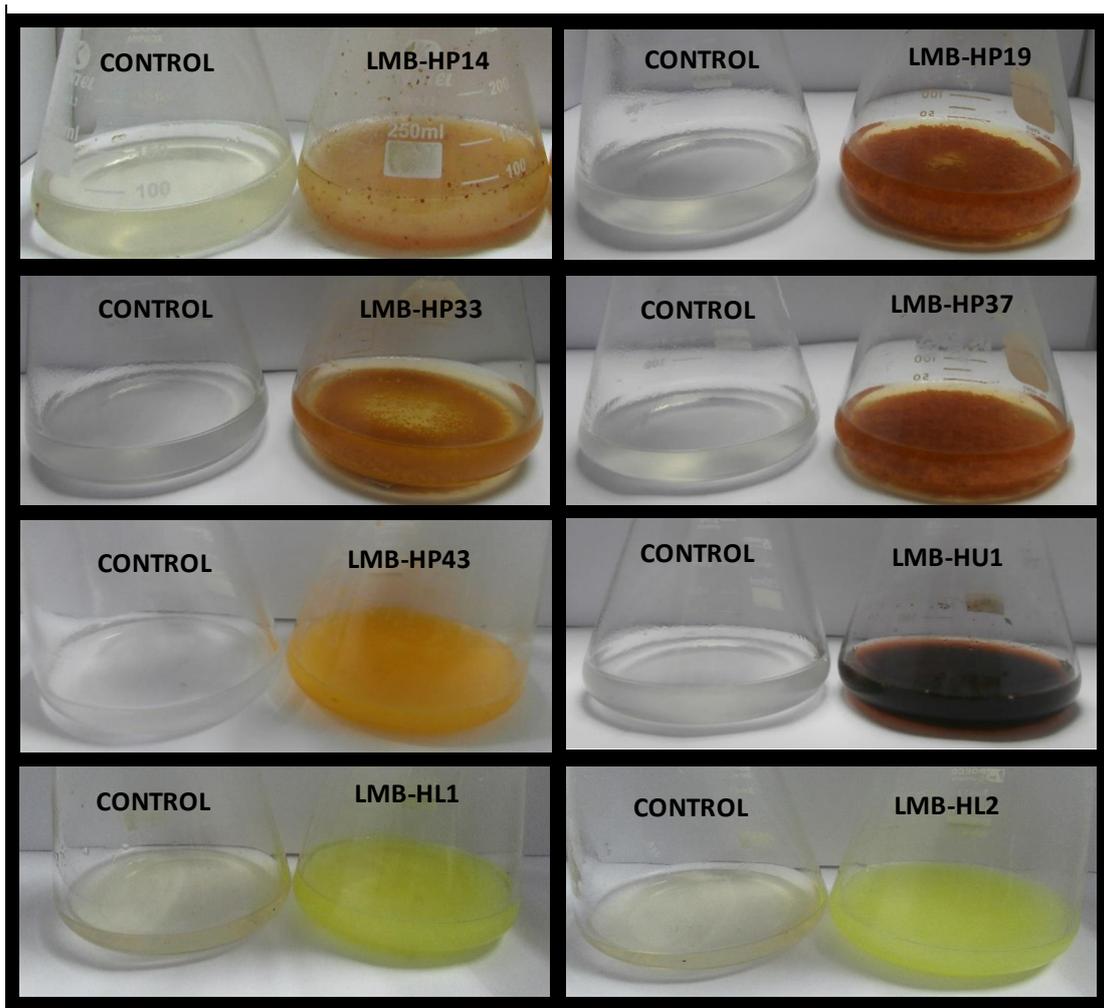


Figura 30: Colorantes producidos en fermentación sumergida por cepas seleccionadas en Caldo papa dextrosa luego de 7 días de incubación.

Donde: Control, Caldo papa dextrosa no cultivado

Se retiró una alícuota de cada colorante presente en el medio de producción y se diluyó con el mismo medio hasta que las absorbancias fueran menores o iguales a 1. A continuación, se muestra el análisis espectrofotométrico UV-Visible de los colorantes producidos en medio líquido por fermentación sumergida:

Tabla 17: Resultados del análisis espectrofotométrico UV-Visible de los colorantes producidos por las cepas seleccionadas

Cepa	λ máx (Visible)	Absorbancia	Biomasa formada (g)	UCP (g/L)
LMB-HP 14	368 nm	0.73 ± 0.040	0.08 ± 0.052	1.76
LMB-HP19	378 nm	0.72 ± 0.050	0.08 ± 0.010	1.67
LMB-HP33	378 nm	0.64 ± 0.060	0.09 ± 0.010	1.68
LMB-HP37	378 nm	0.58 ± 0.030	0.28 ± 0.020	1.65
LMB-HP43	362 nm	0.32 ± 0.010	0.09 ± 0.002	1.19
LMB-HU1	364 nm	0.35 ± 0.030	0.11 ± 0.010	1.71
LMB-HL1	376 nm	0.20 ± 0.020	0.12 ± 0.002	1.00
LMB-HL2	376 nm	0.16 ± 0.010	0.44 ± 0.002	1.01

Los valores de biomasa formada y unidades de colorantes producido (UCP), son promedios de tres réplicas \pm desviación estándar (DS)

Los espectros de absorción de cada colorante presente en caldo papa dextrosa, producido por fermentación sumergida, se muestran a continuación:

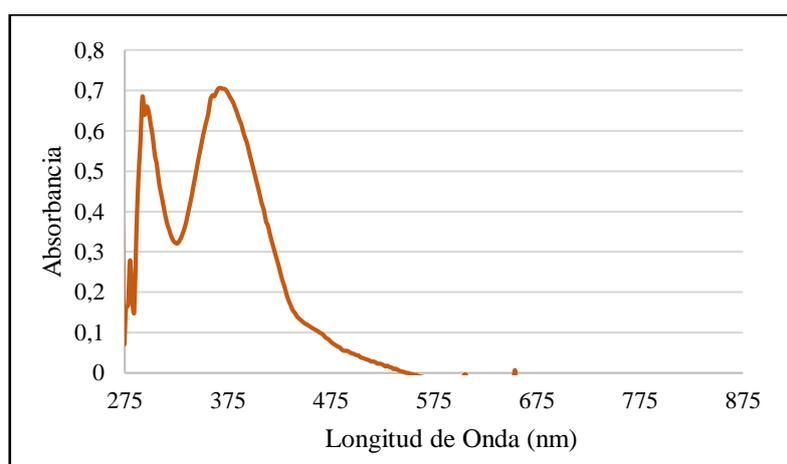


Figura 31: Espectro de absorción UV-Visible del colorante producido en fermentación sumergida por la cepa LMB-HP14 *Talaromyces wortmannii*

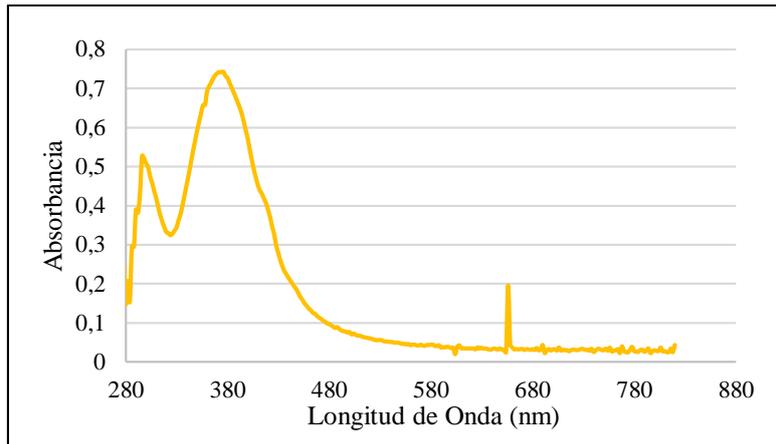


Figura 32: Espectro de absorción UV-Visible del colorante producido por fermentación sumergida por la cepa LMB-HP19 *Penicillium mallochii*

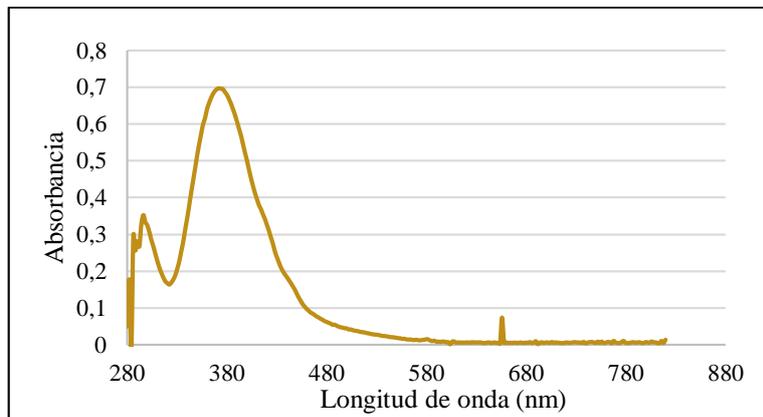


Figura 33: Espectro de absorción UV-Visible del colorante producido en fermentación sumergida por la cepa LMB-HP33 *Penicillium maximae*

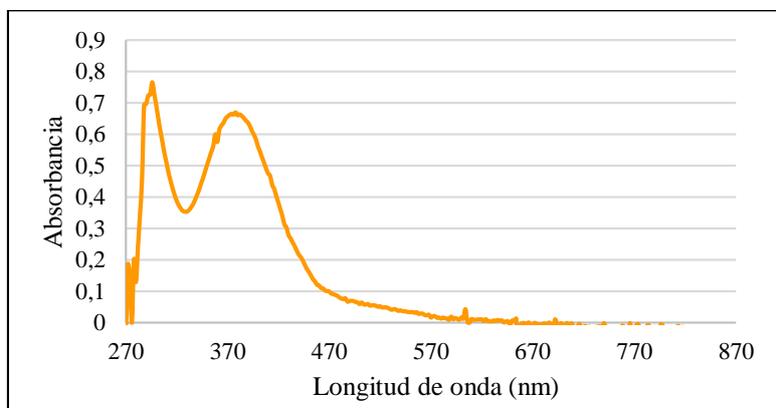


Figura 34: Espectro de absorción UV-Visible del colorante producido en fermentación sumergida por la cepa LMB-HP37 *Penicillium mallochii*

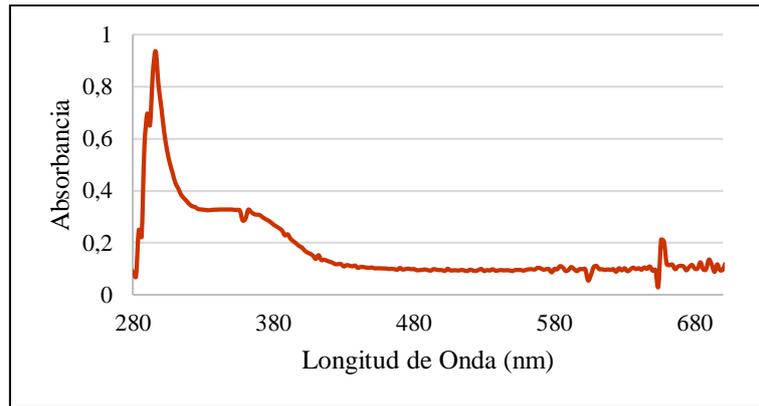


Figura 35: Espectro de absorción UV-Visible del colorante producido en fermentación sumergida por la cepa LMB-43 *Talaromyces brunneus*

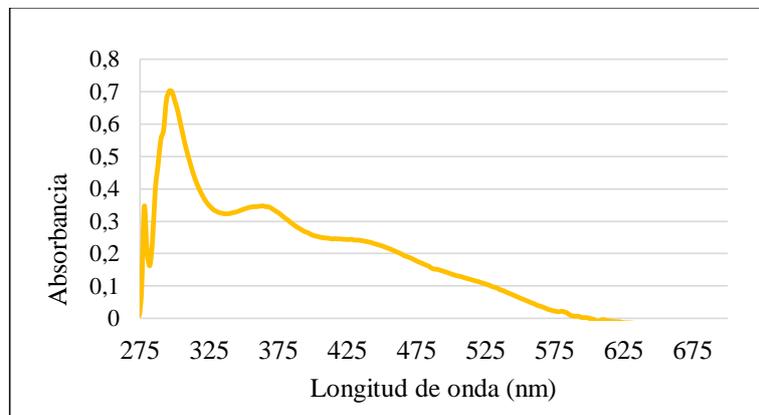


Figura 36: Espectro de absorción UV-Visible del colorante producido en fermentación sumergida por la cepa LMB-HU1 *Aspergillus amoenus*

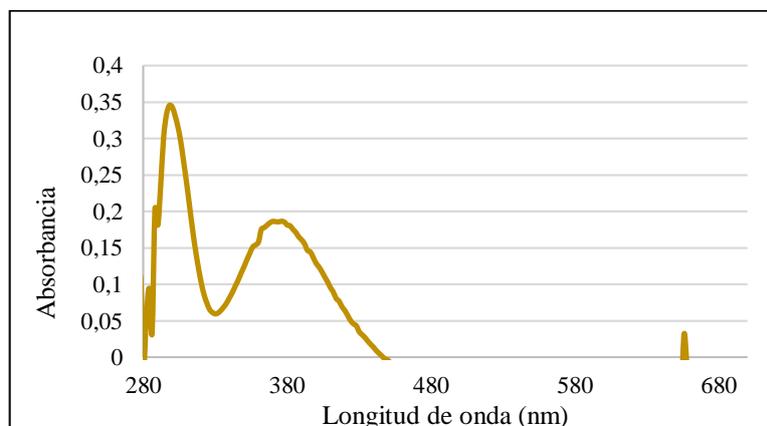


Figura 37: Espectro de absorción UV-Visible del colorante producido en fermentación sumergida por la cepa LMB-HL1 *Trichoderma reesei*

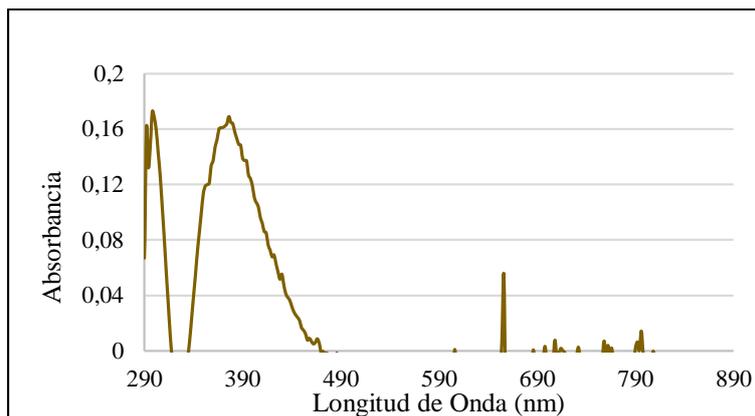


Figura 38: Espectro de absorción UV-Visible del colorante producido en fermentación sumergida por la cepa LMB-HL2 *Trichoderma reesei*

Se puede apreciar que los colorantes producidos en fermentación sumergida por las cepas seleccionadas son anaranjados, amarillos y marrones, los cuales han sido reportados previamente para especies de los géneros *Penicillium sp*, *Aspergillus sp*, *Monascus sp.*, *Trichoderma sp*, *Talaromyces sp.*, entre otros (Da costa *et al.* 2016, Texeira *et al.* 2012, Dufossé 2006, Caro *et al.* 2012). Adicionalmente, se observa que la longitud de onda de mayor absorbancia para todos ellos se encuentra en el rango de 360nm – 380nm, longitudes a las cuales la luz emitida es color amarillo (Macy 1943).

En la tabla 17 se observa que las cepas que produjeron mayor cantidad de colorantes en Caldo papa dextrosa fueron LMB-HP14 *Talaromyces wortmannii* (1.76 g/L), LMB-HP33 *Penicillium maximae* (1.68 g/L), y LMB-HU1 *Aspergillus amoenus* (1.71 g/L). Estas productividades fueron superiores a las reportadas por Da costa *et al.* (2016), para las cepas productoras de colorantes *Aspergillus sydowii* CML2967 (0.98 g/L), *Aspergillus aureolatus* CML2964 (0.68 g/L), *Aspergillus keveii* CML2968 (0.2 g/L), *Penicillium flavigenum* CML2965 (1.56 g/L), *Penicillium chermesinum* CML2966 (no detectado) en Caldo papa dextrosa. Todas ellas produjeron colorantes amarillos cuya longitud de onda de máxima absorción fue cercana a 400nm.

Adicionalmente se evidenció la producción de colorantes por fermentación sumergida en Caldo papa dextrosa bajo parámetros diferentes a los utilizados en la industria de los colorantes sintéticos: medio de cultivo barato y no tóxico, bajas temperaturas de

producción (cerca de 30°C), lo que implica un ahorro en energía y pH cercanos al neutro (Aishwayra 2014). Además, el ahorro en los costos de producción de fermentación sumergida, comparados con los de fermentación en estado sólido, hace suponer que la producción de metabolitos en medio líquido sería lo ideal para aplicaciones industriales, tal y como lo reporta Mukherjee y Singh, (2011). Por ello, los colorantes producidos por las 8 cepas seleccionadas en el presente trabajo pueden tener uso en la industria textil, de los alimentos y cosmética.

4.4. CARACTERIZACIÓN INICIAL DE LOS COLORANTES PRODUCIDOS

En la caracterización inicial de los colorantes producidos por las cepas seleccionadas, se trabajó con los colorantes extraídos con el método de Velmurugan *et al.* (2009), para evitar interferencia con otros componentes presentes en el medio de producción. Luego fueron analizados mediante Espectroscopía UV /Visible y Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) para poder caracterizarlos preliminarmente.

En la tabla 18 se muestra las longitudes de onda de mayor absorción para cada uno de los colorantes extraídos. Así mismo, las figuras 39 al 46 corresponden a los espectros de absorción de los colorantes extraídos de biomasa.

Tabla 18: Resultados del Análisis espectrofotométrico UV-Visible de los colorantes extraídos a partir de biomasa

Cepas	Longitud de onda máxima	
	UV	Visible
LMB-HP14 <i>Talaromyces wortmannii</i>	294 nm	430 nm
LMB-HP19 <i>Penicillium mallochii</i>	292 nm	394 nm
LMB-HP33 <i>Penicillium maximae</i>	294 nm	388 nm
LMB-HP37 <i>Penicillium mallochii</i>	294 nm	374 nm
LMB-HP43 <i>Talaromyces brunneus</i>	294 nm	390 nm
LMB-HU1 <i>Aspergillus amoenus</i>	290 nm	NA
LMB-HL1 <i>Trichoderma reesei</i>	290 nm	NA
LMB-HL2 <i>Trichoderma reesei</i>	296 nm	NA

Donde:

NA: no detectado

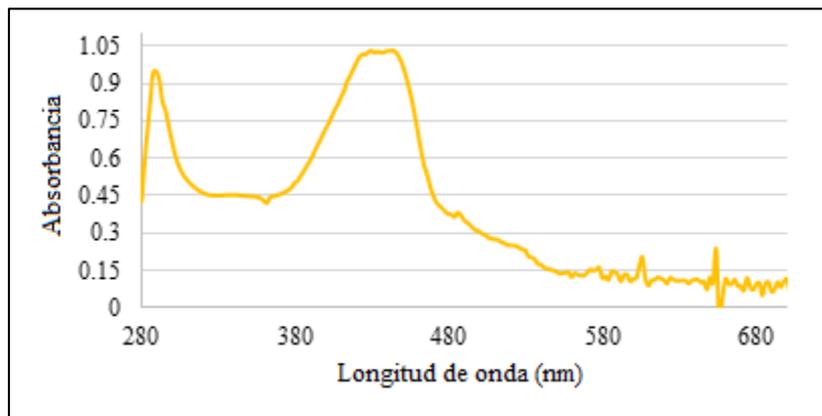


Figura 39: Espectro de absorción UV/Visible del colorante extraído de biomasa de la cepa LMB-HP14 *Talaromyces wortmannii*

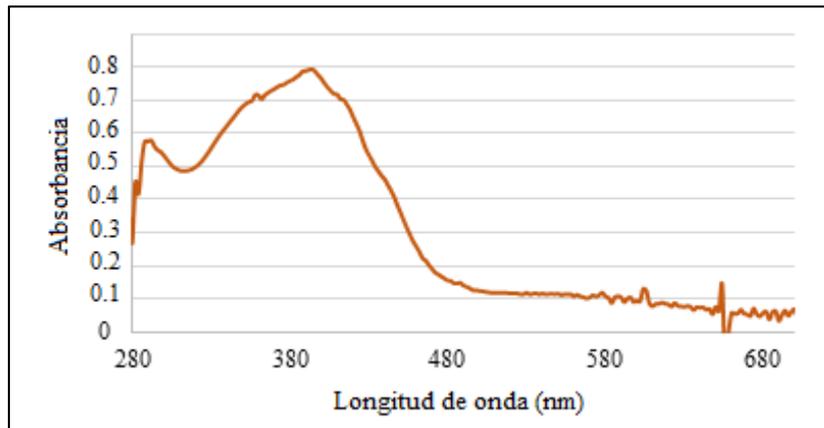


Figura 40: Espectro de absorción UV/Visible del colorante extraído de biomasa de la cepa LMB-HP19 *Penicillium mallochii*

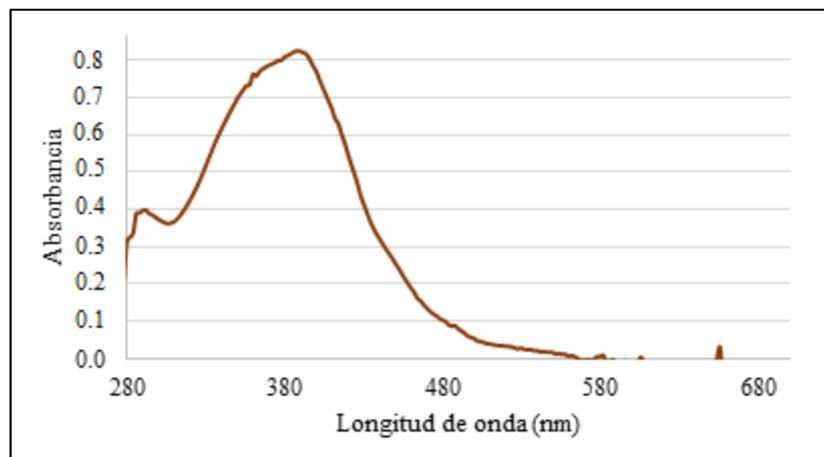


Figura 41: Espectro de absorción UV/Visible del colorante extraído de biomasa de la cepa LMB-HP33 *Penicillium maximae*

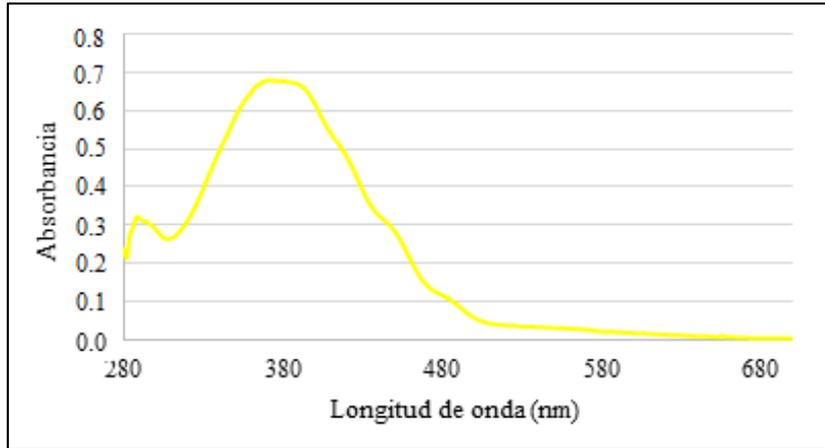


Figura 42: Espectro de absorción UV/Visible del colorante extraído de biomasa de la cepa LMB-HP37 *Penicillium mallochii*

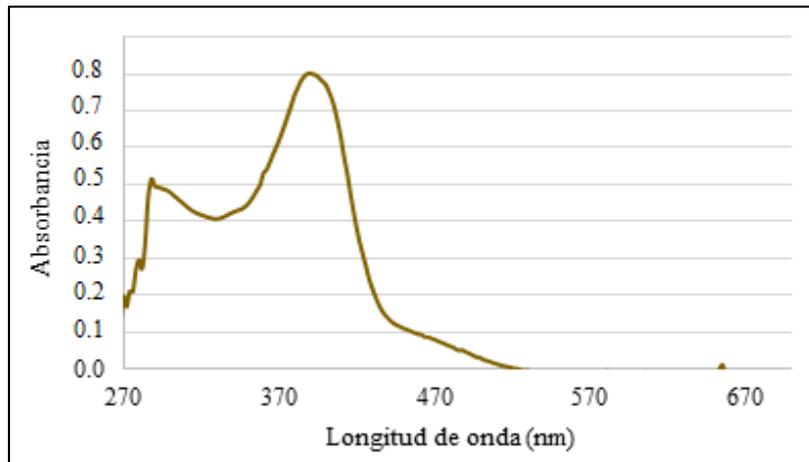


Figura 43: Espectro de absorción UV/Visible del colorante extraído de biomasa de la cepa LMB-HP43 *Talaromyces brunneus*

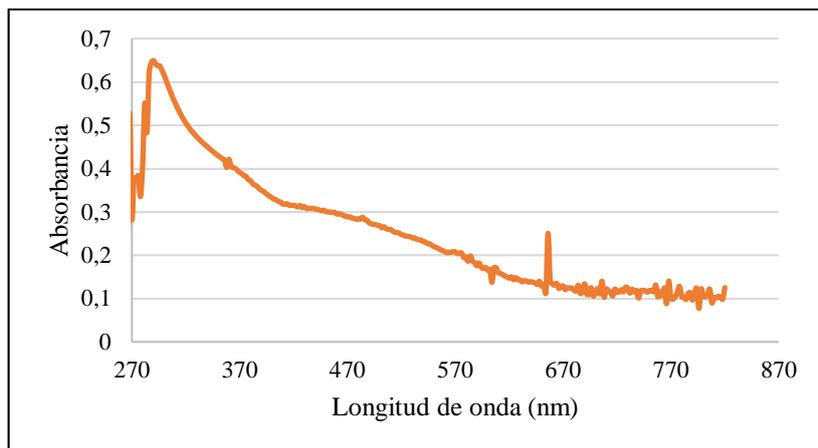


Figura 44: Espectro de absorción UV/Visible del colorante extraído de biomasa de la cepa LMB-HU1 *Aspergillus amoenus*

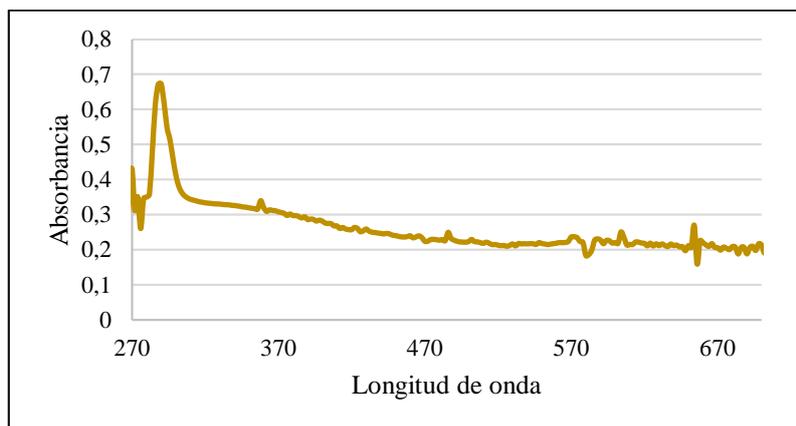


Figura 45: Espectro de absorción UV/Visible del colorante extraído de biomasa de la cepa LMB-HL1 *Trichoderma reesei*

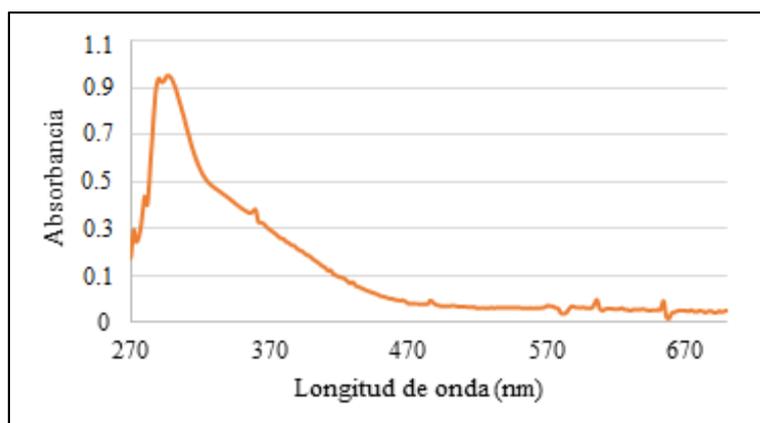


Figura 46: Espectro de absorción UV/Visible del colorante extraído de biomasa de la cepa LMB-HL2 *Trichoderma reesei*

Si bien la tabla 17 muestra las longitudes de onda de mayor absorción de los colorantes producidos en caldo papa dextrosa, estos colorantes y otros metabolitos producidos pueden estar formando asociaciones intermoleculares que causen efectos hipsocrómicos o batocrómicos, por lo cual, las longitudes de onda reportadas pueden no corresponder únicamente al colorante en estudio. Por ello se hizo necesario analizar los colorantes directamente de biomasa molida. El uso de biomasa para la obtención de colorantes es utilizado como primer paso en la identificación química de dichos metabolitos mediante Espectrometría de masas o Resonancia magnética nuclear (Velmurugan *et al.* 2009, Lebeau *et al.* 2017). Dicho esto, se observa que, las longitudes de onda de máxima absorción de los colorantes, tanto en caldo papa dextrosa como en etanol, no son los mismos para cada cepa (tablas 17 y 18). En el caso de los colorantes de las cepas LMB-HU1 *Aspergillus amoenus*, LMB-HL1 *Trichoderma reesei* y LMB-HL2 *Trichoderma reesei*, se observa que los picos de absorción en 364nm y 376 nm no aparecen en el espectro de absorción de los colorantes extraídos de biomasa. Probablemente, este cambio se deba a un efecto hipocrómico, donde se evidencia la disminución en la intensidad de la absorción de los colorantes.

Es importante señalar que, contrariamente a lo esperado, los picos de absorción de los colorantes extraídos en etanol a partir de biomasa fueron menos definidos que aquellos reportados en la tabla 17 (colorantes producidos en fermentación sumergida). Este comportamiento probablemente se debe a que la muestra blanco del análisis

espectrofotométrico de los colorantes extraídos de biomasa sólo contuvo el solvente etanol como blanco, mas no otros metabolitos provenientes de biomasa, que hayan podido absorber a las mismas longitudes de onda que los colorantes en estudio, debido a que la producción e identificación de dichos analitos no han sido definidos; en contraste con la muestra blanco correspondiente al análisis de la tabla 17, donde su composición fue el del medio caldo papa dextrosa. Sin embargo, la mayor información sobre la caracterización e identificación de metabolitos mediante técnicas analíticas han sido reportadas utilizando etanol como solvente parcial o total, por ello fue necesario utilizar la información de los colorantes extraídos a partir de biomasa para realizar su la caracterización inicial.

En el caso de FT-IR, los resultados fueron obtenidos mediante el programa OMNIC espectra. Se utilizó la opción de identificación e interpretación. Se seleccionaron aquellos grupos funcionales con un porcentaje igual o mayor a 70% de coincidencia. Adicionalmente, se analizaron las bandas de absorción en el IR de la mezcla de solventes utilizados en la prueba y sus resultados fueron utilizados como Control (blanco). Los resultados de muestran en la tabla 19.

Tabla 19: Resultados del análisis espectrofotométrico IR de los colorantes extraídos de biomasa por el *software* OMNIC Specta

Cepa	Transmitancia (cm-1)	Grupo funcional	Porcentaje de coincidencia
BLANCO	3381,90	Alcohol alifático primario (OH)	70%
	2258,21	Nitrilos alifáticos (C≡N)	70%
	1046,38	Alcohol alifático primario (C-O)	70%
LMB-HP14	3354,88	Alcohol alifático primario (OH)	70%
	1663,22		
	1045,49	Alcohol alifático primario (C-O)	70%
LMB-HP19	3338,75	Alcohol alifático primario (OH)	70%
	1643,81		
	1045,85	Alcohol alifático primario (C-O)	70%
LMB-HP33	3362,38	Alcohol alifático primario (OH)	70%
	2258,21	Nitrilos alifáticos (C≡N)	70%
	1644,48	Quinona	70%
	1044,63	Alcohol alifático primario (C-O)	70%
LMB-HP37	3335,07	Alcohol alifático primario (OH)	70%
	1640,64	Quinona	70%
	1043,98	Alcohol alifático primario (C-O)	70%
LMB-HP43	3350,47	Alcohol alifático primario (OH)	70%
	1639,89		
	1044,57	Alcohol alifático primario (C-O)	70%
LMB-HU1	3296,64	Alcohol alifático primario (OH)	70%
	1644,11	Quinona	70%
	1043,82	Alcohol alifático primario (C-O)	70%
LMB-HL1	3281,02	Alcohol alifático primario (OH)	70%
	1640,13	Quinona	70%
	1044,34	Alcohol alifático primario (C-O)	70%
LMB-HL2	3342,31	Alcohol alifático primario (OH)	70%
	1643,70	Quinona	70%
	1044,08	Alcohol alifático primario (C-O)	70%

Los espectros en el IR de los colorantes producidos por las 8 cepas seleccionadas se muestran a continuación:

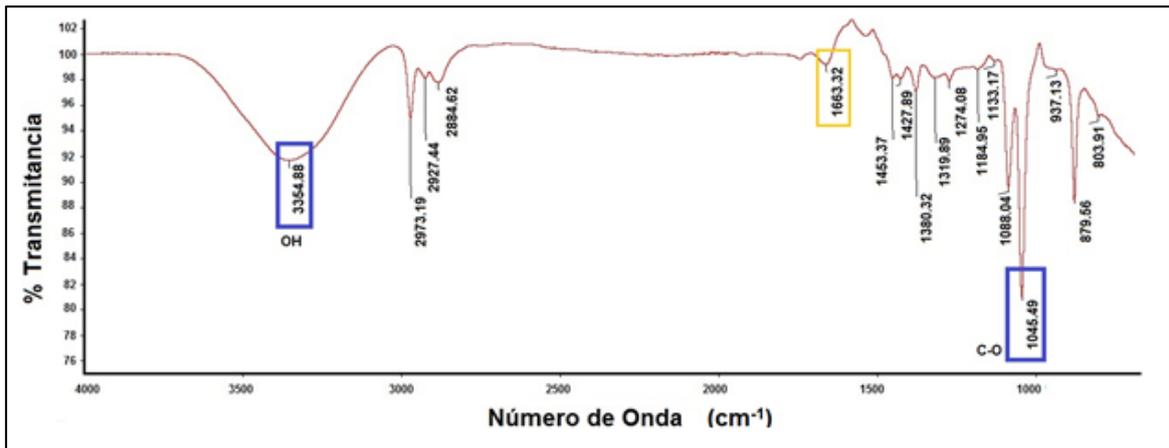


Figura 47: Espectro en el IR del colorante extraído de biomasa de la cepa LMB-HP14 *Talaromyces wortmannii*

Donde: cuadros azules, picos correspondientes a grupos funcionales correspondientes al Blanco etanol; acetonitrilo; cuadro amarillo, picos correspondientes al grupo funcional C=O de Quinonas.

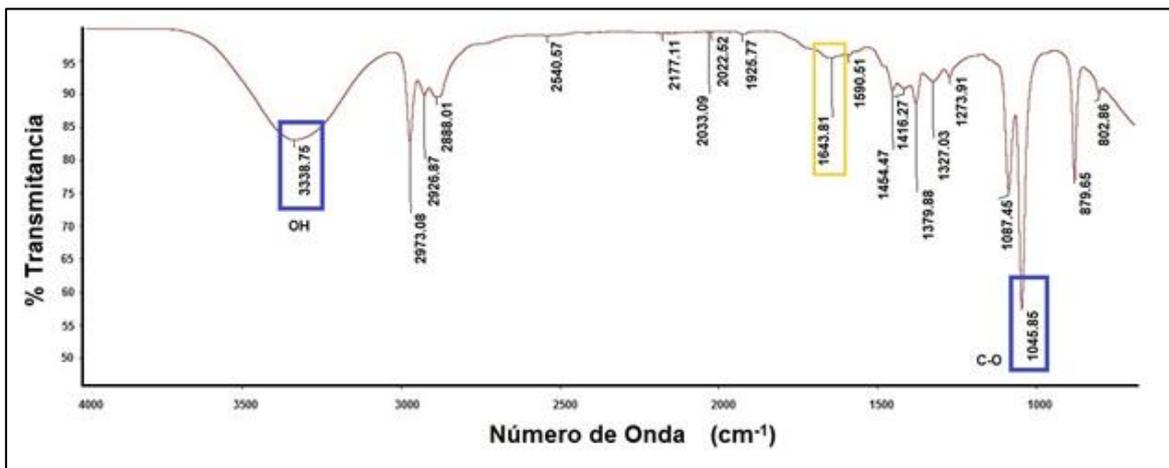


Figura 48: Espectro en el IR del colorante extraído de biomasa de la cepa LMB-HP19 *Penicillium mallochii*

Donde: cuadros azules, picos correspondientes a grupos funcionales correspondientes al Blanco etanol; acetonitrilo; cuadro amarillo, picos correspondientes al grupo funcional C=O de Quinonas.

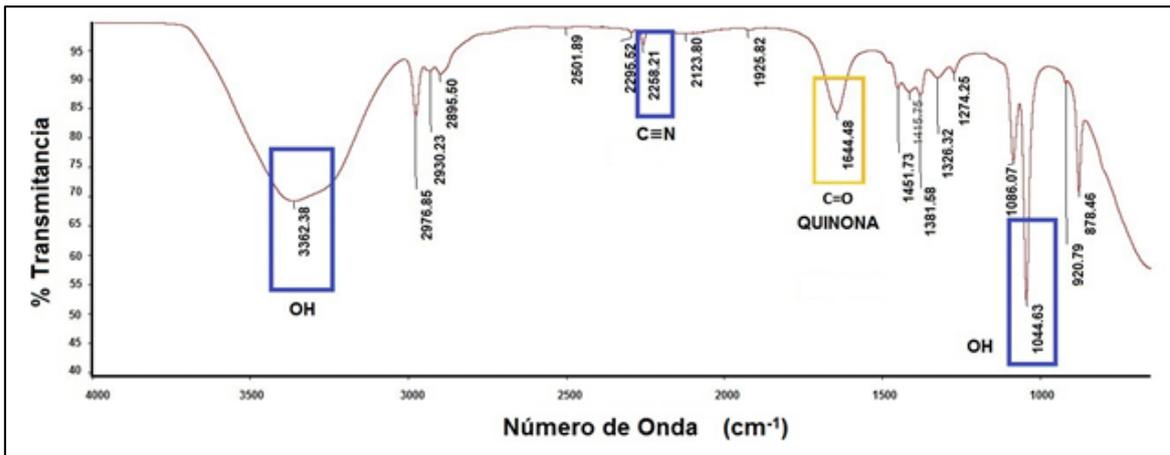


Figura 49: Espectro en el IR del colorante extraído de biomasa de la cepa LMB-HP33 *Penicillium maximae*

Donde: Cuadros azules, picos correspondientes a grupos funcionales correspondientes al Blanco etanol; acetonitrilo; cuadro amarillo, picos correspondientes al grupo funcional C=O de Quinonas.

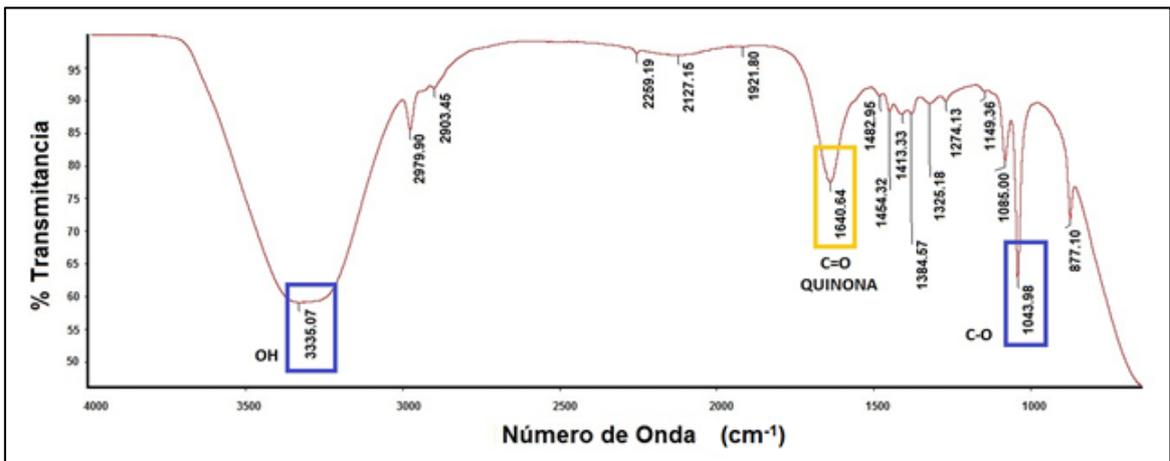


Figura 50: Espectro en el IR del colorante extraído de biomasa de la cepa LMB-HP37 *Penicillium mallochii*

Donde: cuadros azules, picos correspondientes a grupos funcionales correspondientes al Blanco etanol; acetonitrilo; cuadro amarillo, picos correspondientes al grupo funcional C=O de Quinonas.

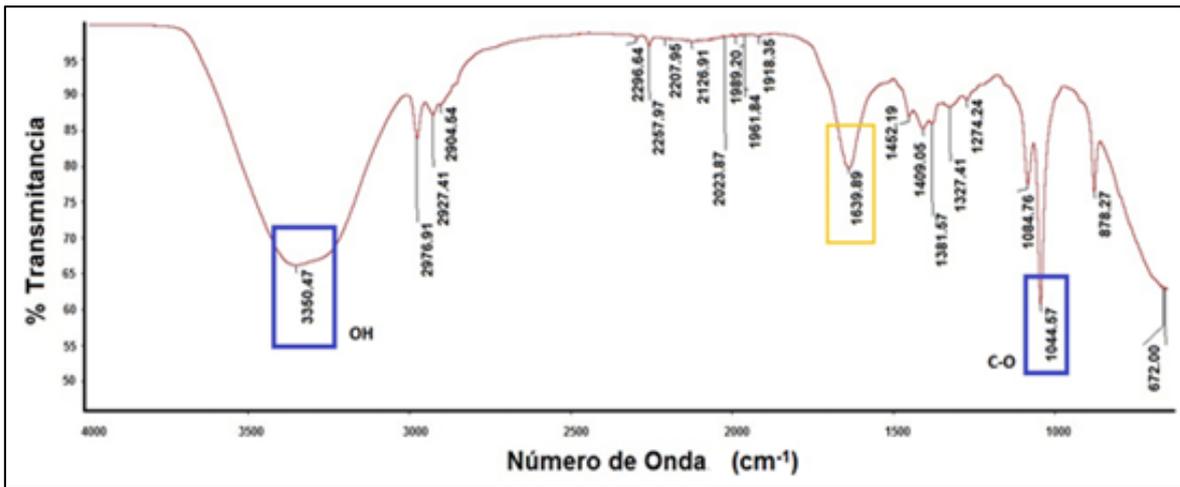


Figura 51: Espectro en el IR del colorante extraído de biomasa de la cepa LMB-HP43 *Talaromyces brunneus*

Donde: cuadros azules, picos correspondientes a grupos funcionales correspondientes al Blanco etanol: acetonitrilo; cuadro amarillo, picos correspondientes al grupo funcional C=O de Quinonas.

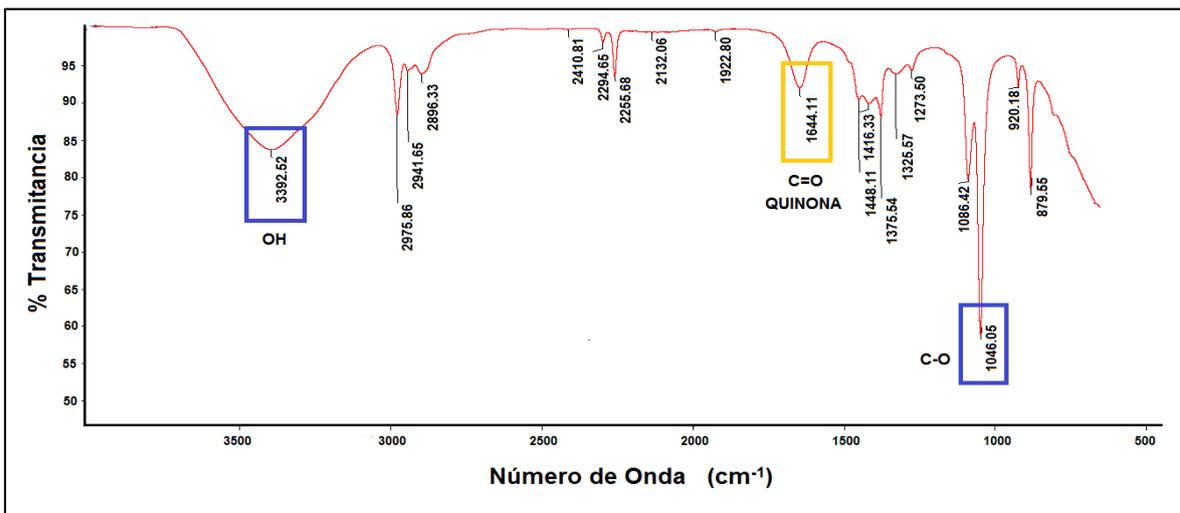


Figura 52: Espectro en el IR del colorante extraído de biomasa de la cepa LMB-HU1 *Aspergillus amoenus*

Donde: cuadros azules, picos correspondientes a grupos funcionales correspondientes al Blanco etanol: acetonitrilo; cuadro amarillo, picos correspondientes al grupo funcional C=O de Quinonas.

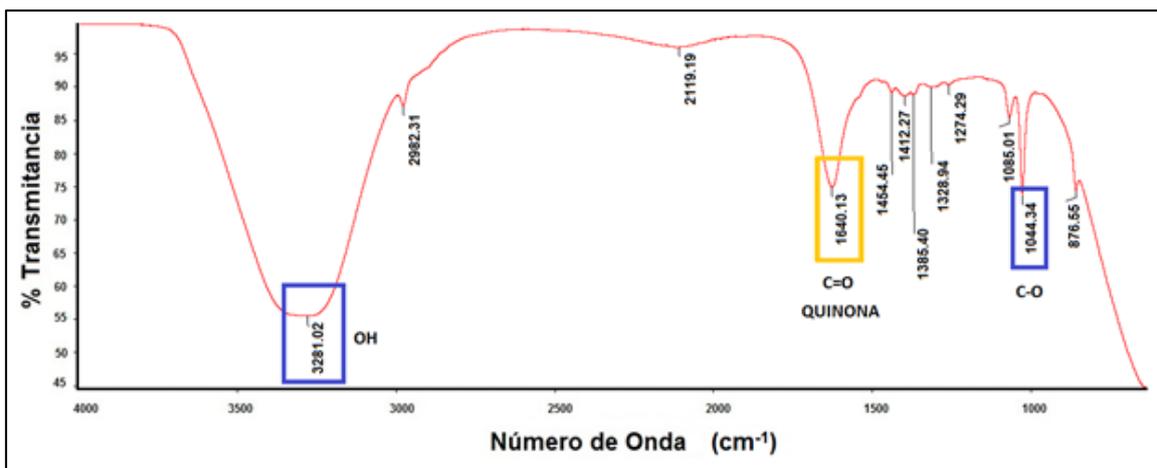


Figura 53: Espectro en el IR del colorante extraído de biomasa de la cepa LMB-HL1 *Trichoderma reesei*

Donde: cuadros azules, picos correspondientes a grupos funcionales correspondientes al Blanco etanol: acetonitrilo; cuadro amarillo, picos correspondientes al grupo funcional C=O de Quinonas.

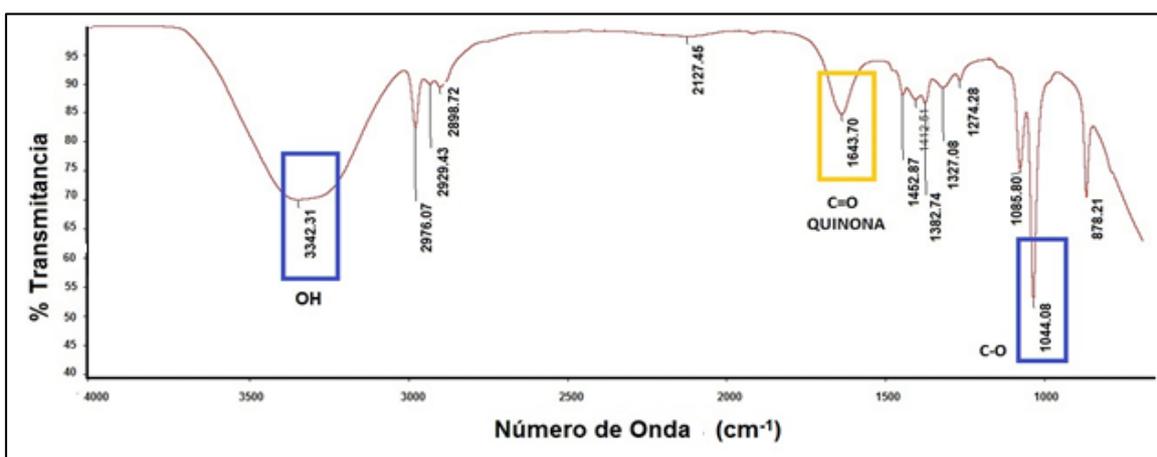


Figura 54: Espectro de absorción en el IR del colorante extraído de biomasa de la cepa LMB-HL2 *Trichoderma reesei*

Donde: cuadros azules, picos correspondientes a grupos funcionales correspondientes al Blanco etanol: acetonitrilo; cuadro amarillo, picos correspondientes al grupo funcional C=O de Quinonas.

Según los resultados obtenidos por Espectroscopía UV/Visible, los colorantes producidos por las cepas LMB-HP14 *Talaromyces wortmannii*, LMB-HP19 *Penicillium mallochii*, LMB-HP33 *Penicillium maximae*, LMB-HP37 *Penicillium mallochii* y LMB-HP43 *Talaromyces brunneus* presentan dos picos de máxima absorción, uno cercano a 290nm, y el otro en el rango de 370 nm-430 nm los cuales concuerdan con los picos de absorbancia descritos para Quinonas (Mistry 2009). Las cepas LMB-HU1 *Aspergillus*

amoenus, LMB-HL1 *Trichoderma reesei* y LMB-HL2 *Trichoderma reesei* presentaron sólo un pico de máxima absorción a 290nm. Estas longitudes de onda corresponden a transiciones electrónicas $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$, de los grupos funcionales C=O, propio de dicetonas como las quinonas, las cuales emiten luz amarilla, luego de absorber radiación azul y violeta (Macy 1943, Christian *et al.* 2013).

Adicionalmente, del total de muestras de colorantes analizadas por Espectroscopía FT-IR, sólo en los producidos por las cepas LMB-HP33 *Penicillium maxilliae*, LMB-HP37 *Penicillium mallochii*, LMB-HU1 *Aspergillus amoenus*, LMB-HL1 *Trichoderma reesei* y LMB-HL2 *Trichoderma reesei* se identificó la presencia de grupos funcionales diferentes a los del control. En todos los casos, el pico fue cercano a 1650 cm^{-1} , propio del grupo funcional Carbonilo de Quinonas (Thermo scientific 2008-2009) (Tabla 19).

Con respecto a la identificación de los picos de absorbancia de los colorantes producidos por las cepas LMB-HP14 *Talaromyces wortmannii*, LMB-HP19 *Penicillium mallochii* y LMB-HP43 *Talaromyces brunneus*, estos fueron similares a los del control, es decir, no se encontró ningún pico significativo que pueda indicar la presencia de algún grupo funcional diferente a los característicos del etanol y acetonitrilo (tabla 19). Sin embargo, en todos ellos aparece el pico de absorbancia cercano a 1650 cm^{-1} , propio de Quinonas, el cuál ha sido reportado en colorantes tipo hidroxiquinona (tabla 4).

Estos resultados guardan relación con estudios previos, los cuales señalan que, para especies del género *Penicillium*, *Aspergillus* y *Trichoderma*, los colorantes producidos por dichas especies son antraquinonas e hidroxiquinonas (Texeira *et al.* 2012, Dufossé 2006, Sardaryan 2002, Caro *et al.* 2012). Además, se puede observar que, entre los picos de absorbancia descritos para colorantes azafilonas (tabla 5), no hay coincidencia con los reportados en el presente trabajo. Es importante recalcar que, si bien los picos de absorbancia IR descritos para flavonoides concuerdan con los obtenidos en el presente trabajo (C-O, OH, C=O), el programa no identificó otros grupos funcionales propios de estos compuestos (C=C), además que su biosíntesis está generalmente asociada a plantas, y cuya función es brindar protección contra patógenos como hongos, radiación UV, entre otros (Muedas 2013, Falcone *et al.* 2012).

Finalmente, se ha reportado la producción de colorantes de naturaleza antraquinona por las cepas *Talaromyces brunneus* y *Talaromyces wortmannii* identificados como emodin, eskirin y rugulosina (Breen *et al.* 1955, Shibata y Ikekawa 1963, Seo *et al.* 1973), lo cual confirma la identificación realizada mediante la espectroscopía UV/Visible y FT-IR para los colorantes producidos. Sin embargo, hay reportes del posible efecto hepatocarcinógeno del colorante rugulosina (Ueno *et al.* 1980), por ello es necesario identificar químicamente los colorantes producidos por las cepas LMB-HP14 *Talaromyces wortmannii* y LMB-HP43 *Talaromyces brunneus* con el fin de garantizar su posible uso como colorante en las diferentes industrias.

4.5. IDENTIFICACIÓN DE GENES DE BIOSÍNTESIS DE MICOTOXINAS EN LAS CEPAS SELECCIONADAS

En el presente trabajo se logró identificar la cepa LMB-HU1 como *Aspergillus amoenus*, por lo tanto, fue necesaria la identificación de genes de biosíntesis de aflatoxina en esta cepa ya que esta micotoxina es usualmente producida por especies del género *Aspergillus* (Gallo *et al.* 2013). Como parte de la identificación, se utilizaron las cepas de referencia INS-*Aspergillus flavus* e INS-*Aspergillus oryzae*, las cuales fueron inicialmente evaluadas y se verificó que los 4 pares de cebadores correspondientes a los genes de la ruta de biosíntesis de aflatoxinas amplificaron para dichas cepas, por ello fueron utilizadas como controles positivo (Figuras 54, 55, 56 y 57), además las secuencias de dichas amplificaciones concordaron con secuencias de la base de datos del NCBI, correspondiente a cada uno de los genes antes mencionados, mostrando 100% y 90% de similaridad (tablas 20, 21, 22 y 23). Sin embargo, la cepa LMB-HU1 no amplificó para ninguno de estos genes, por lo cual se puede concluir que, posiblemente, no posee genes de biosíntesis de Aflatoxina. Estos resultados guardan relación con los expuestos por Van de Broek *et al.* (2001), quienes mostraron que todas las cepas aflatoxigénicas utilizadas en su estudio dejaron de ser productoras de dicha micotoxina cuando ocurrió la delección de los genes *AflR* y *Omt1*. Es por ello que la amplificación de estos genes correspondería a especies aflatoxigénicas, tal y como ocurre con INS-*Aspergillus flavus* e INS-*Aspergillus oryzae*.

Tabla 20: Resultados del secuenciamiento de las amplificaciones de genes de biosíntesis de aflatoxina utilizando cebadores del gen AfIR

NOMBRE DEL GEN	CÓDIGO	MICOTOXINA PRODUCIDA	CEPA	IDENTIFICACIÓN NCBI	% COBERTURA	% IDENTIDAD	ACCESIÓN
Gen de proteína reguladora de aflatoxina (AfIR)	AfIR	Aflatoxina	LMB-HU1 <i>Aspergillus amoenus</i>	NO HUBO AMPLIFICACIÓN			
			INS- <i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Aspergillus oryzae</i> gen afIR	100%	100%	Y16967.1
				<i>Aspergillus parasiticus</i> cultivo WRRL 1259 gen de proteína reguladora de aflatoxina (afIR), cds completo	100%	100%	KM262895.2
			INS- <i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i> gen afIR parcial AFLR, cepa ITEM 8083	100%	99%	FN398162.1
				<i>Aspergillus oryzae</i> cultivo NRRL 27027 gen de proteína reguladora de aflatoxina (afIR), cds completo	100%	99%	KM262903.2

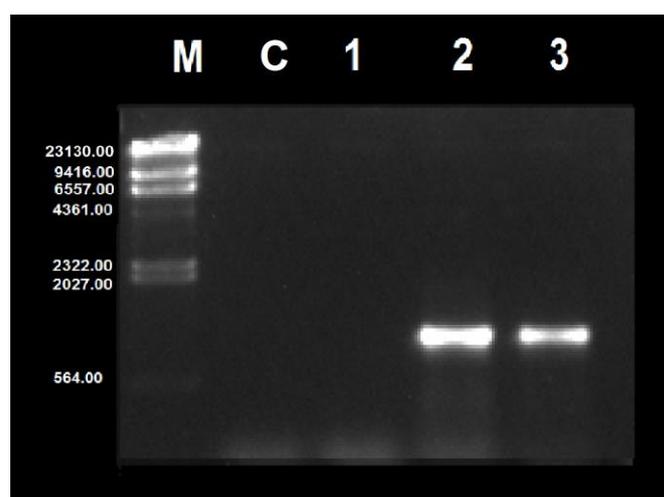


Figura 55: Amplificación del gen AfIR de hongos productores de colorantes.

Electroforesis horizontal en gel de agarosa (1%). M: marcador de peso Fago lambda digerido con Hind III. C: Control negativo, 1: gen AfIR de LMB- LMB-HU1 *Aspergillus amoenus*, 2: gen AfIR de INS-*Aspergillus oryzae*: 3: gen AfIR de INS-*Aspergillus flavus*.

Tabla 21: Resultados del secuenciamiento de las amplificaciones de genes de biosíntesis de aflatoxina utilizando cebadores del gen Nor1

NOMBRE DEL GEN	CÓDIGO	MICOTOXINA PRODUCIDA	CEPA	IDENTIFICACIÓN NCBI	% COBERTURA	% IDENTIDAD	ACCESIÓN
Gen norsolorínico ácido reductasa	NOR1	Aflatoxina	LMB-HU1 <i>Aspergillus amoenus</i>	NO HUBO AMPLIFICACIÓN			
			INS- <i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i> cepa NRRL 502 gen norsolorínico ácido reductasa, cds parcial	100%	100%	AY017631.1
				<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40 cetoreductasa nor-1 de ruta de biosíntesis de aflatoxina, mRNA	100%	99%	XM_001821461.1
			INS- <i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i> gen aflD parcial de AFLD, cepa ITEM 8083	100%	100%	FN398172.1
				<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40 cetoreductasa nor-1 de ruta de biosíntesis de aflatoxina, mRNA	100%	100%	XM_001821461.1

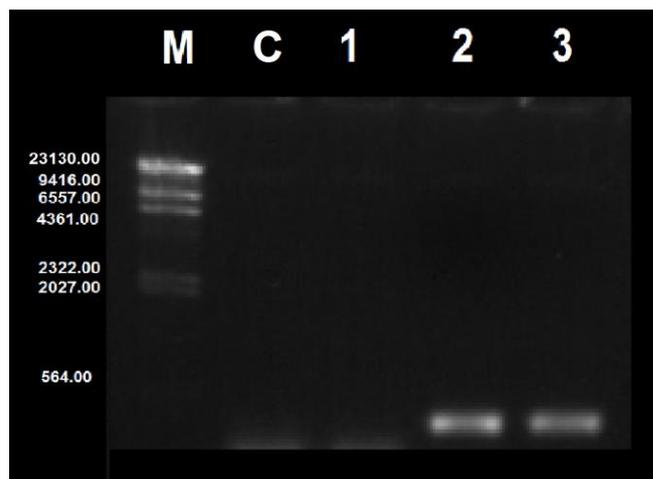


Figura 56: Amplificación del gen Nor1 de hongos productores de colorantes.

Electroforesis horizontal en gel de agarosa (1%). M: marcador de peso Fago lambda digerido con Hind III. C: Control negativo, 1: gen AflR de LMB- LMB-HU1 *Aspergillus amoenus*, 2: gen AflR de INS-*Aspergillus oryzae*: 3: gen AflR de INS-*Aspergillus flavus*.

Tabla 22: Resultados del secuenciamiento de las amplificaciones de genes de biosíntesis de aflatoxina utilizando cebadores del gen OmtA

NOMBRE DEL GEN	CÓDIGO	MICOTOXINA PRODUCIDA	CEPA PRODUCTORA	IDENTIFICACIÓN NCBI	% COBERTURA	% IDENTIDAD	ACCESIÓN
Gen O-metiltransferasa	OmtA	Aflatoxina	LMB-HU1 <i>Aspergillus amoenus</i>	NO HUBO AMPLIFICACIÓN			
			INS- <i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Aspergillus oryzae</i> colección de cultivo CECT:2095 gen O-metiltransferasa, cds parcial	100%	99%	JN217225.1
				<i>Aspergillus parasiticus</i> cluster de genes de ruta de biosíntesis de aflatoxina, secuencia completa	100%	99%	AY371490.1
			INS- <i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i> cepa CBS 100927 1-9 gen O-metiltransferasa-like (omt12), secuencia parcial	100%	100%	GU203504.1
				<i>Aspergillus flavus</i> cultivo SX8-1 gen O-metiltransferasa (omtA), cds parcial	100%	99%	FJ216371.1

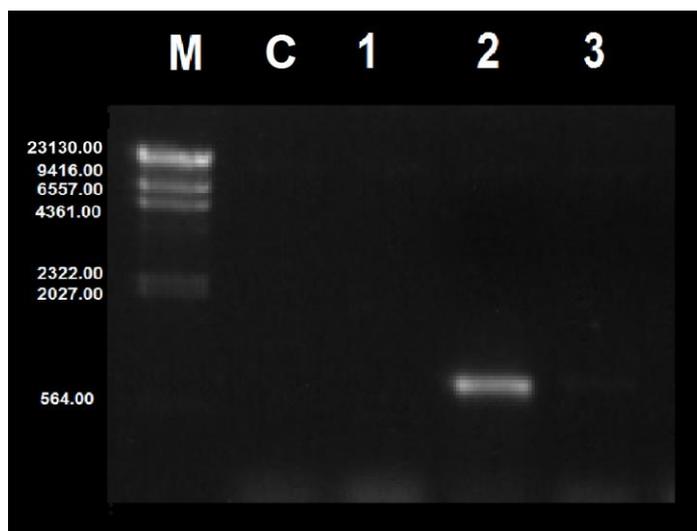


Figura 57: Amplificación del gen OmtA de hongos productores de colorantes.

Electroforesis horizontal en gel de agarosa (1%). M: marcador de peso Fago lambda digerido con Hind III. C: Control negativo, 1: gen AfIR de LMB- LMB-HU1 *Aspergillus amoenus*, 2: gen AfIR de INS-*Aspergillus oryzae*: 3: gen AfIR de INS-*Aspergillus flavus*.

Tabla 23: Resultados del secuenciamiento de las amplificaciones de genes de biosíntesis de aflatoxina utilizando cebadores del gen Ver1

NOMBRE DEL GEN	CÓDIGO	MICOTOXINA PRODUCIDA	CEPA PRODUCTORA	IDENTIFICACIÓN NCBI	% COBERTURA	% IDENTIDAD	ACCESIÓN
Gen Ver1	VER 1	Aflatoxina	LMB-HU1 <i>Aspergillus amoenus</i>	NO HUBO AMPLIFICACIÓN			
			INS- <i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Aspergillus sojae</i> gen ver-1, cds parcial, cepa NFRI 1147	100%	100%	AB007807.1
				<i>Aspergillus flavus</i> aislado AF13 cluster de genes de ruta de biosíntesis de aflatoxina, secuencia	100%	96%	AB076804.1
			INS- <i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i> gen ver-1, cds parcial, cepa RIB 1427	100%	100%	AB007805.1
				<i>Aspergillus oryzae</i> genes de AFLR, AFLJ, cadena corta de alcohol deshidrogenasa putativas, norsolorínico ácido reductasa putativa y VER1, cds completo	100%	100%	AB071288.1

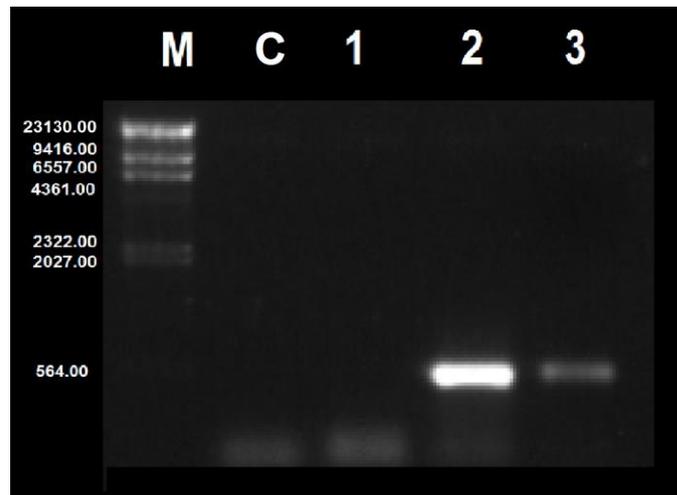


Figura 58: Amplificación del gen VER1 de hongos productores de colorantes.

Electroforesis horizontal en gel de agarosa (1%). M: marcador de peso Fago lambda digerido con Hind III. C: Control negativo, 1: gen AfIR de LMB- LMB-HU1 *Aspergillus amoenus*, 2: gen AfIR de INS-*Aspergillus oryzae*: 3: gen AfIR de INS-*Aspergillus flavus*.

Se sabe que la micotoxina patulina es producida por especies del género *Penicillium* y *Aspergillus*, por ello se evaluó la posible capacidad de producción de patulina por las cepas seleccionadas. Los resultados de las amplificaciones se muestran en la tabla 24 y la figura 58.

Tabla 24: Resultados del secuenciamiento de las amplificaciones de genes de biosíntesis de patulina utilizando cebadores del gen *idh*

NOMBRE DEL GEN	CÓDIGO	MICOTOXINA PRODUCIDA	CEPA PRODUCTORA	IDENTIFICACIÓN NCBI	% COBERTURA	% IDENTIDAD	ACCESIÓN	
Gen Isoepoxidon deshidrogenasa	IDH	Patulina	LMB-HP14 <i>Talaromyces wortmanii</i>	<i>Talaromyces stipitatus</i> ATCC 10500 factor 3 de inicio de transcripción eucariótica , subunidad gamma, putativo, mRNA	89%	68%	XM_002341913.1	
			LMB - HP19 <i>Penicillium mallochii</i>	NO HUBO AMPLIFICACIÓN				
			LMB - HP33 <i>Penicillium maximae</i>	NO HUBO AMPLIFICACIÓN				
			LMB - HP37 <i>Penicillium mallochii</i>	NO HUBO AMPLIFICACIÓN				
			LMB-HP43 <i>Talaromyces brunneus</i>	<i>Talaromyces stipitatus</i> ATCC 10500 factor 3 de inicio de transcripción eucariótica , subunidad gamma, putativo, mRNA	52%	77%	XM_002341913.1	
			LMB - HU1 <i>Aspergillus amoenus</i>	NO HUBO AMPLIFICACIÓN				
			LMB-HL1 <i>Trichoderma reesei</i>	NO HUBO AMPLIFICACIÓN				
			LMB-HL2 <i>Trichoderma reesei</i>	NO HUBO AMPLIFICACIÓN				

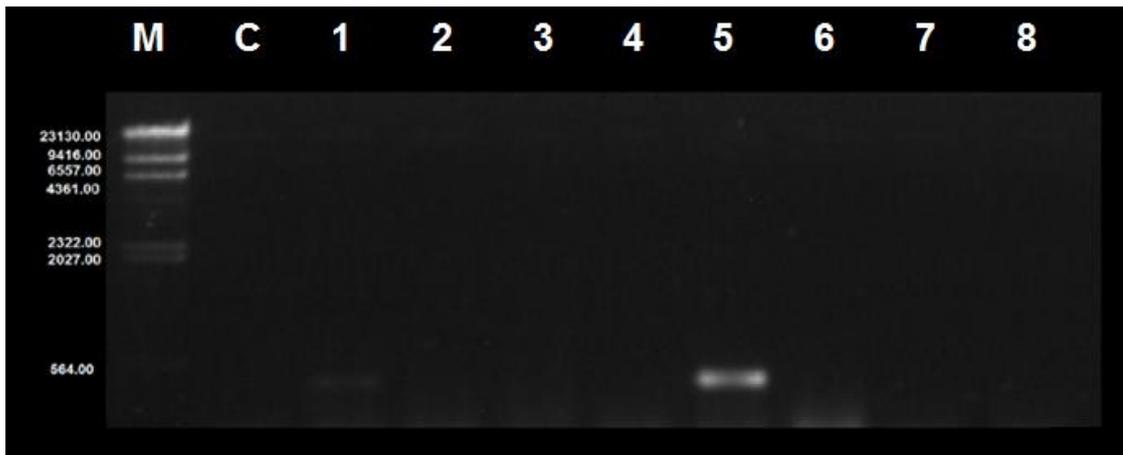


Figura 59: Amplificación del gen IDH de hongos productores de colorantes.

Electroforesis horizontal en gel de agarosa (1%). M: marcador de peso Fago lambda digerido con Hind III. C: Control negativo, 1: gen IDH de LMB-HP14 *Talaromyces wortmannii*, 2: gen IDH de LMB-HP19 *Penicillium mallochii*, 3: gen IDH de LMB-HP33 *Penicillium máxima*, 4: gen IDH de LMB-HP37 *Penicillium mallochii*, 5: gen IDH de LMB-HP43 *Talaromyces brunneus*, 6: gen IDH de LMB-HU1 *Aspergillus amoenus*, 7: gen IDH de LMB-HL1 *Trichoderma ressei*, 8: gen IDH de LMB-HL2 *Trichoderma ressei*.

Se observó que las cepas LMB-HP19, LMB-HP33, LMB-HP37 y LMB-HU1 no amplificaron el gen *idh*, por lo tanto, probablemente no sean productoras de patulina ya que los cebadores IDH han sido probados previamente en varias especies del género *Penicillium* productoras de patulina y, en todos los casos, se observó la amplificación del gen *idh* (Dombrink-Kurtzman 2007). De igual manera, Puel *et al.* (2010) reportaron cepas del género *Aspergillus* y *Penicillium* productoras de patulina que contenían dicho gen *idh* y, en aquellas que carecían de dicho gen, no producían la micotoxina en mención. Sin embargo, es necesario corroborar estos resultados utilizando una cepa que sea productora de esta toxina.

Se evidencia también la no amplificación del gen *idh* por la cepa LMB-HL1 *Trichoderma ressei*, lo cual era de esperarse debido a que no se ha reportado producción de patulina para especies del género *Trichoderma*. Además, se observa que sólo las cepas LMB-HP14 *Talaromyces wortmannii* y LMB-HP43 *Talaromyces brunneus* amplificaron dicho gen. Los resultados del secuenciamiento de las amplificaciones correspondieron a un gen que no está involucrado en la biosíntesis de patulina. Adicionalmente, se aprecia que el porcentaje de cobertura e identidad fueron

menores a 90% para ambos casos, por lo cual no se puede concluir que las cepas son productoras de patulina y que los cebadores IDH pueden alinearse a otros genes.

La ocratoxina A (OTA), es una micotoxina producida por especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, por ello fue necesario evaluar la presencia de genes de biosíntesis de ocratoxina en las cepas productoras de colorantes.

En la figura 59, se observa que las cepas seleccionadas amplificaron para el par de cebadores degenerados *KAOTAF/R*, sin embargo, no se logró identificar las secuencias provenientes de las amplificaciones de las cepas LMB-HP14 y LMB-HP43, ambas del género *Talaromyces* (tabla 25), posiblemente debido a que fueron productos de amplificaciones inespecíficos.

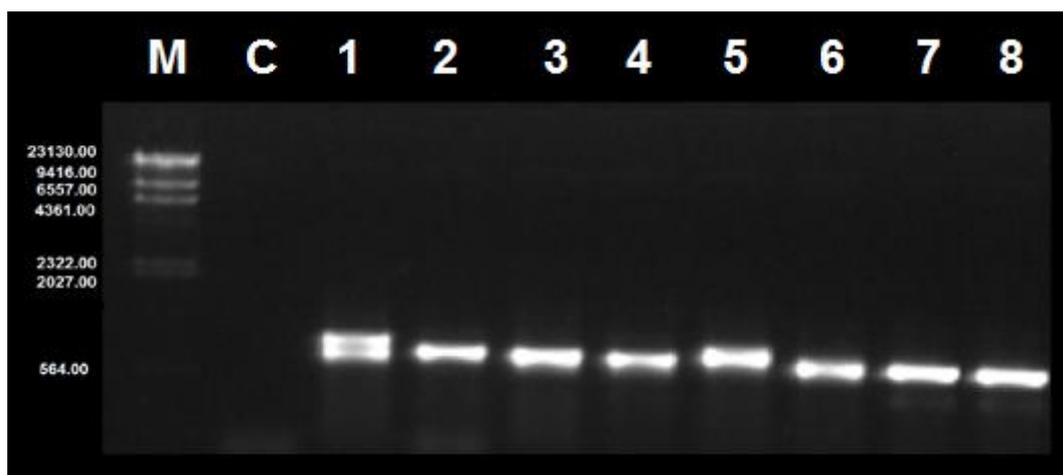


Figura 60: Amplificación del gen KAOTA de hongos productores de colorantes.

Electroforesis horizontal en gel de agarosa (1%). M: marcador de peso Fago lambda digerido con Hind III, C: Control negativo, 1: gen KAOTA de LMB-HP14 *Talaromyces wortmanni*, 2: gen KAOTA de LMB-HP19 *Penicillium mallochii*, 3: gen KAOTA de LMB-HP33 *Penicillium maximae*, 4: gen KAOTA de LMB-HP37 *Penicillium mallochii*, 5: gen KAOTA de LMB-HP43 *Talaromyces brunneus*, 6: gen KAOTA de LMB-HU1 *Aspergillus amoenus*, 7: gen KAOTA de LMB-HL1 *Trichoderma reesei*, 8: gen KAOTA de LMB-HL2 *Trichoderma reesei*.

En el resto de cepas donde sí se obtuvieron resultados de identificación, las cepas LMB-HP14, LMB-HL19 y LMB-HU1 correspondieron a genes posiblemente involucrados en la síntesis de policétidos con porcentajes de cobertura e identidad bajos (menores de 80%)

e inespecíficos. En el caso de la cepa LMB-HP37, se obtuvieron porcentajes de cobertura e identificación cercanos a 100%, sin embargo, el gen amplificado correspondía a una proteína involucrada en la síntesis de lípidos. Para las cepas LMB-HL1 y LMB-HL2, las amplificaciones correspondieron a un gen que codifica una proteína provisional no identificada.

De igual manera, en el caso del par de cebadores *KAF/R*, se observó amplificaciones de la mayoría de las cepas, sin embargo sólo las cepas LMB-HL1 y LMB-HL2, identificadas como *Trichoderma reesei*, no amplificaron (tabla 26). Además, no se lograron identificar las secuencias provenientes de las amplificaciones de las cepas LMB-HP33, LMB-HP43, ya que los resultados del secuenciamiento no fueron óptimos para su análisis. Adicionalmente, los resultados para las cepas LMB-HP14, LMB-HP19, LMB-HP33 y LMB-HU1 fueron inespecíficos, ya que sus porcentajes de cobertura y similaridad fueron menores al 80% (tabla 26).

Estos resultados hacen suponer que las cepas seleccionadas poseen genes de biosíntesis de policétidos. Si bien las cepas corresponden a diferentes géneros (*Talaromyces*, *Penicillium*, *Aspergillus* y *Trichoderma*), todas amplificaron con los mismos cebadores, lo cual se puede deber a que los genes de biosíntesis de policétidos han sido expuesto a complejos mecanismos evolutivos (Gallo *et al.* 2013). Sin embargo, no se puede concluir que los genes amplificados participan en la biosíntesis de ocratoxina.

Tabla 25: Resultados del secuenciamiento de las amplificaciones de genes de biosíntesis de ocratoxina A utilizando cebadores KAOTA

NOMBRE DEL GEN	CÓDIGO	MICOTOXINA PRODUCIDA	CEPA PRODUCTORA	IDENTIFICACIÓN NCBI	% COBERTURA	% IDENTIDAD	ACCESIÓN
Fragmentos del gen Policétido sintasa	KAOTAF/R	Ocratoxina A	LMB-HP14 <i>Talaromyces wortmannii</i>	NO HUBO IDENTIFICACIÓN			
			LMB - HP19 <i>Penicillium mallochii</i>	<i>Metarhizium sp.</i> BCC2566 clon Met3R1-1 gen policétido sintasa, cds parcial	50%	70%	KF536104.1
				<i>Penicillium marneffeii</i> cepa PM1 gen policétido synthase PKS17 putativo, cds completo	18%	73%	HM070061.1
			LMB - HP33 <i>Penicillium maximae</i>	<i>Togninia minima</i> UCRPA7 proteína putativa policétido sintasa mRNA	55%	71%	XM_007914546.1
				<i>Neurospora crassa</i> OR74A policétido sintasa 3 (pks-3), mRNA	35%	73%	XM_954029.2
			LMB - HP37 <i>Penicillium mallochii</i>	<i>Penicillium sp.</i> x12-94-2 gen cetoacil sintasa, secuencia parcial	100%	99%	HQ234248.1
				<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293 policétido sintasa (AFUA_1G17740), mRNA parcial	82%	99%	XM_748048.2
			LMB-HP43 <i>Talaromyces brunneus</i>	NO HUBO IDENTIFICACIÓN			
			LMB-HU1 <i>Aspergillus amoenus</i>	<i>Fusarium sp.</i> NRRL 52700 policétido sintasa (Fsp5_01733) mRNA putativo, complete cds	40%	70%	KU180122.1
				<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357 polyketide synthase, putative, mRNA	19%	77%	XM_002381455.1
			LMB-HL1 <i>Trichoderma reesei</i>	<i>Trichoderma reesei</i> QM6a proteína predicha (TRIREDRAFT_73618), mRNA parcial	100%	98%	XM_006961499.1
				<i>Colletotrichum graminicola</i> M1.001 proteína con dominio beta-cetoacil sintasa, mRNA parcial	71%	72%	XM_008099952.1
			LMB-HL2 <i>Trichoderma reesei</i>	<i>Trichoderma reesei</i> QM6a proteína predicha (TRIREDRAFT_73618), mRNA parcial	100%	97%	XM_006961499.1
				<i>Colletotrichum graminicola</i> M1.001 proteína con dominio beta-cetoacil sintasa, mRNA parcial	71%	73%	XM_008099952.1

Tabla 26: Resultados del secuenciamiento de las amplificaciones de genes de biosíntesis de ocratoxina A utilizando cebadores KAF/R

NOMBRE DEL GEN	CÓDIGO	MICOTOXINA PRODUCIDA	CEPA PRODUCTORA	IDENTIFICACIÓN NCBI	% COBERTURA	% IDENTIDAD	ACCESIÓN	
Fragmentos del gen policétido sintasa	KAF1/KAR2	Ocratoxina A	LMB-HP14 <i>Talaromyces wortmannii</i>	<i>Fusarium sp.</i> NRRL 25184 policétido sintasa (Fsp2_3500) mRNA putativo, cds completo	22%	76%	KU180111.1	
				<i>Penicillium chrysogenum</i> Wisconsin 54-1255 proteína hipotética (Pc14g00080) mRNA, cds completo	18%	79%	XM_002559957.1	
			LMB - HP19 <i>Penicillium mallochii</i>	<i>Humicola fuscoatra</i> cepa ZE0228 gen policétido sintasa, cds parcial	89%	73%	GQ204173.1	
				<i>Aspergillus tubingensis</i> cepa ITEM 4496 gen policétido sintasa (pks4), cds parcial	73%	70%	HM011521.1	
			LMB - HP33 <i>Penicillium maximae</i>	<i>Humicola fuscoatra</i> cepa ZE0228 gen policétido sintasa, cds parcial	68%	73%	GQ204173.1	
				<i>Penicillium marneffeii</i> ATCC 18224 policétido sintasa, putativo mRNA	61%	68%	XM_002149793.1	
			LMB-HP37 <i>Penicillium mallochii</i>	NO HUBO IDENTIFICACIÓN				
			LMB-HP43 <i>Talaromyces brunneus</i>	NO HUBO IDENTIFICACIÓN				
			LMB-HU1 <i>Aspergillus amoenus</i>	<i>Aspergillus terreus</i> NIH2624 proteína hipotética (ATEG_07659) mRNA parcial	53%	70%	XM_001216280.1	
				<i>Fusarium proliferatum</i> cepa NRRL 62905 policétido sintasa (Fpr_08840) mRNA putativo, cds completo	21%	80%	KU180046.1	
			LMB - HL1 <i>Trichoderma reesei</i>	NO HUBO AMPLIFICACIÓN				
			LMB - HL2 <i>Trichoderma reesei</i>	NO HUBO AMPLIFICACIÓN				

V. CONCLUSIONES

1. Mediante la bioprospección microbiana, se seleccionaron 8 cepas de hongos provenientes de la amazonía peruana productoras de colorantes naturales: LMB-HP14, LMB-HP19, LMB-HP33, LMB-HP37, LMB-HP43, LMB-HU1, LMB-HL1 y LMB-HL2, las cuales pueden producir colorantes por fermentación sumergida, en un medio de producción de bajo costo y fácil preparación (Caldo papa dextrosa).
2. Las cepas seleccionadas fueron identificadas molecularmente como LMB-HP14 *Talaromyces wortmannii*, LMB-HP19 *Penicillium mallochii*, LMB-HP33 *Penicillium maximae*, LMB-HP37 *Penicillium mallochii*, LMB-HP43 *Talaromyces brunneus*, LMB-HU1 *Aspergillus amoenus*, LMB-HL1 *Trichoderma ressei* y LMB-HL2 *Trichoderma ressei*.
3. Según los resultados obtenidos por espectroscopia UV/Visible y FT-IR, los colorantes producidos por las cepas LMB-HP33 *Penicillium maximae*, LMB-HP37 *Penicillium mallochii*, LMB-HU1 *Aspergillus amoenus*, LMB-HL1 *Trichoderma ressei* y LMB-HL2 *Trichoderma ressei* han sido caracterizadas inicialmente como Quinonas. No se pudo identificar inicialmente los colorantes producidos por las cepas LMB-HP14 *Talaromyces wortmannii*, LMB-HP19 *Penicillium mallochii* y LMB-HP43 *Talaromyces brunneus*, mediante dichas técnicas analíticas.
4. Se realizó el análisis molecular para verificar la presencia de genes de biosíntesis de micotoxinas en las cepas productoras de colorantes, y así descartar aquellas cepas potencialmente micotoxigénicas. Según los resultados obtenidos, la cepa LMB-HU1 *Aspergillus amoenus* no posee 4 genes involucrados en la biosíntesis de aflatoxina.

En el caso de patulina, no se pudo descartar la ausencia del gen *idh* en las cepas LMB-HP19 *Penicillium mallochii*, LMB-HP 33 *Penicillium maximae*, LMB-HP37 *Penicillium mallochii* y LMB-HU1 *Aspergillus amoenus*, ya que, a pesar de no haber amplificación, no se tuvo un control positivo productor de patulina para validar dichos resultados. En el caso de las cepas LMB-HP14 *Talaromyces wortmannii* y LMB-HP43 *Talaromyces brunneus*, sí hubo amplificación pero los resultados del secuenciamiento no corresponden a productos del gen *idh*, por lo tanto probablemente tampoco sean productoras de patulina. En el caso del uso de cebadores degenerados (*KAOTAF/R*, *KAF/R*) para verificar la presencia de genes de biosíntesis de ocratoxina A, se evidenció amplificación para todas las cepas. Sin embargo, luego de secuenciar los amplicones, los resultados demostraron que efectivamente estos corresponden a posibles genes de biosíntesis de policétidos en general, y no exclusivamente a los relacionados a la biosíntesis de ocratoxina A, por lo cual no se pudo verificar si las 8 cepas productoras de colorantes producen ocratoxina A.

VI. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda evaluar las condiciones óptimas de producción de colorantes de la cepa LMB-HU1 *Aspergillus amoenus*, dado que se pudo descartar la presencia de genes de biosíntesis de aflatoxina además que el título de colorante producido por esta cepa fue uno de los más altos (1.71 g/L).
2. Es recomendable evaluar la estabilidad de colorantes producidos, a diferentes condiciones de pH, temperatura y concentración de sales, de tal manera que se pueda brindar mayor información acerca de sus posibles usos en procesos industriales.
3. Se recomienda evaluar el efecto de la concentración de nutrientes y sales minerales de los medios de cultivo, en la producción de metabolitos tales como colorantes y micotoxinas y, de esta manera, poder definir las concentraciones a las cuales la producción de colorante sea máxima y la de micotoxinas, mínima, en los casos necesarios.
4. En el caso de la cepa LMB-HL2, se sugiere complementar su identificación con otros cebadores de identificación tales como TEF1 (factor 1-alfa de elongación de la traducción), ech42 (endoquitinasa), RPB1b (subunidad larga de polimerasa ribosomal 11) y ACT (actina) ya que, en el presente trabajo, el porcentaje de cobertura en su identificación molecular fue de 75%.
5. Es necesario identificar los colorantes producidos por las cepas seleccionadas por métodos analíticos tales como Espectrometría de masas o Resonancia magnética nuclear. De esta manera, se sabrá con certeza la estructura química de dichos colorantes y sus posibles aplicaciones industriales.

6. Adicionalmente, se debe evaluar analíticamente (HPLC-MS) los metabolitos producidos por las especies seleccionadas para descartar la presencia de micotoxinas y, además, verificar la producción de otros metabolitos de interés.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel – Hadil, A.; Carter, D.; Magan, N. 2010. Discrimination between aflatoxigenic and non-aflatoxigenic *Aspergillus* section *Flavi* strains from Egyptian peanuts using molecular and analytical techniques. *World Mycotoxin Journal*. 4(1): 69 – 77.
- Adav, S.; Tze, L.; Kwan, S. 2012. Quantitative Secretomic Analysis of *Trichoderma reesei* Strains Reveals Enzymatic Composition for Lignocellulosic Biomass Degradation. *Mol Cell Proteomics*. 11(7).
- ADEX (Asociación de exportadores, Perú). 2015. Perú exporta, Boletín semanal N°129. p.3.
- Aishwarya, A. 2014. Extraction of natural dyes from Fungus – an alternate for textile dyeing. *Journal of Natural Sciences Research*. 4(7).
- Akilandeswari, P.; Pradeep, B. 2016. Exploration of industrially important pigments from soil fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100(4):1631-1643.
- Al-Alwani, M; Mohamad, A; Kadhum, A; Ludin, N. 2015. Effect of solvents on the extraction of natural pigments and adsorption onto TiO₂ for dye-sensitized solar cell applications. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 138: 130-137.

- Amnuaykanjanasin, A.; Punya, J.; Paungmoung, P.; Rungrod, A.; Tachaleat, A.; Pongpattanakitsote, S.; Cheevadhanarak, S.; Tanticharoen, M. 2005. Diversity of type I polyketide synthase genes in the wood-decay fungus *Xylaria* sp. BCC 1067. FEMS Microbiology Letters. 251:125–136.
- Asis, A.; Siddiquee, S. 2016. Identification of *Trichoderma* species from Wet paddy field soil samples. Transactions on Science and Technology. 3(1):1–7.
- Babitha, S.; Carvalho, J.; Soccol, C.; Pandey, A. 2008. Effect of light on growth, pigment production and culture morphology of *Monascus purpureus* in solid-state fermentation World J. Microbiol. Biotechnol. 24:2671-2675.
- Baker, R.; Tatum, J. 1998. Novel anthraquinones from stationary cultures of *Fusarium oxysporum*. Journal of fermentation and bioengineering. 85(4):359-361.
- Bara, R.; Alv, A.; Pretsch, A.; Wray, V.; Wang, B.; Proksch, P.; Debbab, A. 2013. Antibiotically active metabolites from *Talaromyces wortmannii*, an endophyte of *Aloe vera*. The Journal of Antibiotics. 66:491–493.
- Bennett, J.; Chang, P.; Bhatnagar, D. 1997. One gene to whole pathway: The role of norsolorinic acid in aflatoxin research. Adv. Appl. Microbiol. 45:1-15.
- Bick, I.; Rhee, C. 1966. Anthraquinone pigments from *Phoma foveata* Foister. Biochem. J. 98: 112–116.
- Bingle, L.; Simpson, T.; Lazarus, C. 1999. Ketosynthase domain probes identify two subclasses of fungal polyketide synthase genes. Fungal Genet. Biol. 26:209–223.
- Blanc, P.J.; Loret, M.O.; Goma, G. 1995. Production of citrinin by various species of *Monascus*. Biotech. Lett. 17(3):291-294.

- Breen, J.; Dacre, J.; Raistrick, H. 1955. Studies in biochemistry of micro-organisms. 95. Rugulosin, a crystalline colouring matter of *Penicillium rugulosum* Thom. Biochemical Journal. 60:618-626.
- Canizares, V.; Ríos, E.; Olvera, R.; Ponce, N.; Marquez, R. 1998. Microbial sources of pigments. Rev. Latinoam. Microbiol. 40:87-107.
- Caro, Y.; Anamale, L.; Fouillaud, M.; Laurent, P.; Petit, T.; Dufossé, L. 2012. Natural hydroxyanthraquinoid pigments as potent food grade colorants: an overview. Nat Prod Bioprospect. 2:174–193.
- Celestino, J.; Carvalho, L.; Lima, M.; Lima, A.; Ogosku, M.; De Souza, J. 2014. Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential for pigment production. Process Biochemistry. 49:569–575
- Cerrón, L.; Romero-Suárez, D.; Vera, N.; Ludeña, Y.; Villena, G.; Gutiérrez-Correa, M. 2015. Decolorization of Textile reactive dyes and Effluents by Biofilms of *Trametes polyzona* LMB-TM5 and *Ceporia* sp. LMB-TM1 isolated from the Peruvian Rainforest. Water air soil pollution. p. 226-235.
- Chen, R.S.; Tsay, J.G.; Huang, Y.F.; Chiou, R.Y. 2002. Polymerase chain reaction mediated characterization of molds belonging to the *Aspergillus flavus* group and detection of *Aspergillus parasiticus* in peanut kernels by a multiplex polymerase chain reaction, J. of Food Protec. 65:840-844.
- Christian, G.D.; Dasgupta, P.; Schug, K. 2013. USA. Analytical Chemistry, 7 ed. Wiley.
- Da Costa, P.; Bim, T.; Beraldo, L.; Abreu, L.; Souza, L.; Santos, C.; Ribeiro, L.; Gomes, P. 2016. Production and chemical characterization of pigments in filamentous fungi. Microbiology. 162:12–22.

- De Medeiros, L.; Da Silva, J.; Abreu, L.; Pfenning, L.; Silva, C.; Thomasi, S.; Venâncio, T.; Van Pée, K.; Nielsen, K.; Rodrigues-Filho, E. 2015. Dichlorinated and brominated rugulovasines, ergot alkaloids produced by *Talaromyces wortmannii*. *Molecules*. 20(9):17627-44.
- Derntl, C.; Rassinger, A.; Srebotnik, E.; Mach, R.; Mach-Aigner, A. 2016. Identification of the main regulator responsible for synthesis of the typical yellow pigment produced by *Trichoderma reesei*. *Appl Environ Microbiol*. 82(20):6247–6257.
- Dombrink-Kurtzman, M. 2007. The sequence of the isoeipoxydon dehydrogenase gene of the patulin biosynthetic pathway in *Penicillium* species. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 91:179–189.
- Dona, A.; Kyriakides, M.; Scott, F.; Shephard, E.; Varshavi, D.; Veselkov, K.; Everett, J. 2016. A guide to the identification of metabolites in NMR-based metabonomics/metabolomics experiments. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 14:135–153.
- Dufossé, L. 2006. Microbial production of Food grade pigments. *Food Technol. Biotechnol*. 44(3):313-321.
- Falcone, M.; Rius, S.; Casati, P. 2012. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Front Plant Sci*. 3: 222.
- Farber, P.; Geisen, R.; Holzapfel, W. 1997. Detection of aflatoxinogenic fungi in figs by a PCR reaction. *International Journal of Food Microbiology*. 36: 215-220.
- Fedeshko, R.W. 1992. Polyketide enzymes and genes in *Penicillium urticae*. Ph.D. Dissertation. Calgary, University of Calgary.

- Gallo, A.; Ferrara, M.; Perrone, G. 2013. Phylogenetic study of polyketide synthases and non ribosomal peptide synthetases involved in the biosynthesis of Mycotoxins. *Toxins*. 5:717-742.
- Gams, W.; Bissett, J. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: *Trichoderma and Gliocladium*, Vol. 1, Basic biology, taxonomy, and genetics. Kubicek, C.P. and Harman, G.E. London. Taylor and Francis. 134 p.
- Gao, J.; Yang, S.; Qin, J. 2013. Azaphilones: chemistry and biology. *Chem Rev*. 113: 4755–4811.
- Gareis, M.; Wolff, J. 2000. Relevance of mycotoxin contaminated feed for farming animals and carry over of mycotoxins in food of animal origin. *Mycoses*. 43:79 - 83.
- Geisen, R. 1996. Multiplex polymerase chain reaction for the detection of potential aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi. *System. Appl. Microbiol*. 19:388-392.
- Geweely, N.S. 2011. Investigation of the optimum condition and antimicrobial activities of pigments from four potent pigment producing fungal species. *J Life Sci*. 5:697–711.
- Giusti, M.; Wrolstad, R. 2001. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry* F1.2.1-F 1.2.13.
- Glass, L.; Donaldson, G. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. *Applied and environmental microbiology*. 61:1323–1330.

- Grey, M.; Brendel, M. 1992. Rapid and simple isolation of DNA from agarose. *Current Genetic*. 22:83-84
- Gutiérrez-Correa, M. 2009. El Valor de los genes. *Revistablos*. Vol 2, N°3.
- Hadi, A.A.; Carter, D.; Magan, N. 2011. Discrimination between aflatoxigenic and non aflatoxigenic *Aspergillus* section *Flavi* strains from Egyptian peanuts using molecular and analytical techniques. *World Mycology Journal*. 4:69-77.
- Harborne, J.; Mabry, T.; Mabry, H. 1975. The flavonoids. New York, San Francisco, Chapman and Hall, London: Acad. Press, Inc.
- Harvey, D. 2000. *Modern Analytical Chemistry*. USA. McGraw-Hill Companies. 705 p.
- Hong, S.; Cho, H.; Shin, H.; Frisvad, J.; Samson, R. 2006. Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56:477–486.
- Huang, H.; Feng, X.; Xiao, Z.; Liu, L.; Li, H.; Ma, L.; Lu, Y.; Ju, J.; She, Z.; Lin, Y. 2011. Azaphilones and p-Terphenyls from the Mangrove endophytic fungus *Penicillium chermesinum* (ZH4-E2) isolated from the South China Sea. *Journal of natural products*. 74:997–1002.
- Hubka, V.; Peterson, S.; Frisvad, J.; Yaguchi, T.; Kubačová, A.; Kolarčík, M. 2013. *Aspergillus waksmanii* sp. nov. and *Aspergillus marvanovae* sp. nov., two closely related species in section *Fumigati*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 63:783-789.

- Hussain, A.; Afzal, A.; Irfan, M.; Malik, K. 2015. Molecular detection of Aflatoxin producing strains of *Aspergillus flavus* from peanut (*Arachis hypogaea*). Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology. 3(5):335-341.
- Joshi, V.; Attri, D.; Bala, A.; Bhushan, S. 2003. Microbial Pigments. Indian J Biotechnol. 2: 362–369.
- Jurjevic, Z.; Peterson, S.; Horn, B. 2012. *Aspergillus* section *Versicolores*: nine new species and multilocus DNA sequence based phylogeny. IMA Fungus. 3(1):59-79.
- Kato, H.; Nakahara, T.; Sugimoto, K.; Matsuo, K.; Kagiya, I.; Frisvad, J.; Sherman, D.; Williams, R.; Tsukamoto, S. 2015. Isolation of Notoamide S and Enantiomeric 6- epi -Stephacidin A from the Fungus *Aspergillus amoenus*: Biogenetic Implications. Organic letters. 17 (3).
- Keller, N.P.; Turner, G.; Bennett, J.W. 2005. Fungal secondary metabolism, from biochemistry to genomics. Nature reviews, Microbiology. 3: 937-947.
- Larsen, T.O.; Svendsen, A.; Smedsgaard, J. 2001. Biochemical characterization of Ochratoxin A-producing strains of the genus *Penicillium*. Applied and Environmental Microbiology. 67: 3630-3635.
- Lebeau, J.; Venkatachalam, M.; Fouillaud, M.; Petit, T.; Vinale, F.; Dufossé, L.; Caro, Y. 2017. Production and new extraction method of polyketide red pigments produced by Ascomycetous fungi from terrestrial and marine habitats. Journal of Fungi. 3(34).
- Lin, Y.; Whan, T.; Lee, M.; Su, N. 2008. Biologically active components and nutraceuticals in the *Monascus*-fermented rice: a review. Appl. Microbiol. Biotechnolog. 77:965-973.

- Liu, G.Y.; Nizet, V. 2009. Color me bad: Microbial pigments as virulence factors. *Trends in Microbiology*. 17:406-413.
- Lopes, F.C.; Tichota, D.M.; Pereira, J.Q.; Segalin, J.; Rios Ade, O.; Brandelli, A. 2013. Pigment production by filamentous fungi on agro-industrial byproducts: an eco-friendly alternative. *Appl Biochem Biotechnol*. 171(3): 616-25.
- Macy, R. 1943. *Organic Chemistry Simplified*. New York. Chemical Publishing Company Inc. 431 p.
- Mahmoud, A.; Ghaly, A.; Brooks, S. 2007. Influence of Temperature and pH on the Stability and Colorimetric Measurement of Textile Dyes. *American Journal of Biotechnology and Biochemistry*. 3(1):33-41.
- Maleki, H.; Mashinchian, O. 2011. Characterization of *Streptomyces* isolates with UV, FTIR spectroscopy and HPLC analyse. *BioImpacts*. 1(1): 47-52.
- Manojlović, I.; Bogdanović-Dusanović, G.; Gritsanapan, W.; Manojlović, N. 2006. Isolation and identification of anthraquinones of *Caloplaca cerina* and *Cassia tora*. *Chemical Papers*. 60: 466.
- Mani, V.; Soundari, A.; Damodharan, K.; Preethi, K. 2015. Bioprospecting endophytic fungi and their metabolites from medicinal tree *Aegle marmelos* in Western Ghats, India. *Mycobiology*. 43(3):303-310.
- Mapari, S.; Meyer, A.; Thrane, U.; Frisvad, J. 2009. Identification of potentially safe promising fungal cell factories for the production of polyketide natural food colorants using chemotaxonomic rationale. *Microbial Cell Factories*. 8:24.

- Mapari, S.; Nielsen, K.; Larsen, O.; Frisvad, J.; Meyer, A.; Thrane, U. 2005. Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. *Current opinion in Biotechnology*. 16: 231-238.
- Mapari, S.; Thrane, U.; Meyer, A. 2010. Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants? *Trends Biotechnol.* 28: 300–307
- Martín, J.; García-Estrada, C.; Zeilinger, S. 2014. *Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites*. New York. Springer.
- Mathias-Rettig, K.; Ah-Hen, K. 2014. Color in food as a measurable quality criterion. *Agro Sur*. 42(2).
- Mayer, S.; Färber, P.; Geisen, R. 2003. Monitoring the production of aflatoxin B1 in wheat by measuring the concentration of *nor-1* mRNA. *Appl. and Environ. Microbiol.* 69:1154-1158.
- Minto, R.E.; Townsend, CA. 1997. Enzymology and molecular biology of aflatoxin biosynthesis. *Chem. Rev.* 97: 2537-2552
- Mistry, B.D. 2009. *A Handbook of Spectroscopic Data*. Japur, India. Oxford Book company. 242 p.
- Mittermeier, R.; Mittermeier, C.; Brooks, T. 2003. Wilderness and biodiversity conservation. *PNAS* 100: 10309–10313.
- Moss, M. 2002. Mycotoxin review -1. *Aspergillus* and *Penicillium*. *Mycologist*.16:3.

- Muedas, G. 2013. Estudio químico y de actividad antioxidante de la *Bauhinia guianensis* var. *kuntiana* Aubl. Tesis Mag. Química. PUCP. 154 p.
- Mukherjee, G.; Singh, S. 2011. Purification and characterization of a new red pigment from *Monascus purpureus* in submerged fermentation. *Process Biochem.* 46: 188–192.
- Nagia, F.; EL-Mohamedy, R. 2007. Dyeing of wool with natural anthraquinone dyes from *Fusarium oxysporium*. *Dyes pigments.* 75:550-555.
- Oancea, S.; Stoia, M. 2008. Mycotoxins: a review of toxicology, analytical methods and health risks. *Food Technology.* v. XII. supl. 1.
- O'Callaghan, J.; Caddick, M.; Dobson, A. 2003. A polyketide synthase gene required for ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. *Microbiology.* 149: 3485-91.
- Okuda, T.; Klich, M.A.; Seifert, K.A. 2000. Media and incubation effect on morphological characteristics of *Penicillium* and *Aspergillus*. In: *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification* (Samson RA, Pitt JJ, eds). Amsterdam Harwood Academic Publishers. p. 83–99.
- Osman, M.Y.; Sharaf, I.A.; Osman, H.; El- Khouly, Z.A.; Ahmed, E.I. 2004. Synthetic organic food colouring agents and their degraded products: Effects on human and rat cholinesterases. *British Journal of Biomedical Science.* 61:128-132.
- Parekh, S.; Vinci, V.A.; Strobel, R.J. 2000. Improvement of microbial strains and fermentation processes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 54:287-301.

- Pervez, M.; Musaddiq, M.; Thakare, P.; Kumar, A. 2015. Characterization of Bioactive compound isolated from *Myrothecium spp.* with UV, FTIR and HPLC Analysis. Indian J. Pharm. Biol. Res. 3(1):1-5.
- Pintea, A.M. 2008. Food colorants derived from natural sources by processing. Food colorants chemical and functional properties. 329-343.
- Pitt, J.I. 2000. Toxigenic fungi: which are important? Medical Mycology. 38:17–22.
- Prieto, R.; Yousibova, G.; Woloshuk, C. 1996. Identification of aflatoxin biosynthetic genes by genetic complementation in an *Aspergillus flavus* mutant lacking the aflatoxin gene cluster. Appl. Environ. Microbiol. 62:3567-3571.
- Puel, O.; Galtier, P.; Oswald, I. 2010. Biosynthesis and toxicological effects of Patulin. Toxins. 2(4):613-631.
- Rai, H.; Battacharyya, M.S.; Singh, J.; Bansal, T.K.; Vats, P.; Banerjee, U.C. 2005. Removal of dyes from the effluent of textile and dyestuff manufacturing industry - A review of emerging techniques with reference to biological treatment. Critical Reviews in Environment Science and Technology. 35, 219-238.
- Rashid, M.; Khalil, S.; Ayub, N. 2008. Categorization of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* isolates of stored wheat grains in to aflatoxinogenics and non-aflatoxinogenics. Pak. J. Bot. 40(5):2177-2192.
- Rivera, K.; Seifert, A. 2011. A taxonomic and phylogenetic revision of the *Penicillium sclerotiorum* complex. Mycotaxon. 119:315-328.

- Rodriguez-Couto, S. 2013. Treatment of Textile Wastewater by White-rot Fungi: Still a Far Away Reality? Textiles and Light Industrial Science and Technology (TLIST). 2(3).
- Sahu, R.; Saxena, J. 2014. Ultraviolet-Visible and Fourier transform infrared spectroscopic studies on non-conventional species of Curcuma. Indian Journal of Advances in Chemical Science. 2(4):300-302.
- Samson, R.; Visagie, C.; Houbraeken, J.; Hong, S.; Hubka, V.; Klaassen, C.; Perrone, G.; Seifert, K.; Susca, A.; Tanney, J.; Varga, J.; Kocsube, S.; Szigeti, G.; Yaguchi, T.; Frisvad, J. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. Studies in Micology. 78:141-173.
- Sardaryan, E. 2002. Strain of the microorganism *Penicillium oxalicum* var. *armeniaca* and its application. Patent US 6340586. B1: 418.
- Schoch, C.; Seifert, K.; Huhndorf, S.; Robert, V.; Spouge, J.; Levesque, C.; When, C.; Fungal Barcoding Consortium. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. 2012. PNAS. 109(16):6241-6246.
- Schuster, A.; Schmoll, M. 2010. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. Appl microbiol biotechnol. 87(3):787–799.
- Seo, S.; Sankawa, U.; Ogihara, Y. 1973. Studies on fungal metabolites – XXXII. A renewed investigation on (-)-flavoskyrin and its analogues. Tetrahedron. 3721-3726.
- Seshadri, S.; Bishop, P.; Agha, A. 1994. Anaerobic/ aerobic treatment of selected azo dyes in wastewater. Waste management. 14(2): 127–137.

- Sharma, D.; Gupta, C.; Aggarwal, S.; Nagpal, N. 2012. Pigment extraction from fungus for textile dyeing. *Indian J. of Fibre &Textil Research*. 37:68-73.
- Shibata, S.; Ikekawa, T. 1963. Metabolic products of fungi. XX. The biosynthesis of rugulosin. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 11:368-371.
- Sivakumar, V.; Lakshmi, A.; Vijayeeswaree, J.; Swaminathan, G. 2009. Ultrasound assisted enhancement in natural dye extraction from beetroot for industrial applications and natural dyeing of leather. *Ultrasonics Sonochemistry*. 16:782-789.
- Smetanina, O.; Kalinovskii, A.; Khudyakova, Y.; Slinkina, N.; Pivkin, M.; Kuznetsova, T. 2007. Metabolites from the marine fungus *Eurotium repens*. *Chem. Nat. Compd*. 43:395–398.
- Storari, M.; Pertot, I.; Gessler, C.; Broggin, G. 2010. Amplification of polyketide synthase gene fragments in ochratoxigenic and nonochratoxigenic black *Aspergilli* in grapevine. *Phytopathol. Mediterr*. 49:393–405.
- Strobel, G.; Daisy, B. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbial Mole Biol Rev*. 67(4):491-502.
- Sweeney, M.; Dobson, A. 1999. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*. 175:49-163.
- Tanaka, C.; Tsuda, M.; Miyagawa, H.; Kuwahara, Y. 2002. Accumulation of anthraquinones in the reddish brown-colored polyoxin-resistant mutants of *Cochliobolus heterostrophus*. *Mycoscience*. 43(4):317-320.
- Tang, T.; Yin, L.; Yang, J.; Shan G. 2007. Emodin, an anthraquinone derivative from *Rheum officinale* Baill, enhances cutaneous wound healing in rats. *567(3):177-85*.

- Teixeira, M.; Martins, M.; Da Silva, J.; Kirsch, L.; Fernandes, O.; Carneiro, A.; De Conti, R.; Durán, N. 2012. Amazonian biodiversity: pigments from *Aspergillus* and *Penicillium* characterizations, antibacterial activities and their toxicities. *Curr Trends Biotechnol Pharmacol*. 6:300–311.
- Thermo scientific. 2008-2009. Knowledge base: Infrared spectral interpretation.
- Ueno, Y.; Sato, N.; Ito, T.; Ueno, I.; Enomoto, M.; Tsunoda, H. 1980. Chronic toxicity and hepatocarcinogenicity of (+) rugulosin, an anthraquinoid mycotoxin from penicillium species: preliminary surveys in mice. *J Toxicol Sci*. 5(4):295-302.
- Van den Broek, P.; Pittet, A.; Hajjaj, H. 2001. Aflatoxin genes and aflatoxigenic potential of Koji moulds. *Appl. Microbial. Biotechnol*. 57:192-199.
- Vega, K.; Sarmiento, V.; Ludeña, Y.; Vera, N.; Tamariz, G.; Gutiérrez-Correa, M. 2015. Alkaline cellulase production by *Penicillium mallochii* LMB-HP37 isolated from soils of a peruvian rainforest. *British Biotechnology Journal*. 7(4): 160-168.
- Vega, K.; Villena, G.; Sarmiento, V.; Ludeña, Y.; Vera, N.; Gutiérrez-Correa, M. 2012. Production of alkaline cellulase by fungi isolated from an undisturbed rain forest of Peru. *Biotechnology Research International*.
- Velmurugan, P.; Kamala-Kannan, S.; Balachandar, V.; Lakshmanaperumalsamy, P.; Chae, J.; Oh, B. 2009. Natural pigment extraction from five filamentous fungi for industrial applications and dyeing of leather. *Carbohydrate Polymers*. 79(2):262-268.
- Visagie, C.; Houbraken, J.; Frisvad, J.; Hong, S.; Klaassen, C.; Perrone, G.; Seifer, K.; Varga, J.; Yaguchi, T.; Samson, R. 2014. Identification and nomenclature of genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*. 78:343–371.

- Wesenberg, D. 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances*. 22(1-2):161–187.
- White, T.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Part Three. p. 315-322
- Wild, D.; Tóth, G.; Humpf, H. 2003. New *Monascus* metabolites metabolites with a pyridine structure in red fermented rice. *Journal Agriculture Food chemistry*. 59:5493-5496.
- Woloshuk, C.; Prieto, R. 1998. Genetic organization and function of the aflatoxin B1 biosynthetic genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 160:169-176.
- Woo, P.; Lam, C.; Tam, E.; Lee, K.; Yung, K.; Leung, C.; Sze, K.; Lau, S.; Yuen, K.; 2014. The biosynthetic pathway for a thousand-year-old natural food colorant and citrinin in *Penicillium marneffeii*. *Sci Rep.* 4: 6728.
- Yilmaz, N.; Houbraken, J.; Hoekstra, E.; Frisvad, J.; Visagie, C.; Samson, R. 2012. Delimitation and characterisation of *Talaromyces purpurogenus* and related species. *Persoonia*. 29:39–54.

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Imágenes de las cepas aisladas a partir de basidiocarpo no productoras de colorantes.

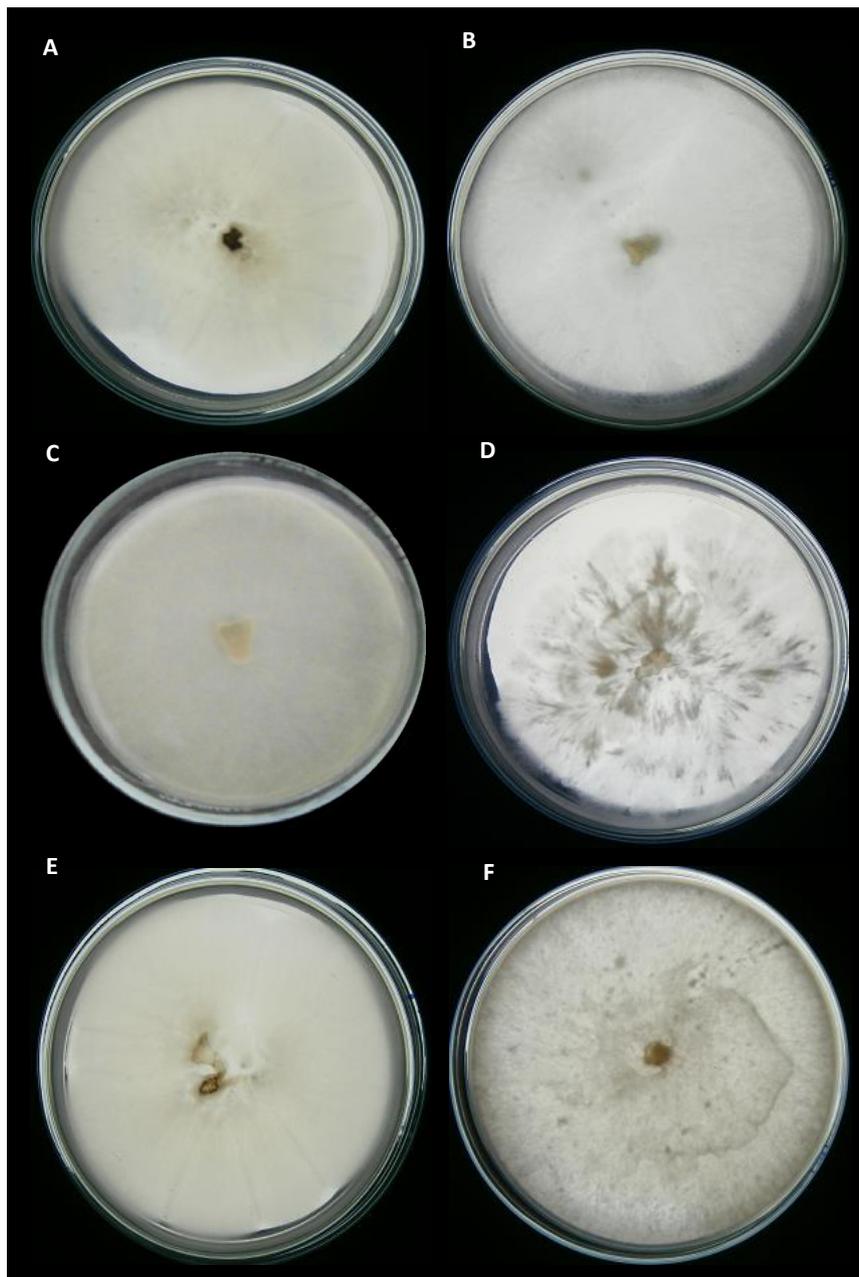


Figura 61: Cepas aisladas de crecimiento *in vitro* no productoras de colorantes.

A: LMB-HL3, B: LMB-HL4, C: LMB-HL5, D: LMB-HL6, E: LMB-HL7, F: LMB-HL8.