

Rev. Cienc. Tecnol.

Año 15 / N° 19 / 2013 / 18–23

## Evaluación en laboratorio de un sistema sumergido de producción de Endo-1,4- $\beta$ -Glucanasa secretada por dos cepas de hongos de pudrición blanca

### Laboratory evaluation of a submerged system production of endo-1.4- $\beta$ -glucanase secreted for two strains of white rot fungi

Ernesto M. Giorgio, Andrea Morales, Gabriela Congost, María I.

Fonseca, Carlos Abate, Pedro D. Zapata, Laura L. Villalba

#### Resumen

La celulosa es el componente principal de la pared celular y es de gran importancia biotecnológica analizar nuevos microorganismos que produzcan celulasas. El objetivo de este trabajo fue diseñar y ensayar a nivel laboratorio un sistema de producción sumergido que utiliza chips de pino como sustrato para la producción de endo-1,4- $\beta$ -glucanasa secretada por dos hongos de pudrición blanca, *Irpex sp.* y *Phlebia sp.* y verificar el pH y T óptimos de acción de los extractos enzimáticos.

El sistema de producción propuesto en este trabajo mostró un comportamiento logarítmico respecto de la producción enzimática con un máximo de actividad de 1 U/L.h para *Irpex sp.* y 1,37 U/L.h para *Phlebia sp.* La actividad se mantuvo constante con el tiempo a través de lavados y agregado de medio fresco, simulando un sistema de producción fed-batch. Los extractos de ambas cepas mostraron una mejor performance a 50°C, con una mayor actividad a pH 3 para los extractos de la cepa de *Irpex sp.* y a pH 4,5 para la cepa de *Phlebia sp.* Este sistema podría ser óptimo para iniciar los experimentos de escalado.

Palabras clave: Hongos de pudrición blanca, sistema de sustrato sumergido, endo-1,4- $\beta$ -glucanasa.

#### Abstract

Cellulose is the main component of the cell wall with great biotechnological importance regarding the analysis of new cellulase producers microorganisms. The objective of this study was the design and testing of a submerged production system of endo- $\beta$ -1.4-glucanase using pine chips as substrate; pH and T optimum action of the enzyme extracts by two white rot fungi *Irpex sp.* and *Phlebia sp.* were checked at laboratory scale.

The production system proposed in this study showed a logarithmic behaviour with respect to enzyme production with maximum activity of 1 U / Lh for *Irpex sp.* strain and 1.37 U / Lh for *Phlebia sp.* strain. Enzymatic activity remained constant over time through washing and adding fresh medium, simulating a fed-batch production system. Extracts of both strains showed better performance at 50°C, with higher activity at pH 3 for extracts of *Irpex sp.* strain and pH 4.5 for *Phlebia sp.* strain. This system may be optimal to start scaling up studies.

Key words: White Rot Fungi, submerged fermentation system, endo-1.4- $\beta$ -glucanase.

#### Introducción

La celulosa es el componente de la pared celular de las plantas más abundante y uno de los compuestos orgánicos más comunes en la biosfera (1; 2). Representa cerca del 50% del peso seco de la madera y posee un importante uso tecnológico (3; 4). Se trata de una fuente de carbono renovable que permite su aprovechamiento energético, químico y alimenticio (5). Sin embargo, de similar importancia biotecnológica son los microorganismos que la degradan y especialmente las enzimas involucradas en esta acción: las celulasas (6; 7). Estas enzimas poseen diversas aplicaciones biotecnológicas entre las que se encuentra la

obtención de bioetanol, sin embargo su utilización está limitada por su disponibilidad comercial, siendo frecuentemente de alto costo para el bioproceso (8).

Las celulasas están constituidas por un conjunto de 3 tipos de enzimas cuya función es hidrolizar los enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos y generar glucosa libre de manera cooperativa (9). Las endoglucanasas (E.C. 3.2.1.4), hidrolizan los enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos internos, las celobiohidrolasas (E.C. 3.2.1.91), actúan sobre los enlaces ubicados en ambos extremos, y las  $\beta$ -glucosidasas (E.C. 3.2.1.21), hidrolizan las celobiosas a monómeros de glucosa (6).

La optimización de bioprocesos que utilicen este tipo de enzimas es innovador, pero requiere de una elevada

inversión en la compra de insumos. Sin embargo, si la producción de enzimas se lleva a cabo *in situ* y con sustratos regionales, su costo se reduce significativamente. Resulta interesante entonces potenciar la búsqueda de nuevos microorganismos con capacidad celulolítica y sistemas alternativos para la eficiente producción de celulasas para un aprovechamiento biotecnológico (2). Teniendo en cuenta datos previos del grupo de trabajo sobre la capacidad lignocelulolítica de algunos hongos de pudrición nativos (10-14), y considerando que los sistemas que utilicen la biomasa lignocelulósica podrían ser utilizados para la producción de enzimas logrando un menor costo operativo. Por esta razón, el objetivo de este trabajo fue diseñar y ensayar a nivel laboratorio un sistema de producción sumergido que utilice chips de pino como sustrato para la producción de endo-1,4- $\beta$ -glucanasa a partir de dos cepas de hongos de pudrición blanca pertenecientes a los géneros *Irpex* sp. y *Phlebia* sp. Simultáneamente se analizó el pH y T óptimos de acción de los extractos enzimáticos procedentes de estas cepas.

## Materiales y métodos

### Cepas fúngicas

Las cepas fúngicas fueron cedidas por la Colección de Cultivos del Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Buenos Aires, Argentina. Las cepas originales fueron mantenidas en placas de Petri conteniendo agar-extracto de malta (agar 20 g/L, extracto de malta 12,7 g/L, pH 5,5) previamente al desarrollo de los experimentos.

### Medios de cultivo utilizados

Los medios utilizados en este trabajo fueron: agar-extracto de malta (agar 20 g/L, extracto de malta 12,7 g/L, pH 5,5) utilizado para cultivos sólidos; medio mínimo Czapek pH 5,73 suplementado con peptona 2 g/L y glucosa 15 g/L utilizado para inóculos primarios del sistema sumergido; medio mínimo Czapek pH 5,73 utilizado para la obtención de enzimas; y extracto de malta suplementado con 0,1 g/L de CMC para estudiar el efecto de pH y T.

### Preparación del sistema de producción sumergido y obtención de enzimas

El inóculo primario se preparó sobre medio mínimo Czapek pH 5,73 suplementado con peptona 2 g/L y glucosa 15 g/L como fuente de carbono y se incubó a 29 °C. Transcurridos 8 días este inóculo primario fue colocado en erlenmeyers conteniendo 23 g de chips de *Pinus taeda* esterilizados en autoclave a 1 atm y 121°C durante 15

min. Los sistemas inoculados fueron mantenidos a 29 °C por 10 días para permitir el desarrollo del micelio. Una vez logrado el desarrollo de los micelios, los cultivos fueron lavados con buffer acetato de sodio 0,05 M pH 4,8. Posteriormente se generó el sistema sumergido mediante el agregado de medio mínimo Czapek pH 5,73 hasta cubrir la superficie de los chips (3,7 mL/g de sustrato). El sistema se incubó a 29 °C para permitir la generación de enzimas, recolectándose una alícuota de medio condicionado (medio que estuvo en contacto con el hongo) entre 3 y 174 h para verificar el momento en el que el sistema alcanzaba una producción constante de enzima, considerándose esta situación como sistema estabilizado. Este medio condicionado fue tomado como fuente en enzimas y en el mismo se cuantificaron las actividades enzimáticas.

Al cabo de las 174 h el sistema fue lavado con buffer acetato de sodio 0,05 M pH 4,8 y se agregó nuevamente la misma cantidad de medio inicial al sistema, procediéndose a recolectar el medio condicionado al cabo de 4 días. Este procedimiento se repitió 5 veces y en todas las alícuotas de medio condicionado se determinó la actividad endo-1,4- $\beta$ -glucanasa.

### Determinación de actividad enzimática

La actividad endo-1,4- $\beta$ -glucanasa (E.C. 3.2.1.4) se determinó de manera indirecta a través de la liberación de azúcares reductores por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) anteriormente descrito por Miller, 1959 (15). La reacción se llevó a cabo a 50 °C durante 60 min en buffer acetato de sodio 0,05 M pH 4,8 conteniendo 1% de CMC. La absorbancia del sustrato coloreado se determinó a 560 nm en un espectrofotómetro UV-Vis 3600 de Shimadzu.

### Influencia de la temperatura y el pH en la actividad enzimática

Para determinar el comportamiento de los extractos enzimáticos a diferentes condiciones de temperatura y pH se utilizaron extractos enzimáticos obtenidos luego de 14 días de cultivo a 29 °C en medio líquido, conteniendo extracto de malta suplementado con CMC. La actividad endo-1,4- $\beta$ -glucanasa se determinó a valores de pH comprendidos entre 3 y 6, y a valores de temperatura comprendidos entre 30 °C y 60 °C, como se describió anteriormente. Para ajustar el pH al cual se determinó la actividad enzimática se utilizó buffer acetato de sodio 0,05 M.

### Análisis estadístico

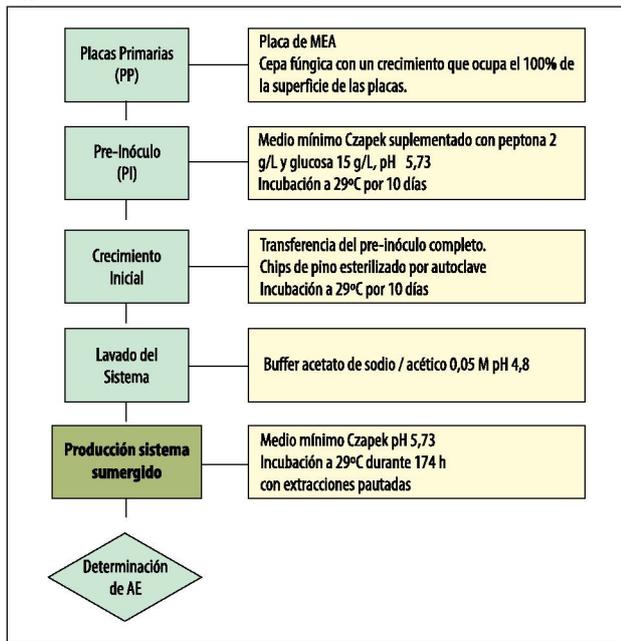
Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de dos factores realizado a través del programa *GraphPad-Prism 5 for Windows*. Las curvas de regresión logarítmica fueron realizadas mediante hoja de cálculo.

**Resultados**

En este trabajo se diseñó y ensayó a nivel laboratorio un sistema de producción sumergido, conteniendo chips de pino (*Pinus taeda*) como sustrato en medio mínimo Czapek. Este sistema fue ensayado con dos hongos de pudrición blanca: *Irpex* sp. y *Phlebia* sp.

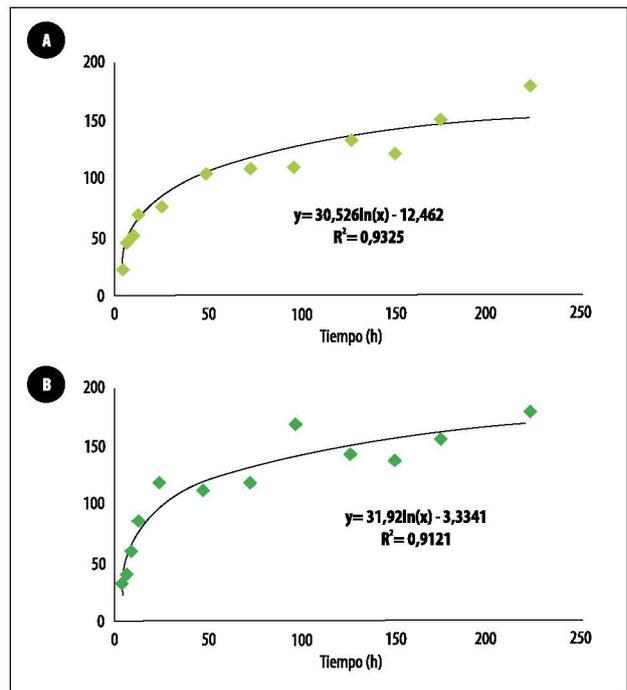
El sistema consistió en un inóculo primario, crecido sobre medio mínimo suplementado con glucosa y peptona, destinado a lograr que los hongos alcancen la fase exponencial de crecimiento. Posteriormente el micelio en fase exponencial fue inoculado sobre los chips e incubado durante 10 días hasta alcanzar un desarrollo significativo sobre la superficie de los mismos. Al finalizar ese período, el sistema se lavó para eliminar los restos de glucosa, potencial inhibidor de la producción de celulasas, y se sumergió en medio mínimo sobre el cual se cuantificó la actividad enzimática endo-1,4-β-glucanasa en intervalos de tiempo preestablecidos. (Figura 1)

Figura 1: Esquema del sistema de producción enzimática utilizado.



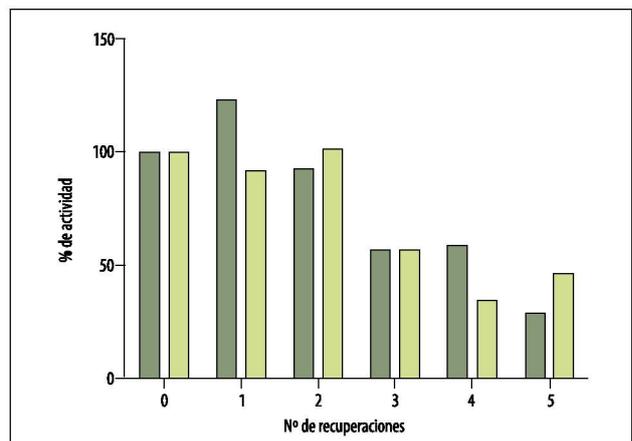
La actividad endo-1,4-β-glucanasa se midió durante 174 h a intervalos de 3 h detectándose comportamientos claramente logarítmicos con un máximo de actividad entre las 96 h y 144 h para ambas cepas (1 U/L.h para *Irpex* sp. y 1,37 U/L.h para *Phlebia* sp.). (Figura 2).

Figura 2: Cinética de la producción enzimática en el sistema sumergido. A) *Irpex* sp. B) *Phlebia* sp.



Para analizar la posibilidad de reutilizar el sistema con el hongo ya crecido sobre la superficie de los chips, de manera análoga a un sistema de producción *fed-batch*, se eliminó todo el medio del sistema, se procedió a su lavado con solución tamponada y se agregó medio mínimo fresco (recuperación del sistema). La actividad enzimática fue cuantificada luego de la estabilización del sistema, realizándose este procedimiento 5 veces consecutivas. En ambos casos se evidenció que la actividad enzimática permaneció con niveles similares al original (sistema inicial) durante las primeras 2 recuperaciones (1,5 U/L.h para *Irpex* sp. y 1,3 U/L.h para *Phlebia* sp.), sin observarse diferencias significativas con el valor inicial ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, el uso del sistema a partir de la 3<sup>er</sup> recuperación generó una disminución del rendimiento en más de un 50%. (Figura 3)

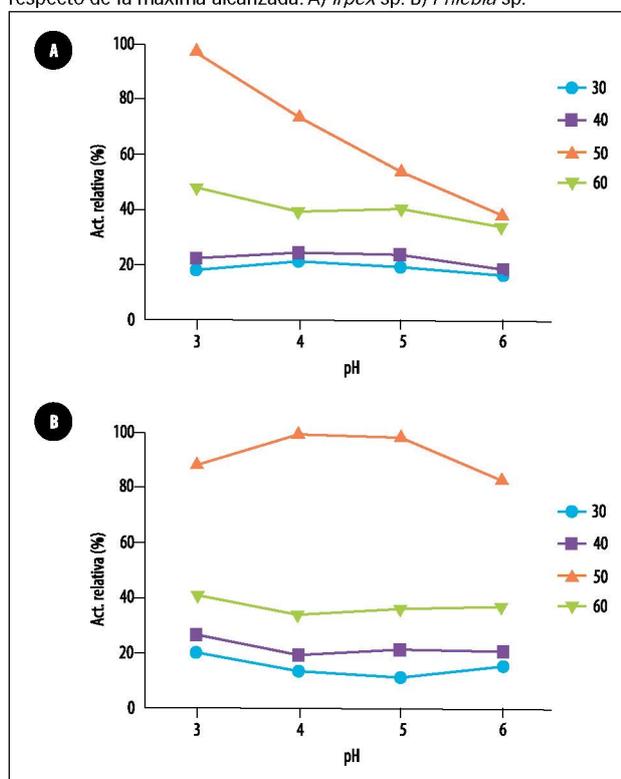
Figura 3: Valores de actividad enzimática alcanzados luego de la recuperación del sistema expresados en % de actividad respecto del valor inicial. En negro *Irpex* sp. y en gris *Phlebia* sp.



Con la finalidad de evaluar la influencia del pH y la T en la actividad enzimática de los extractos producidos por ambas cepas, se analizó su comportamiento frente a diferentes condiciones de temperatura (entre 30 °C y 60 °C) y pH (entre 3 y 6). (Figura 4)

Los extractos enzimáticos de ambas cepas mostraron una mejor performance a 50 °C, siendo su actividad significativamente superior a las observadas con otras temperaturas ( $p < 0.001$ ). Al comparar las actividades enzimáticas a cada pH se observó que la cepa de *Irpex* sp. mostró niveles de actividad endo-1,4- $\beta$ -glucanasa significativamente superiores a pH 3 ( $p < 0.001$ ), mientras que para los extractos de la cepa de *Phlebia* sp., los mayores niveles de actividad se encontraron a pH 4 y 5 ( $p < 0.001$ ).

Figura 4: Comportamiento de los extractos enzimáticos ante diferentes condiciones de pH y T expresados en % de actividad residual respecto de la máxima alcanzada. A) *Irpex* sp. B) *Phlebia* sp.



## Discusión

Si bien la producción y secreción de enzimas hidrolíticas por muchas especies de hongos es un hecho conocido, las celulasas son producidas a nivel comercial por un número reducido de empresas, lo que repercute en su precio. Es de importancia económica la utilización de nuevas cepas que produzcan celulasas para ser aplicadas en la bioconversión de la biomasa celulósica con fines energéticos a un menor costo. En este sentido, los hongos de pudrición y sus enzimas constituyen una alternativa interesante por su gran diversidad y por que pueden desarrollarse usando sustratos lignocelulósicos alternativos más económicos. En este trabajo se estudió un sistema de producción sumergido a nivel laboratorio para dos cepas,

una con actividad óptima a pH 3 y niveles más altos de actividad endo-1,4- $\beta$ -glucanasa (*Irpex* sp.) y otra con niveles intermedios de actividad endo-1,4- $\beta$ -glucanasa y pH óptimo entre 4 y 5 (*Phlebia* sp.). Existen varias alternativas de producción, variables en su eficiencia según el hongo y la cepa utilizada. El sistema propuesto en este caso es similar al anteriormente descrito por Jayant y col., en el 2011 (18), aunque nuestro sistema propone el crecimiento inicial del inóculo hasta alcanzar el desarrollo del micelio sobre la superficie del sustrato (chips de madera) y alcanzar niveles estables de enzimas. Este tiempo es de 4 a 6 días mostrando un comportamiento logarítmico. Estos resultados son similares a los descritos por otros autores para sistemas fúngicos de bioconversión de biomasa lignocelulósica en etanol (19; 20) y para *Bacillus licheniformis* por Mashhadi-Karim y col. (21), pero en este último caso se da en un tiempo mayor. Además, nuestros datos indican que este modelo puede servir para la generación de un sistema de producción *fed-batch*, ya que los niveles enzimáticos se mantienen dentro del rango esperado (1,5 U/L.h para *Irpex* sp. y 1,3 U/L.h para *Phlebia* sp.) luego de la recuperación y agregado de medio de cultivo fresco al sistema.

En cuanto a los valores enzimáticos alcanzados, datos previos de la literatura indican niveles de actividad enzimática muy variados, entre los que se encuentran 156 U/L para *Chaetomium crispatum* (16) y 564 U/L para *Trichoderma* sp. cepa IS-05 (17). En este sentido, si bien es difícil comparar los valores observados de la literatura para diferentes basidiomicetes, dada la diversidad de técnicas y unidades utilizadas, los valores encontrados en este trabajo para las cepas analizadas son aceptables ya que están comprendidos dentro de este rango.

Todos los datos indican que este sistema podría ser adecuado para la producción, aunque deben estudiarse las condiciones de escalado y verificarse otros factores que afecten a la expresión enzimática.

Por otro lado, se analizó el pH y la T óptimos para la acción de estas enzimas. Estos valores están relacionados estrechamente con la resistencia del equipo de fermentación al pH, siendo en este caso más conveniente el trabajo a pH superiores a 4. En relación al pH óptimo, se presentaron dos situaciones diferentes para ambas cepas: los extractos de *Irpex* sp. mostraron un comportamiento más eficiente de actividad endoglucanasa a pH cercanos a 3, mientras que los extractos de *Phlebia* sp. se mostraron mayor actividad a pH entre 4 y 5. Como segundo aspecto, referido al tipo de sustrato que se utiliza, debemos destacar que en los procesos referidos a la producción de bioetanol es necesaria la aplicación de un pretratamiento ácido que condiciona el pH con el que inicia el proceso siguiente, la hidrólisis de la celulosa; para estos casos serán más eficientes los sistemas enzimáticos que pueden actuar a pH bajos. Estos resultados concuerdan con los registrados para otras cepas fúngicas (22; 23), con la ventaja de observarse una adecuada respuesta de estas cepas ante sistemas con

sustratos no comerciales como los chips de madera.

En conclusión, el sistema de producción propuesto en este trabajo mostró un comportamiento logarítmico respecto de la producción enzimática y fue factible su mantenimiento en el tiempo a través de lavados y agregado de medio fresco, simulando un sistema de producción *fed-batch*. Este sistema podría ser óptimo para iniciar los experimentos de escalado.

#### Agradecimientos

Parte de este trabajo fue financiado por la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Misiones a través de un subsidio para proyectos innovadores. E.M. Giorgio y M.I. Fonseca poseen becas Doctorales otorgadas por el CONICET, Argentina.

#### Bibliografía

- Hong, J.; Tamaki, H.; Akiba, S.; Yamamoto, K. y Kumaga, H., Cloning of a gene encoding a highly stable endo- $\beta$ -1,4-glucanase from *Aspergillus niger* and its expression in Yeast, *J. Biosci. Bioeng.* 92:p 434-441. 2001.
- Howard, R.L.; Abotsi, E.; Jansen van Rensburg, E.L. y Howard, S., Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production, *Af. J. Biotechnol.* 2:p 602-619. 2003.
- Coral, G.; Arıkan, B.; Unaldi, M.N. y Guvenmes, H., Some properties of crude carboxymethyl cellulase of *Aspergillus niger* Z10 wild-type strain, *Turk J. Biol.* 26:p 209-213. 2002.
- Malherbe, S. y Cloete, T.E., Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications: A review, *Environ. Sci. Biotechnol.* 1:p 105-114. 2003.
- Murai, T.; Ueda, M.; Kawaguchi, T.; Arai, M. y Tanaka, A., Assimilation of cellooligosaccharides by a cell surface-engineered yeast expressing beta-glucosidase and carboxymethyl cellulase from *Aspergillus aculeatus*, *Appl. Environ. Microbiol.* 64:p 4857-4861. 1998.
- Beguın, P., Molecular biology of cellulose degradation, *Annu. Rev. Microbiol.* 44:p 219-248. 1990.
- Martínez, A.T.; Speranza, M.; Ruiz-Dueñas, F.J.; Ferreira, P.; Camarero, S.; Guillén, F.; Martínez, M.J.; Gutiérrez, A. y del Río, J.C., Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin, *Int. Microbiol.* 8:p 195-204. 2005.
- Wood, B.E. y Ingram, L.O., Ethanol production from cellobiose, amorphous cellulose, and crystalline cellulose by recombinant *Klebsiella oxytoca* containing chromosomally integrated *Zymomonas mobilis* genes for ethanol production and plasmids expressing thermostable cellulase genes from *Clostridium thermocellum*, *Appl. Environ. Microbiol.* 58:p 2103-2110. 1992.
- Akiba, S.; Kimura, Y.; Yamamoto, K. y Kumagai H., Purification and characterization of a protease-resistant cellulase from *Aspergillus niger*, *J. Ferment. Bioeng.* 79:p 125-130. 1995. *Bioresour Technol.* 112:p 137-142. 2012.
- Giorgio, E.M.; Villalba, L.L. y Zapata, P.D. Determinación de la actividad endo- $\beta$ -1,4-glucanasa de *Trametes villosa* y *Ganoderma applanatum* en sustrato lignocelulolítico. *Lilloa 45* (Suplemento XXXVIII Congreso Argentino de Genética, Tucumán):p 116, 2009.
- Giorgio, E.M.; Fonseca, M.I.; Zalazar, C.; Coniglio, R.; Abate, C.; Villalba, L. y Zapata, P.D. Efecto combinado de la temperatura, pH y tiempo de incubación sobre la producción de endoglucanasas en el hongo de pudrición blanca *Coriolus versicolor* var. *antarcticus*. *Rev. Arg. Microbiol.* 42 (Supl. 1): p 70, 2010.
- Mesa, L.; Bofill, Y.; Herrera, M.; Zapata, P.; Villalba, L.; González, E. y Castro, E. Producción de crudos enzimáticos con actividad celulolítica a partir de basidiomicetos para su uso en la producción de etanol celulósico. XII Congreso Argentino de Micología. Libro de Resúmenes pp 440, 2011.
- Giorgio, E.M.; Fonseca, M.I.; Coniglio, R.O.; Zapata, P.D. y Villalba, L.L. Producción y secreción de lacasas y endoglucanasas en cultivo líquido conteniendo chips como sustrato lignocelulolítico. XII Congreso Argentino de Micología. Libro de Resúmenes pp 240, 2011.
- Levin, L.; Villalba, L.; Da Re, V.; Forchiasini, F. y L. Papinutti, L. Comparative studies of loblolly pine biodegradation and enzyme production by Argentinean white rot fungi focused on biopulping processes. *Proc. Biochem.* 42:p 995-1002, 2007.
- Miller, G.L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars, *Anal. Chem.* 31:p 426-8. 1959.
- Mitra, S.; Banerjee, P.; Gachhui, R. y Mukherjee, J., Cellulase and xylanase activity in relation to biofilm formation by two intertidal filamentous fungi in a novel polymethylmethacrylate conico-cylindrical flask, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 34:p1087-101. 2011
- Andrade, J.P.; Bispo, A.S.; Marbach, P.A. y do Nascimento, R.P., Production and partial characterization of cellulases from *Trichoderma* sp. IS-05 isolated from sandy coastal plains of Northeast Brazil, *Enzyme Res.* ID 167248. 2011
- Jayant, M.; Rashmi, J.; Shailendra, M. y Deepesh, Y., Production of cellulase by different co-culture of *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysogenum* from waste paper, cotton waste and baggase, *J. Yeast & Fungal Res.* 2:p 19-23. 2011.
- Hwang, S.S.; Lee, S.J.; Kim, H.K.; Ka, J.O.; Kim, K.J. y Song, H.G., Biodegradation and saccharification of wood chips of *Pinus strobus* and *Liriodendron tulipifera* by white rot fungi, *J. Microbiol. Biotechnol.* 18:p 1819-1826. 2008.
- Kamei, I.; Hirota, Y.; Mori, T.; Hirai, H.; Meguro, S. y Kondo, R., Direct ethanol production from cellulosic materials by the hypersaline-tolerant white-rot fungus *Phlebia* sp.

- MG-60,
21. Mashhadi-Karim, M.; Azin, M. y Gargari, S.L., Production of alkaline protease by entrapped *Bacillus licheniformis* cells in repeated batch process, *J. Microbiol. Biotechnol.* 21:p 1250-1256. 2011.
  22. Shin, K.; Kim, Y.H.; Jeya, M.; Lee, J.K. y Kim, Y.S., Purification and characterization of a thermostable cellobiohydrolase from *Fomitopsis pinicola*, *J. Microbiol. Biotechnol.* 20: p 1681-1688. 2010.
  23. Lahjouji, K.; Storms, R.; Xiao, Z.; Joung, K.B.; Zheng, Y.; Powlowski, J.; Tsang, A. y Varin, L., Biochemical and molecular characterization of a cellobiohydrolase from *Trametes versicolor*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75: p337-346. 2007.

Recibido: 16/06/2012

Aprobado: 10/08/2012

- Ernesto Martín Giorgio<sup>1</sup>

Licenciado en Genética y Profesor de Biología por la Universidad Nacional de Misiones, Auxiliar de Primera en la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales (UNaM), dictando materias de grado. Es Becario del CONICET y miembro del Laboratorio de Biotecnología Molecular (FCEQyN - UNaM). Dirige auxiliares y becarios de grado. Posee publicaciones en revistas indexadas nacionales e internacionales y presentaciones a congresos nacionales e internacionales. biotecmol2010@gmail.com

- Andrea Morales<sup>1</sup>

Alumna de Lic. en Genética en la Universidad Nacional de Misiones. Auxiliar técnico del Laboratorio de Biotecnología Molecular (FCEQyN - UNaM).

- Gabriela Congost<sup>1</sup>

Alumna de Bioquímica en la Universidad Nacional de Misiones, auxiliar técnico del Laboratorio de Biotecnología Molecular (FCEQyN - UNaM).

- María Isabel Fonseca<sup>1</sup>

Licenciada en Genética por la Universidad Nacional de Misiones. Auxiliar de Primera en la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales (UNaM), dictando materias de grado. Es Becaria del CONICET y miembro del Laboratorio de Bio-

tecnología Molecular (FCEQyN - UNaM). Dirige auxiliares y becarios de grado. Posee publicaciones en revistas indexadas nacionales e internacionales y presentaciones a congresos nacionales e internacionales.

- Carlos Abate<sup>2</sup>

Bioquímico, Doctor por la Universidad de Tucumán, Profesor Regular Titular en la Facultad de Bioquímica y Farmacia (UNT), dictando materias de grado y posgrado. Investigador de PROIMI-CONICET (Tucumán). Se desempeña como Director y Co-Director de proyectos Incentivados y Subsidiados. Dirige auxiliares, becarios de grado y posgrado. Posee publicaciones en revistas indexadas nacionales e internacionales y presentaciones a congresos nacionales e internacionales.

- Pedro Darío Zapata<sup>1</sup>

Bioquímico, Doctor por la Universidad de Alcalá de Henares, Profesor Regular Adjunto en la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales (UNaM), dictando materias de grado y posgrado. Secretario de Extensión y Vinculación Tecnológica de la FCEQyN - UNaM. Director del Laboratorio de Biotecnología Molecular (FCEQyN - UNaM). Se desempeña como Director y Co-Director de proyectos Incentivados y Subsidiados. Dirige auxiliares, becarios de grado y posgrado. Posee publicaciones en revistas indexadas nacionales e internacionales y presentaciones a congresos nacionales e internacionales.

- Laura L. Villalba<sup>1</sup>

Ingeniero Química, Doctora por la State University of New York, College of Environmental Science and Forestry. Profesora Regular Adjunto en la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales (UNaM), dictando materias de grado y posgrado. Es Secretaria de Investigación y Posgrado de la FCEQyN - UNaM. Es Co-Director del Laboratorio de Biotecnología Molecular (FCEQyN - UNaM). Se desempeña como Directora y Co-Directora de proyectos Incentivados y Subsidiados. Dirige auxiliares, becarios de grado y posgrado. Posee publicaciones en revistas indexadas nacionales e internacionales y presentaciones a congresos nacionales e internacionales.

1. Laboratorio de Biotecnología Molecular. Módulo de Bioquímica y Farmacia. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales - UNaM. Posadas, Misiones. Argentina.
2. PROIMI/CONICET. San Miguel de Tucumán, Tucumán. Argentina.