



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE INGENIERÍA EN TECNOLOGÍA DE LA
MADERA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DE LA MADERA

TESIS

**“ESCRUTINIO DE HONGOS CON ACTIVIDAD
ENZIMÁTICA ÓXIDO-REDUCTORA”**

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DE LA MADERA

PRESENTA

Q.F.B. ROBERTO CASTAÑEDA URIBE

ASESOR

DAVID RAYA GONZÁLEZ

DOCTOR CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

CO-ASESOR

MAURO MANUEL MARTÍNEZ PACHECO

DOCTOR CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL CON ESPECIALIDAD EN BIOQUÍMICA

Morelia, Michoacán Marzo de 2017

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Química de la Madera de la Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera y en Laboratorio de Fisiología Celular del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas (Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo), con la asesoría del Dc. David Raya González y el Dc. Mauro Manuel Martínez Pacheco y con el apoyo recibido por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada.

"MIRA ADÓNDE VAS Y NO OLVIDES DE DÓNDE VIENES"

(Anónimo)



DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico a mis papás, ya que sin ellos no hubiera sido posible realizar este sueño. Gracias a mí mamá Consuelo por guiarme en el camino del bien, darme apoyo incondicional, por ser un ejemplo de vida. A mí papá Filiberto por el apoyo constante, aunque no estamos juntos sé que donde está siempre me apoya y hemos aprendido que las fronteras no dividen sentimientos, los quiero mucho. A mis hermanos Adriana, Rafael y Miguel por apoyarme en todo momento, por dejar transmitir un poco de lo aprendido durante mí carrera. A mis sobrinos Karina, Gabriel, Guadalupe, Kimberly, Alexis, Cintia, Cesar, Mateo y Yazmin, también este logro es para ellos. Gracias.



AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Por haberme dado la vida y salud para realizar este éxito tan especial

A MIS PAPÁS

Por confiar en mí, por su apoyo incondicional en todo momento en mi carrera profesional y en hacer de mí una persona de bien. Es por eso mi mayor agradecimiento a ustedes

A la máxima casa de estudios **UMSNH** por abrirme las puertas a la educación y ser parte de ésta institución como nicolaita

A la Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera, por haberme dado la oportunidad de estudiar el posgrado en Maestría en Ciencias y Tecnología de la Madera y que en conjunto con mis profesores se desarrollaron las habilidades que serán útiles para el bien social

Al DC. David Raya González y DC. Mauro M. Martínez Pacheco, por abrir las puertas de sus laboratorios, darme la oportunidad de realizar esta tesis y sobre todo por confiar en mí. Les agradezco porque no solo son asesores de este trabajo, por formar parte de mi educación y por hacer de mí una mejor persona profesional. Gracias

Al MC. Alberto Flores García por apoyarme en todo lo referente en el laboratorio, tener paciencia y sobre todo, ser más que él técnico del laboratorio, ser mi amigo. Gracias

A la MC. Alejandra Zaragoza Camacho por su apoyo incondicional, por todo el tiempo compartido, por ser muy especial en mi vida y formar parte de este proyecto de vida. Gracias

A mis compañeros del laboratorio. MC. María Eugenia, MC. Rosy, Dulce, Celeste, Enrique (colega), Tania, Karen, Luz, Melissa, por apoyarme en todo momento en el laboratorio. Gracias



ÍNDICE

1 RESUMEN	1
2 ABSTRACT	2
3 INTRODUCCIÓN	3
4 ANTECEDENTES	4
4.1 Material lignocelulósico	4
4.1.1 Celulosa	4
4.1.2 Lignina	5
4.2 Industria de la pulpa y papel	7
4.2.1 Contaminación generada por la industria de la pulpa y papel	7
4.2.2 Agua residual	7
4.3 Hongos	9
4.3.1 Clasificación de hongos	10
4.3.2 Degradación de productos lignocelulósicos por hongos	11
4.4 Aplicación de las enzimas	12
4.4.1 Clasificación de las enzimas	12
4.5 Aplicación de las enzimas en la industria de la pulpa y papel	13
4.5.1 Blanqueo de pulpa para papel	13
4.5.2 Hemicelulasas	14
4.5.3 Xilanasas	15
4.6 Aplicación de las enzimas óxido-reductoras en la deslignificación	15
4.6.1 Lacasas	15
4.6.2 Manganeso Peroxidasa	16
4.6.3 Lignina Peroxidasa	17
4.6.4 Celobiosa Deshidrogenasa	17
5 JUSTIFICACIÓN	19
6 HIPÓTESIS	20
7 OBJETIVO GENERAL	21
7.1 OBJETIVOS PARTICULARES	21
8 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	22
9 MATERIALES Y MÉTODOS	23
9.1 Material biológico	23
9.2 Medios de cultivo	23
9.3 Producción enzimática del grupo M21	24
9.4 Determinación enzimática óxido-reductora del grupo M21	24
9.5 Determinación de Lacasa, Lignina Peroxidasa y Manganeso Peroxidasa	24
9.6 Determinación de Celobiosa Deshidrogenasa (CDH)	25
9.7 Determinación del contenido de proteína	26
9.8 Determinación de la actividad celulolítica	27
9.9 Cuantificación de azúcares reductores con ácido dinitrosalicílico (DNS)	27
9.10 Identificación molecular	28
9.11 Amplificación de fragmentos ITS	29
9.12 Electroforesis en gel de agarosa	30
9.13 Análisis de correspondencia	30
9.14 Análisis estadístico	31



10 DISCUSIÓN	32
11 CONCLUSIÓN	37
12 BIBLIOGRAFÍA	38



INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Modelo de la molécula de celulosa	5
Figura 2	Estructura esquemática del modelo de inter-unidades de lignina en madera blanda	6
Figura 3	Contaminación de agua (A), aire (B) y suelo (C) generada por la industria de la pulpa y papel	8
Figura 4	Imagen ilustrativa de hongos de la División Ascomycota (A) y Basidiomycota (B)	11
Figura 5	Modelo de una reacción de óxido-reducción catalizada por una enzima	13
Figura 6	Curva de calibración de proteína	26
Figura 7	Curva de calibración de dextrosa	28

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Composición del medio mínimo líquido	23
Cuadro 2	Componentes del reactivo DNS	27
Cuadro 3	Reacciones de una amplificación y desnaturalización del ADN	29



1. RESUMEN

En la industria del papel se utilizan diferentes métodos de blanquear la pulpa para sus diversos usos. Estos son el mecánico, semimecánico y químico. El blanqueo de la pulpa química utiliza cloro para una primera fase de eliminación de la lignina, lo cual es una fuente de contaminantes tóxicos. Las enzimas extracelulares producidas por organismos (tales como hongos, bacterias y plantas) podrían ser utilizadas para este fin. La introducción de las enzimas óxido-reductoras en la industria de la pulpa y papel sería de gran interés en el bioblanqueo, lo cual permitiría el uso de nuevas tecnologías, menos costosas y amigables al ecosistema. En nuestro grupo de trabajo se realizó un escrutinio de 126 aislados fúngicos para determinar la actividad óxido-reductora en medio de fermentación sólido, dentro de los cuales destacaron 21 (llamados grupo M21). En el presente trabajo se evalúa al grupo M21 para determinar la actividad enzimática óxido-reductora en medio de fermentación líquido y su posible aplicación en el blanqueo de la pulpa para papel. Los resultados mostraron que los hongos del grupo M21 presentaron actividad enzimática óxido-reductora y una mínima producción de actividad celulolítica, dentro de los que destacan los aislados 6, 13 y 19. Éstos aislados se identificaron por técnicas moleculares. El aislado fúngico 13 presentó mayor actividad enzimática óxido-reductora.

Palabras clave: Óxido-reductora, enzimas, hongos, bioblanqueo, industria de la pulpa y papel.



2. ABSTRACT

In the paper industry different methods of bleaching the pulp are used for their various uses. These are the mechanical, semimechanical and chemical. Bleaching of the chemical pulp uses chlorine for a first phase of lignin removal, which is a source of toxic contaminants. Extracellular enzymes produced by organisms (such as fungi, bacteria and plants) could be used for this purpose. The introduction of oxide-reducing enzymes in the pulp and paper industry would be of great interest in bio-bleaching, which would allow the use of new technologies, less expensive and ecosystem friendly. In our work group, 126 fungal isolates were screened to determine the oxidative-reducing activity in solid fermentation medium, in which 21 (group M21) were highlighted. In the present work the group M21 is evaluated to determine the oxidation-reducing enzymatic activity in liquid fermentation medium and its possible application in the bleaching of pulp for paper. The results showed that the fungi of the M21 group had oxidase-reducing enzymatic activity and a minimal production of cellulolytic activity, among which the isolates 6, 13 and 19 were highlighted. These isolates were identified by molecular techniques. The fungal isolate 13 had higher oxidation-reducing enzyme activity.



3. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las enzimas son utilizadas en la industria como catalizadores económicamente disponibles y amigables al medioambiente. Si bien, la industria enzimática representa un porcentaje bajo en la industria de productos químicos, su rápido crecimiento en la biotecnología hace que el campo de la industria de enzimas se proyecte con un crecimiento ascendente.

La industria del papel utiliza diferentes químicos para blanquear la pulpa en sus diversos usos de producción. Dentro de este tipo de químicos encontramos el Cloro elemental y sus derivados. Actualmente, nuevas alternativas para el tratamiento del blanqueo de pulpa química libre de cloro existen. Una de ellas es aplicar enzimas con capacidad blanqueadora, lo cual permitirá obtener productos menos costosos y amigables al ecosistema. Las enzimas xilanolíticas y ligninolíticas son de principal interés, además de aquellas que tienen como características la producción de H_2O_2 .

Un caso especial de uso biotecnológico lo representan las enzimas extracelulares de óxido-reducción con capacidad para intercambiar uno o dos electrones. Varios organismos producen estas enzimas, dentro de los que destacan los hongos, que son capaces de producirlas para alimentarse del medio donde habitan, por lo cual en este estudio se investigará un grupo de hongos con ésta actividad.

En nuestro grupo de trabajo se realizó un escrutinio de 126 aislados fúngicos en medio de fermentación sólida. Los resultados mostraron que 21 aislados producen actividad óxido-reductora. Debido al fenómeno observado decidimos seguir con la investigación de estos aislados en un medio de fermentación líquido con la finalidad de determinar las enzimas características, en especial de óxido-reducción e identificar el aislado mediante técnicas moleculares. La aplicación del extracto enzimático en el blanqueo de la pulpa y papel sería una aplicación a futuro, rentable y amigable al ecosistema.



4. ANTECEDENTES

4.1 Material lignocelulósico

La biomasa lignocelulósica es la fuente de carbono más abundante en la Tierra. La producción de papel y de otros productos de celulosa es el principal uso no alimentario de la biomasa vegetal (Alvarez, 2015). La mayor parte de la celulosa que utiliza la industria de la pulpa y papel proviene de la madera de coníferas, pero el mercado de la madera de latifoliadas aumentó durante los últimos 25 años. La biomasa vegetal, fuente de materiales renovables terrestres, está constituida mayoritariamente por dos polisacáridos (celulosa y hemicelulosa) y un polímero aromático (lignina). La celulosa es un polímero lineal de unidades de celobiosa (D-glucopiranosil- β -1,4-D-glucopiranososa) y presenta una estructura extremadamente ordenada (a menudo cristalina). Por el contrario, la lignina, el constituyente vegetal más recalcitrante que deriva de tres precursores fenólicos (los alcoholes *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico que dan lugar a las llamadas unidades *p*-hidroxifenilo (H), guayacilo (G) y siringilo (S)) que forman una red tridimensional incluyendo subestructuras unidas por enlaces éter y carbono-carbono (C-C). La hemicelulosa presenta una complejidad intermedia y está constituida por pentosas y hexosas en cadenas con cortas ramificaciones (Yang *et al.*, 2012). Además de estos polímeros, los materiales lignocelulósicos contienen una fracción que se extrae con solventes orgánicos que incluye compuestos extraíbles lipofílicos y polares. Los extraíbles lipofílicos tales como, ácidos grasos y resínicos, alcoholes grasos, alcanos, esteroides libres y conjugados, terpenos y glicéridos presentan diferencias en cuanto a cantidad y composición que depende de las especies vegetales, diferentes partes y edad de los árboles, condiciones de cultivo y otros factores genéticos y medioambientales.

4.1.1 Celulosa

La celulosa (representa un 50 % de la biomasa vegetal) es un homopolímero de cadena lineal formado por moléculas de glucosa que se encuentran unidas por



enlaces 1,4- β -glucosídicos (figura 1). El grado de polimerización dependerá del número de unidades de glucosa por molécula varía desde 1 000 hasta 10 000.

Toda la celulosa existente en la naturaleza procede fundamentalmente de la actividad biosintética llevada a cabo por las algas y las plantas superiores, pero también puede provenir de ciertas bacterias, invertebrados marinos, hongos, mohos mucosos y amebas. La celulosa se genera mediante complejos enzimáticos biosintéticos situados en la cara externa de la membrana celular; las cadenas de glucosa se unen para formar microfibrillas cristalinas (Landa, 2011).

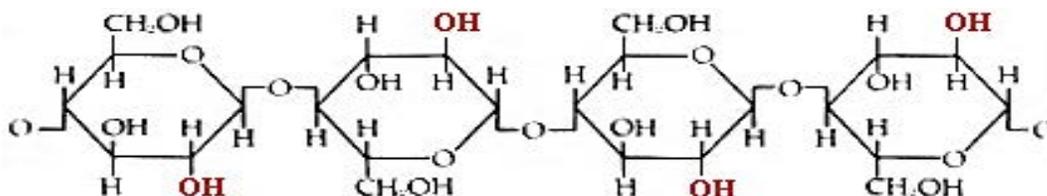


Figura 1. Modelo de la molécula de celulosa. http://www.biologia.edu.ar/plantas/cell_vegetal.htm.

La diversidad de orígenes que puede tener la celulosa, así como de los tratamientos a que son sujetos los materiales ricos en este polímero para su extracción, hacen que se pueda encontrar en un amplio complejo de formas físicas. La descripción de los materiales celulósicos debe incluir aspectos tales como tamaño, forma, porosidad, área superficial, asociación con componentes no celulósicos, conformación molecular y cristalinidad. Estas características son de notable importancia para los procesos de hidrólisis enzimática (Yang *et al.*, 2012).

4.1.2 Lignina

El término lignina deriva del latín "*lignum*", que significa madera y define al material cementante presente en las paredes celulares de los tejidos leñosos de los vegetales. La lignina se produce en gran parte por la actividad fotosintética que convierte al anhídrido carbónico en lignina; ésta puede llegar a constituir aproximadamente el 40 % de la energía solar acumulada en los tejidos vegetales,



por lo que tiene una función destacado en el ciclo del carbono (Lee *et al.*, 2011)

La lignina es el polímero aromático de origen natural más abundante en la naturaleza; representa una de las reservas importantes de carbono orgánico junto con la celulosa y la hemicelulosa. La lignina constituye entre un 15 y un 36 % del contenido de los materiales lignocelulósicos (Kazuchika *et al.*, 2013) (figura 2).

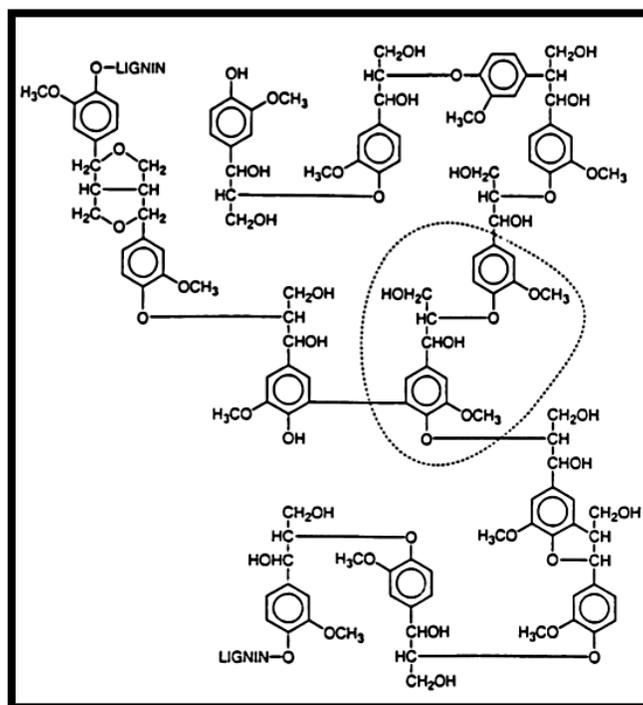


Figura 2. Estructura esquemática del modelo de inter-unidades de lignina en madera blanda

La lignina es un componente aromático heterogéneo a diferencia de la mayoría de los polímeros que constituyen la pared celular vegetal; las unidades fenilpropano que la componen están entrelazadas al azar mediante diferentes enlaces, que forman una macromolécula amorfa e insoluble en agua. La lignina debe su variabilidad principalmente a la presencia de distintas unidades *p*-hidroxifenilo (H), guayacilo (G) y siringilo (S) (Zhang *et al.*, 2015).

La lignina de las gimnospermas está formada principalmente por unidades G (alcohol coniferílico) y algunas unidades de alcohol cumárico (H); en el caso de las



angiospermas está compuesta por igual proporción de unidades G (alcohol coniferílico) y S (alcohol sinapílico) y una menor cantidad de unidades hidroxifenilpropano derivadas del alcohol hidroxifenilpropano que a su vez se deriva del alcohol cumárico (Jafari *et al.*, 2015). La lignina de las gramíneas está formada por una mezcla de tres unidades, unidas por enlaces de tipo éster.

4.2 Industria de la pulpa y papel

4.2.1 Contaminación generada por la industria de la pulpa y papel

La industria de pulpa y papel es considerada como una de las industrias contaminantes del mundo (Sumathi y Hung, 2006). El proceso de producción consiste en dos pasos principales: la fabricación de pulpa y blanqueo. El despulpado es la etapa inicial y la fuente de la mayor parte de contaminantes de esta industria. La decoloración es el último paso del proceso, que pretende blanquear y dar brillo a la pulpa. El blanqueo es un proceso dirigido en varias etapas mediante el cual se refina y aclara la pulpa en bruto. El objetivo es disolver (pulpa química) o modificar (pasta mecánica) la lignina parda que no se eliminó durante los procesos de elaboración de la pulpa, el cual mantiene la integridad de las fibras. Una fábrica produce pulpa por encargo de acuerdo al orden, la concentración y el tiempo de reacción de los agentes blanqueantes. Cambios en el consumo de agua en función del proceso de producción podrían llegar a producir 60 m³/t de papel con las tecnologías más modernas y disponibles, esto con la finalidad de contaminar una menor cantidad de agua (Polishchuk *et al.*, 2015). El agua residual es generada a partir del proceso de producción de ésta industria que incluyen una elevada concentración de productos químicos tales como hidróxido de sodio, carbonato de sodio, sulfuro de sodio, bisulfitos, cloro elemental o de dióxido de cloro, óxido de calcio, ácido clorhídrico, etc. (Sumathi y Hung, 2006).

4.2.2 Agua residual

En la fabricación de pulpa se utilizan varios procesos con demandas diferentes de



agua y todos estos procesos son con agua continua. La calidad de agua residual generada en la fabricación de pulpa y el blanqueo es significativamente distintivo debido a los procesos y tipos químicos (Monte *et al.*, 2009). Aproximadamente 200 m³ de agua se utilizan por tonelada de pulpa producida y la mayoría de ella contaminada, especialmente agua residual generada por el proceso de fabricación de pulpa química. Los principales problemas de las agua residual son el elevado contenido orgánico o demanda química de oxígeno (DQO) (20-110 kg DQO/T de papel que se seca el aire) de coloración marrón oscuro y la demanda de oxígeno biológico (DOB), haluros orgánicos absorbibles (AOX), contaminantes tóxicos, etc. (Nurmesniemi *et al.*, 2007). La preparación de madera, fabricación de pulpa, lavado de la pulpa, cribado, lavado, blanqueo, la máquina de papel y revestimiento son operaciones de fuentes de contaminación más importantes entre las distintas etapas del proceso. El agua residual del proceso de blanqueo de pulpa mecánica tiene una calidad diferente. Esta agua residual no es de mayor resistencia que el agua residual en el proceso de fabricación de pulpa, sin embargo, incluyen componentes tóxicos (Ochoa, 2008).

Los problemas ambientales de la industria de la pulpa y papel no están limitados por el gran consumo de agua. La generación de agua residual, residuos sólidos (que incluye la generación de lodos de plantas de tratamiento de aguas residuales) y emisiones a la atmósfera son otros problemas de interés (figura 3). Enfoques para la investigación de los tratamientos y eliminación eficaces de estos factores son de interés.

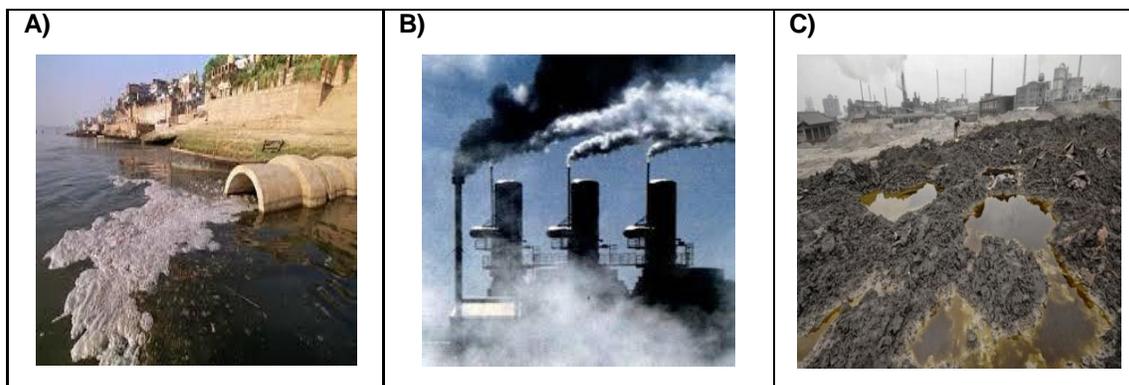


Figura 3. Contaminación de agua (A), aire (B) y suelo (C) generada por la industria de la pulpa y papel.



En los procesos del blanqueo y tratamiento de agua residual, las enzimas fúngicas pueden ser utilizadas debido a su potencial redox para modificar e inactivar componentes tóxicos presentes en los procesos industriales. Por lo cual las empresas podrían mejorar las metodologías utilizadas con estas enzimas para el mejoramiento de los productos y obtener agua limpia, lo que ayudaría a mejorar las condiciones en la reutilización y tener productos amigables al ecosistema.

4.3 Hongos

El Reino Fungí constituye uno de los mayores grupos de seres vivos existentes en el planeta. La estimación conservadora aceptada del número de especies es de 1,5 millones (Blackwell, 2011). Esta estimación se derivó mediante la extrapolación de datos de hongos conocidos a partir de regiones estudiadas, así como datos de hongos estudiados a partir de huéspedes de plantas (Pringle *et al.*, 2009). Aunque no se sabe exactamente cómo ya se conocen muchas especies de hongos, se puede estar razonablemente seguro de que está en el intervalo de 72 000 a 100 000 (Schmit y Mueller, 2007). Esto implica que sabemos tan poco como un 5 %, es decir, sólo 1 de cada 20 especies de hongos que existen.

En lo que refiere a su nutrición los hongos son heterótrofos, utilizan compuestos orgánicos como fuente de carbono, electrones y energía. El glucógeno es el polisacárido primario que almacenan de reserva y la mayoría emplean hidratos de carbono (en especial glucosa o maltosa), así como compuestos nitrogenados para la síntesis de aminoácidos y proteínas. Los hongos requieren que las moléculas orgánicas sean de menor tamaño, para ello, excretan enzimas (extracelulares) al medio que rompen las grandes moléculas transformándolas en pequeñas (azúcares, aminoácidos, iones minerales, etc.). El hongo absorbe a través de las paredes y membranas de las hifas las moléculas resultantes de la digestión externa y ya dentro de las células son metabolizadas (Lutzoni y Miadlikowska, 2009).



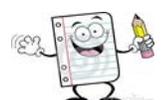
4.3.1 Clasificación de hongos

Dentro de los tipos de vida tenemos:

- ❖ Aquellos que obtienen nutrientes a partir de materia orgánica, no viva, que se encuentran en el medio y se les denomina saprófitos.
- ❖ Los hongos que obtienen los nutrientes lentamente a partir de hospedantes vivos, a menudo sin matarlo es denominado biótrosos (parásitos obligados). Este tipo de hongos segrega una cierta cantidad de compuestos que modifican la permeabilidad de las membranas del hospedante provocando la salida de azúcares y aminoácidos, que son absorbidos por el hongo.
- ❖ Los hongos que matan al hospedante se les denominan necrótrofos. Estos segregan toxinas que provocan la lisis celular con la liberación inmediata de nutrientes al medio, que son absorbidos por el hongo. Estos hongos funcionan como parásitos (facultativos), en primera estancia de ataque y posterior a esto es un saprótrofo una vez que el hospedante este muerto, regularmente son patógenos de plantas y animales.

Los hongos saprótrofos son fundamentales para el reciclado de nutrientes y la degradación de materia orgánica, especialmente los minerales fosfatados y moléculas de carbono que se encuentran en la superficie de la madera y otros recursos vegetales.

Las dos divisiones principales de hongos son los ascomicetos (Ascomicota) y los basidiomicetos (Basidiomicota) (figura 4), los cuales son llamados según las características de sus estructuras reproductivas. Los ascomicetos tienen como estructuras reproductivas a las ascas en forma de saco (*Griego askos, saco*), dichas estructuras se encuentran llenas de esporas; los basidiomicetos en cambio, tienen basidios como estructuras reproductivas (*Griego basidion, base pequeña*) (Lutzoni y Miadlikowska, 2009).



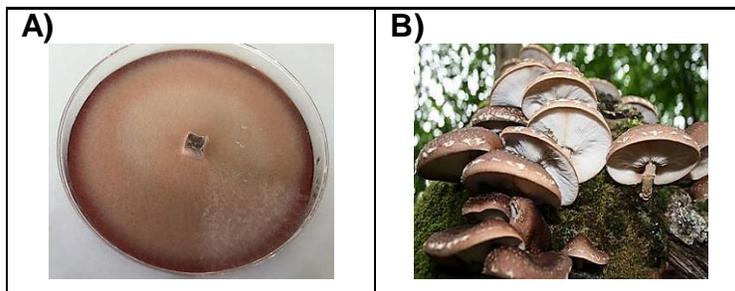


Figura 4. Imagen ilustrativa de hongos de la División Ascomycota (A) y Basidiomycota (B).

4.3.2 Degradación de productos lignocelulósicos por hongos

Los principales organismos que descomponen los productos lignocelulósicos pertenecen al reino de los hongos. Estos degradan los polímeros de la madera, incluso los componentes de lignina, mediante la excreción de enzimas extracelulares. Los hongos que presentan esta propiedad pueden provocar tres tipos de degradación del sustrato, podredumbre blanda, podredumbre parda y podredumbre blanca.

Hongos de podredumbre blanda. Algunos géneros de ascomicetos y deuteromicetos como *Aspergillus* y *Fusarium*, provocan reblandecimiento de los tejidos de la madera, acompañado de pérdida significativa de peso. Dichos hongos se desarrollan en las paredes de las células vegetales; generalmente se presentan en angiospermas con gran porcentaje de humedad; estos hongos se caracterizan por degradar a la celulosa, hemicelulosa y en menor grado a la lignina (Carbajo, 2015).

En la actualidad las enzimas son utilizadas ampliamente en el desarrollo industrial de la transformación química como catalizadores económicamente disponibles y ambientalmente amigables. Las ganancias que se generan a partir de la industria de producción de enzimas en 2005 se registraron en alrededor de los dos billones de dólares anuales y en el futuro se estima que sea superior a los tres billones de dólares anuales y esto sin dejar atrás la rápida expansión de la biotecnología. Aunque la industria enzimática representa una pequeña parte de la industria de productos químicos, el rápido crecimiento de la biotecnología hace que el campo



de la industria de enzimas se proyecte con un crecimiento acelerado en un futuro cercano (Xu, 2005).

4.4 Aplicación de las enzimas

Xu en 2005 propone tres grupos en base a las principales aplicaciones de las enzimas generadas por la industria. El primer grupo de ellos lo forman las enzimas generadas para el uso tecnológico en un 65 %. El segundo lo componen aquellas enzimas destinadas para el uso de la industria de alimentos con un 25 % y el tercer grupo lo forman las enzimas destinadas para la alimentación con un 10 % (Berka y Cherry, 2006).

4.4.1 Clasificación de las enzimas

El Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (CN-UIBBM) indica que la nomenclatura y clasificación de las enzimas se basa en la reacción que catalizan (<http://enzymes.me.uk/enzyme/ec> 2013).

Las clases enzimáticas son: 1) Oxidoreductasas, 2) Transferasas, 3) Hidrolasas, 4) Liasas, 5) Isomerasas y 6) Ligasas. Las enzimas óxido-reductoras a su vez se subdividen en grupos de acuerdo al tipo de sustrato que utilizan: Deshidrogenasas, Oxidasas, Peroxidasas, Hidroxilasas, Oxigenasas y Reductasas. En cuanto a la reacción que catalizan, las enzimas comerciales comunes son hidrolasas, mientras que la producción de óxido-reductasas va en aumento. En los últimos años son un éxito los nuevos desarrollos en la aplicación de enzimas óxido-reductasas. El progreso se logra en la utilización de enzimas para el mejoramiento de biosensores y en importantes ensayos de diagnóstico clínico (CN-UIBBM, 2013).

En la figura 5 se muestra el modelo de una reacción de óxido-reducción catalizada por una enzima. En este ejemplo, se representa al sustrato en su estado reducido (color rojo), se tiene a la enzima (color verde) que para este caso requiere de una coenzima (color amarillo), así como de un agente externo que se encuentra



oxidado (color azul). Una vez que se da la interacción enzima-coenzima-sustrato, se lleva a cabo el transporte de electrones del sustrato a la coenzima y finalmente al agente oxidante, de tal forma que al terminar la catálisis, el sustrato queda oxidado y el agente externo queda reducido (Calderon, 2009).

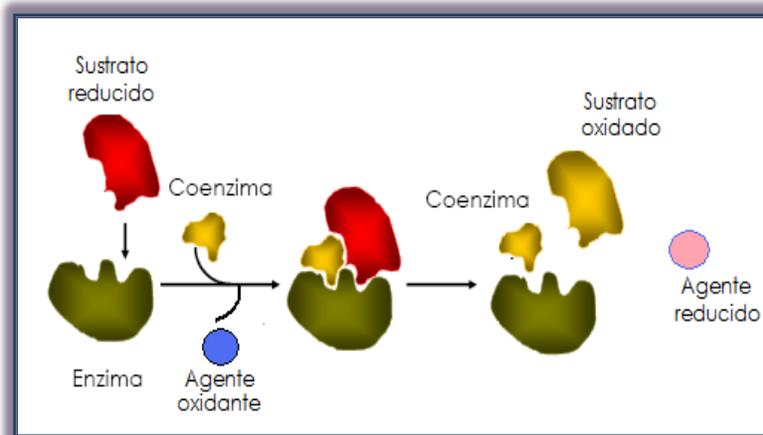


Figura 5. Modelo de una reacción de óxido-reducción catalizada por una enzima

4.5 Aplicación de las enzimas en la industria de la pulpa y papel

4.5.1 Blanqueo de pulpa para papel

La eliminación de lignina de pulpas químicas se llama blanqueo y es necesario blanquearla por razones estéticas y la mejora de las propiedades del papel. Hoy en día el blanqueo de la pulpa kraft utiliza grandes cantidades de productos químicos de cloro elemental y sus derivados (Ibarra *et al.*, 2006). Derivados del uso de estos productos químicos son sustancias orgánicas cloradas, algunos de los cuales son tóxicos, mutágenos, persistentes, bioacumulativas y causan numerosas alteraciones perjudiciales en los sistemas biológicos (Sigoillot *et al.*, 2005). Las opciones abiertas para la industria de la pulpa y papel que consideran un cambio de blanqueo libre de cloro son deslignificación con oxígeno, cocción extendida y la sustitución de dióxido de cloro por cloro, peróxido de hidrógeno y ozono. La mayoría de éstos implican modificaciones de proceso y/o inversiones de



capital (Seo y Kim, 2015). Este clima de cambio proporciona una oportunidad para la investigación de las enzimas. Las enzimas proporcionan una forma simple y rentable para reducir el uso de cloro, compuestos de cloro y otros productos químicos de blanqueo. Las enzimas también ofrecen un enfoque simple que permite que se alcance un límite máximo de brillo superior. Todo esto se puede lograr sin grandes inversiones de capital (Arana *et al.*, 2010).

Hasta ahora, dos enfoques basados en enzimas son investigados. Uno utiliza hemicelulasas y otros ligninasas.

Hasta hace poco, en la industria de pulpa y papel, las enzimas no se consideraban técnica o económicamente factibles. Sencillamente, enzimas adecuadas no estaban fácilmente disponibles, excepto para uso limitado en la modificación de almidón para revestimientos de papel. Sin embargo, la investigación por instituciones científicas y productores de enzimas en el desarrollo de enzimas ofrecen beneficios significativos para la industria. Actualmente, la aplicación más importante de enzimas es en el preblanqueo de pulpa kraft (Bajpai *et al.*, 2007).

También, las enzimas son utilizadas para aumentar la fibrilación de la pulpa y la retención de agua y para reducir el compás en pulpas. Con fibras recicladas, las enzimas son utilizados en el destintado y para restaurar la unión y aumentar grado de refinación (Arana *et al.*, 2010).

4.5.2 Hemicelulasas

Estas enzimas se utilizan comercialmente en el blanqueo de pulpa. La principal enzima para mejorar la deslignificación de la pulpa Kraft es la endo- α -xilanasas, pero el enriquecimiento de xilanasas con otras enzimas hemicelulolíticas demuestran la mejora en el efecto del tratamiento enzimático (Kaur *et al.*, 2016). Diferentes productos de papel, los cuales incluyen el papel de revista y papeles tisú fabricados a partir de pastas tratadas enzimáticamente, son introducidas con éxito en el mercado (Chutani y Sharma, 2015).



4.5.3 Xilanasas

Varios criterios son esenciales en la elección de un microorganismo para producir xilanasas. Además de dar el efecto deseado de bi blanqueo, la preparación de enzima resultante debe ser producida en cantidades suficientemente grandes, y la tecnología de producción de xilanasas debe ser compatible con la tecnología de una fábrica de pulpa. Además, es esencial que la preparación de la enzima esté completamente libre de la actividad celulolítica. Cualquier actividad celulolítica tendrá graves consecuencias económicas en términos de pérdida de celulosa, calidad de pulpa degradada y el aumento del costo de tratamiento de efluentes (Savitha *et al.*, 2009).

Las tecnologías de blanqueo tradicionales también pueden beneficiarse de tratamientos con xilanasas. Las xilanasas se aplican fácilmente y requieren esencialmente de un gasto mínimo de capital. Debido a que las cargas de dióxido de cloro se pueden reducir, las xilanasas pueden ayudar a mejorar el blanqueo de la pulpa con la reducción del componente dióxido de cloro.

4.6 Aplicación de las enzimas óxido-reductoras en la deslignificación de la pulpa para papel

Las oxido reductasas comprenden una gran clase de enzimas que catalizan reacciones biológicas de oxidación/reducción. Como tantas transformaciones químicas y bioquímicas implican procesos de oxidación/reducción. La noción de desarrollo de aplicaciones prácticas biocatalíticas de enzimas óxido-reductoras son un atractivo (Guzik *et al.*, 2014).

Las principales enzimas de uso biotecnológico en la industria del papel son aquellas con capacidad de eliminar lignina, dentro de las que destacan la Lacasa, Lignina Peroxidasa, Manganese Peroxidasa y Celobiosa Deshidrogenasa.

4.6.1 Lacasas (Lac)

Las lacasas (Bencenediol: oxígeno oxidoreductasa, C.E. 1.10.3.2) son enzimas



que forman parte del sistema ligninolítico producidas por varios hongos. La enzima es una fenol oxidasa con cobre que oxida anillos de lignina en ausencia de Lignina Peroxidasa. Estas enzimas extracelulares poseen un grupo *N*-glicosilato que presenta en su estructura dos monosacáridos: Manosa y *N*-acetilglucosamina; contiene además cadenas glicosídicas unidas a oxígeno y nitrógeno, cuya masa molecular se encuentra aproximadamente entre 60-390 kDa (Widsten y Kandelbauer, 2008).

Las Lac reducen el oxígeno molecular a agua y realizan simultáneamente la oxidación de un electrón de diversos sustratos tales como difenoles, monofenoles sustituido por metoxilos, aminas aromáticas y alifáticas. La catálisis se lleva a cabo mediante cuatro átomos de cobre (un átomo de cobre tipo 1, un cobre de tipo 2 y dos cobres de tipo 3) que forman parte del sitio activo de la enzima (Kudangaa *et al.*, 2011).

4.6.2 Manganeso Peroxidasa (MnP)

La enzima Manganeso Peroxidasa (C.E. 1.11.1.13) es una hemoproteína que cataliza la oxidación de Mn^{+2} a Mn^{+3} dependiente de peróxido (H_2O_2), presenta un potencial de oxidación suficiente para absorber electrones de estructuras fenólicas. El Mn^{+3} es quelado por diferentes ácidos orgánicos como glicolato y puede oxidar una amplia variedad de compuestos fenólicos (Ozturk y Kasikara, 2007). Además, por su pequeño tamaño, este ion podría actuar en zonas internas de la lignina, inaccesibles a un ataque enzimático directo.

En *P. chrysosporium* se detectaron varias MnP codificadas por distintos genes que presentan, al igual que los que codifican LiP, una regulación diferencial, dependiendo de las condiciones y del medio de cultivo. Esta actividad se ha descrito. Además, en otros hongos de podredumbre blanca, como *Trametes versicolor* (Carbajo, 2015).



4.6.3 Lignina Peroxidasa (LiP)

La actividad lignina peroxidasa (C.E. 1.11.1.14) se describió por primera vez en el basidiomiceto *P. chrysosporium*. La LiP es una glicoproteína monomérica que contiene un grupo hemo (hierroprotoporfirina IX) como grupo prostético, tiene un peso molecular entre 38 y 46 KDa y un punto isoeléctrico (pI) que varía entre 3,2 y 4,7 (Wong, 2009). La actividad LiP es detectada en numerosos hongos de podredumbre blanca, entre otros en *P. chrysosporium* y *Trametes versicolor*. Su actividad depende de la presencia de H₂O₂ y cataliza la oxidación de compuestos fenólicos y no fenólicos, hidrocarburos aromáticos policíclicos y otros compuestos que son resistentes al ataque microbiano, lo que demuestra su capacidad para oxidar una amplia variedad de compuestos modelo de lignina (Carbajo, 2015).

4.6.4 Celobiosa Deshidrogenasa

La Celobiosa Deshidrogenasa (CDH, C.E. 1.1.99.18) es una proteína monomérica que consiste en dos dominios, uno que contiene un grupo hemo y un dominio que contiene un dinucleótido de adenina y flavino (FAD) o un 6-hidroxi FAD que está unido no covalentemente. Es una homoflavoenzima que oxida los extremos reductores de celobiosa y algunos celooligosacáridos a sus correspondientes lactonas, el cual es subsecuentemente hidrolizado al correspondiente ácido carboxílico. La CDH tiene un peso molecular de 90 kDa, de los cuales 80 kDa son de la proteína y 10 kDa son pertenecientes a una glicosilación principalmente de monómeros de manosa.

En estudios previos en el hongo *P. chrysosporium* muestran que con la sobre expresión de cuatro enzimas óxido-reductoras mejoran la degradación de sustratos recalcitrantes (Coconi *et al.*, 2015). En 2010 Arana *et al.*, realizaron la expresión heteróloga del gen *cglcc1*, responsable de la producción de lacasa en el hongo basidiomiceto *Coriopsis gallica*, en la levadura *Kluyveromyces lactis*. El número kappa y contenido de lignina disminuyó, lo que indica un efecto deslignificador en el proceso de blanqueo en pulpa. Chaparro *et al.*, 2009 y Liers



et al., 2006 determinan que *Cookeina tricoloma* y *Xylaria polymorpha* obtenidos a partir de madera en descomposición de troncos caídos tienen actividad de Lacasa y Celobiosa Deshidrogenasa, relacionadas con la degradación de lignina de madera en descomposición.

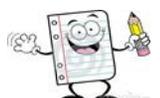
En nuestro grupo de trabajo Monterola en 2013 realizó un escrutinio de 126 aislados fúngicos, esto con la finalidad de observar la capacidad de producir actividad enzimática óxido-reductora. La actividad enzimática se determinó mediante el método de Czapek-Dox suplementado con 2,6-diclorofenolindofenol (DCFIF) en placas de medio sólido. Un total de 21 aislados fúngicos (denominado grupo M21) presentaron actividad enzimática óxido-reductora.

Por ello, en este trabajo se realizaron investigaciones sobre la producción de enzimas óxido-reductoras a partir del grupo M21, por lo cual serían una alternativa en el proceso del blanqueo de la pulpa, con lo que se contribuye a obtener procesos libres de cloro y así también que la producción de las enzimas sean económicamente rentables para su uso biotecnológico.



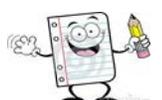
5. JUSTIFICACIÓN

Las enzimas óxido-reductoras de origen fúngico son una alternativa potencial para la eliminación de lignina en el blanqueo de la pulpa química y coadyuvan en la disminución del daño ecológico. Por ello, en este trabajo se seleccionan hongos filamentosos como productores de enzimas óxido-reductoras.



6 HIPÓTESIS

El extracto enzimático de un aislado fúngico nativo de la región presenta actividad óxido-reductora.

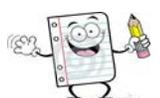


7. OBJETIVO GENERAL

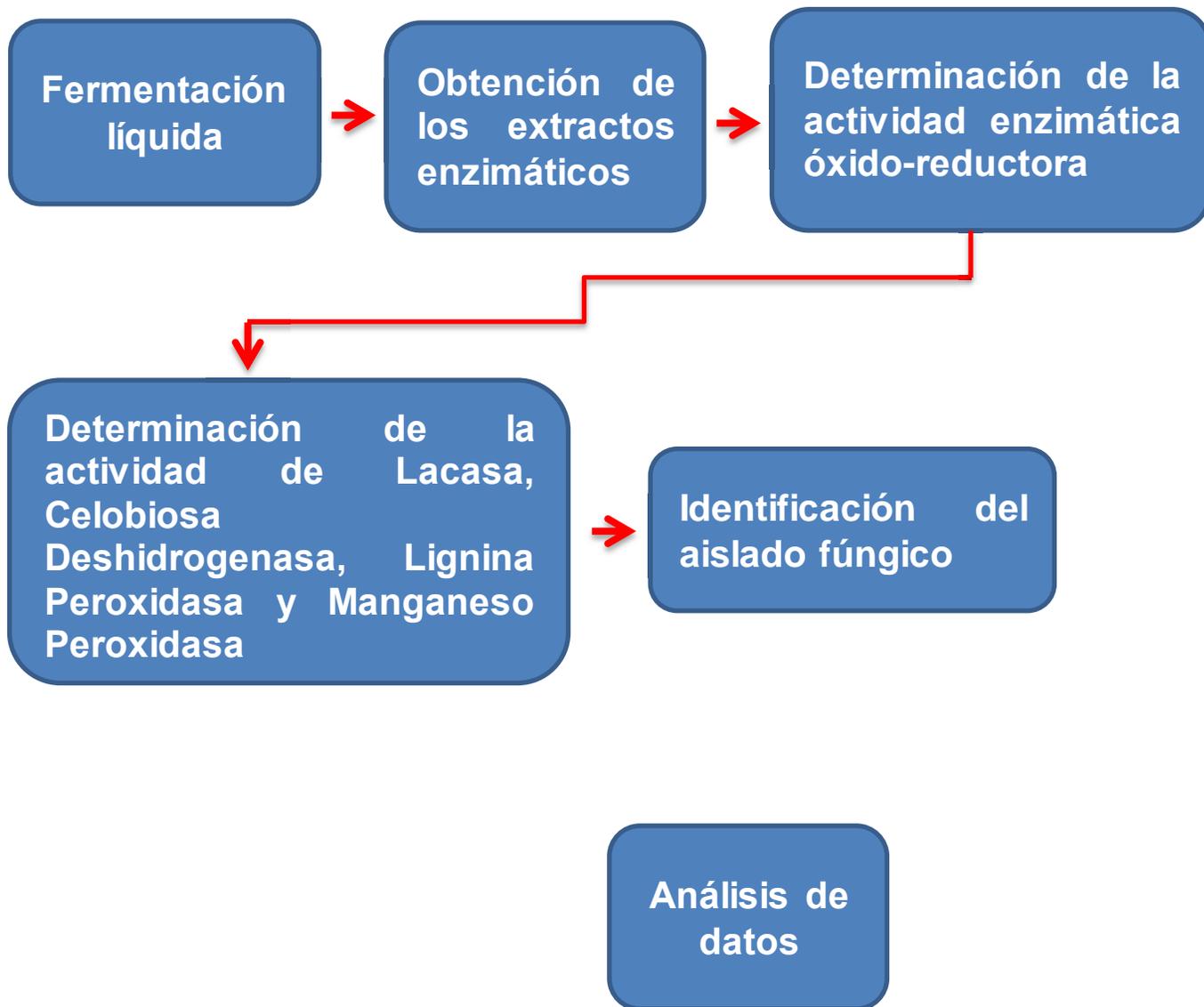
- ❖ Seleccionar un aislado fúngico del grupo M21 con actividad enzimática óxido-reductora.

7.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Determinar la actividad enzimática óxido-reductora en el grupo M21.
- ❖ Identificar las enzimas Lacasa, Lignina Peroxidasa, Manganeso Peroxidasa y Celobiosa Deshidrogenasa en el grupo M21.
- ❖ Identificar molecularmente el aislado con mayor actividad óxido-reductora.



8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1 Material biológico

Los aislados fúngicos fueron proporcionados del cepario del laboratorio de Fisiología Celular del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas (UMSNH).

9.2 Medios de cultivo

- I. Agar papa dextrosa (PDA). Treinta y nueve gramos del medio agar papa dextrosa (Bioxon) se disolvieron en 1 l de agua tridestilada, se sometió a ebullición durante un min y finalmente se esterilizó en autoclave a 125 °C y 1,5 atm de presión por 15 min.

Los aislados del grupo M21 se resembraron en PDA por triplicado durante siete días para obtener cultivos jóvenes. Estos cultivos jóvenes se utilizaron para la fermentación líquida.

- II. Componentes del medio mínimo líquido (Bartnicki-García y Nickerson, 1962) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Composición del medio mínimo líquido.

Componente	g/l
Dextrosa	20,0
Fosfato potásico monobásico (KH ₂ PO ₄)	3,0
Sulfato magnesio (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0,5
Nitrato de amonio (NH ₄ NO ₃)	0,5
Sulfato de zinc (ZnSO₄·7H₂O)	1,8 x 10⁻³
Sulfato ferroso (FeSO₄·7H₂O)	1 x 10⁻³
Tiamina	1 x 10⁻³
Ácido nicotínico	1 x 10⁻³
Sulfato cúprico (CuSO₄·5H₂O)	4 x 10⁻⁴
Sulfato de manganeso (MnSO₄·H₂O)	3 x 10⁻⁴

Todos los componentes del medio de cultivo en negritas se disolvieron en agua desionizada y se esterizaron por filtración. Los demás componentes se esterizaron en autoclave a 121 °C y 1,5 atm de presión por 15 min.



9.3 Producción enzimática del grupo M21

La determinación de la producción enzimática se realizó de acuerdo a lo reportado por Calderón en 2009, se tomó un propágulo de cinco mm de diámetro de los 21 hongos a ensayar y se inoculó en matraces con 10 ml de medio mínimo (ver componentes en cuadro 3). Las fermentaciones líquidas se realizaron por triplicado durante seis días, en agitación continua a 120 rpm y 29 °C. El muestreo (separación de micelio y líquido) se realizó después del tiempo de incubación y el líquido se centrifugó a 10 000 rpm durante cinco min. El sobrenadante se utilizó para la cuantificación de la actividad enzimática y proteínas extracelulares. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

9.4 Determinación enzimática óxido-reductora del grupo M21

La determinación enzimática se realizó mediante el método descrito por Calderón, 2009. La cuantificación óxido-reductora se realizó con la medición de la reducción del 2,6-diclorofenolindofenol (DCFIF). La mezcla de reacción contenía DCFIF 2 mM (150 μ l) en amortiguador de fosfatos 10 mM a pH de 6,3, de celobiosa 2,5 mM (2 550 μ l) y el extracto enzimático 0,01 mg/ml (150 μ l). La actividad enzimática se determinó a una absorbencia de 600 nm por 3 min a 37 °C. Una unidad de actividad óxido-reductora se definió como la cantidad de enzima necesaria para reducir 1 μ mol de DCPIP/min.

9.5 Determinación de Lignina Peroxidasa, Manganeso Peroxidasa y Lacasa

La actividad de Lignina Peroxidasa (LiP) se estimó por el método de Tien y Kirk 1983. El ensayo se basó en la oxidación del alcohol veratrílico (alcohol 3,4-dimetoxibencilo) a veratrilaldehído en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La oxidación del alcohol veratrílico por la enzima se determinó por espectrofotometría a 310 nm. La mezcla de reacción contenía extracto enzimático 0,01 mg/ml (250 μ l), de alcohol veratrílico 1 mM (250 μ l), de H_2O_2 0,2 mM (25 μ l) y



de amortiguador de citrato 0,1 M (500 μ l) a pH 5.

La actividad de Manganese Peroxidasa (MnP) se realizó mediante el método descrito por Kuwahara *et al.*, (1984). El ensayo se basó en la oxidación del rojo fenol por la enzima a 610 nm. La mezcla de reacción contenía extracto enzimático 0,01 mg/ml (250 μ l), rojo fenol al 1 % p/v (50 μ l), lactato de sodio 250 mM (100 μ l), sulfato de manganeso 2 mM (25 μ l), albúmina sérica bovina (BSA) al 0,5 % p/v (100 μ l), de H₂O₂ 0,2 mM (25 μ l) y amortiguador de citrato 0,1 M (500 μ l) a pH 5.

La actividad de Lacasa se determinó por la oxidación del 2,2'-azino Bis (3-etilbenzotiazolina 6-sulfónico) (ABTS) mediante el método descrito por Papinutti *et al.*, 2003. La mezcla de reacción contenía de ABTS 5 mM (200 μ l), de amortiguador de citrato 0,1 M (600 μ l) a pH 5 y de extracto enzimático 0,01 mg/ml (200 μ l). La oxidación del ABTS es determinada en el incremento de la absorbencia a 436 nm.

La actividad enzimática es expresada en U/ml. Una unidad (U) se define como la cantidad de actividad enzimática que cataliza la transformación de 1 μ mol de sustrato por minuto.

9.6 Determinación de Celobiosa Deshidrogenasa (CDH)

La cuantificación de CDH se realizó mediante la medición de la reducción de DCFIF en lo descrito por Calderón, 2009. La mezcla de reacción contenía de DCFIF 2 mM (150 μ l) en amortiguador de fosfatos 10 mM a pH de 6.3, de celobiosa 2,5 mM (2 550 μ l) en amortiguador de fosfatos, de fluoruro de sodio 4 mM (150 μ l) en amortiguador de fosfatos y extracto crudo enzimático 0,01 mg/ml (150 μ l). La actividad enzimática se determinó a una absorbencia de 600 nm por 3 min a 37 °C. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para reducir 1 μ mol de DCFIF/min.



9.7 Determinación del contenido de proteína

El contenido de proteína extracelular del grupo M21 se determinó con el método descrito por Lowry *et al.*, 1951, para el cual se utilizó las siguientes disoluciones:

A: Na_2CO_3 al 3 % en NaOH 0,2 M en agua desionizada

B: Citrato de sodio al 4 % en agua desionizada

C: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 2 % en agua desionizada

Una mezcla de las disoluciones anteriores se preparó en una proporción de 1:1:48 (v/v) de B:C:A con el siguiente orden de adición:

1. – 24 ml de Na_2CO_3 en NaOH 0,2 M

2. – 0,5 ml de Citrato de sódio

3. - 0,5 ml de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Para tal caso se obtuvo una curva estándar de proteína (Figura 6) en donde la pendiente de la curva se utilizó para determinar el contenido de proteína de la muestra problema. La Albúmina Sérica Bovina (BSA) se utilizó como estándar en concentración de 5 mg/ml, la formación de color azul se determinó mediante la absorbencia a 640 nm.

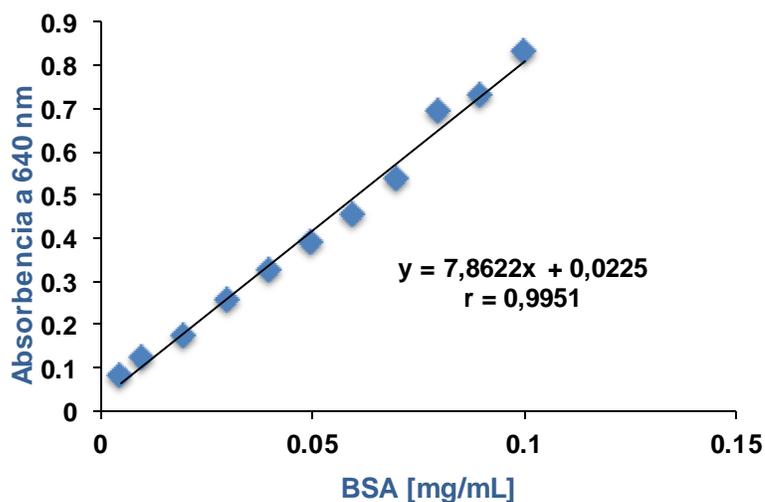


Figura 6. Curva de calibración de proteína. Curva patrón: puntos azules. Curva teórica: línea negra. Coeficiente de correlación, $r = 0,9951$.



9.8 Determinación de la actividad celulolítica

La actividad de endocelulasa (endo- β -1,4-glucanasa) se determinó mediante el método modificado de Ghose, 1987. A cada tubo de ensaye se añadieron 400 μ l de amortiguador de citrato de sodio 50 mM a pH 5, 500 μ l de disolución carboximetilcelulosa al 1 % (p/v), disuelta en amortiguador de citrato 50 mM y 100 μ l de extracto enzimático (0,1 mg/ml). La mezcla de reacción se homogeneizó y se incubó en un termobañó a 50 °C durante 30 min. La reacción se detuvo con 1 ml de ácido 3,4 dinitrosalicílico (DNS). Los tubos se colocaron en baño María durante 15 min y se dejaron enfriar. Los azúcares reductores se cuantificaron en un espectrofotómetro a 540 nm. Cada ensayo se realizó por triplicado. La determinación de azúcares reductores en la muestra problema se obtuvieron a partir de una curva patrón de dextrosa (figura 7). La actividad específica se expresó en U/mg. Una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que cataliza un μ mol de azúcares reductores por minuto en las condiciones de ensayo.

9.9 Cuantificación de azúcares reductores con ácido dinitrosalicílico (DNS)

Para la cuantificación de azúcares reductores se utilizó el método reportado por Miller, 1959. A partir de una disolución de dextrosa 5 mg/ml se prepararon diluciones con agua destilada para obtener una gama de disoluciones de dextrosa a diferente concentración. En el cuadro 2 se presentan los componentes del reactivo DNS.

Cuadro 2. Componentes del reactivo DNS

Componente	g/l
Tartrato de sodio y potasio	200
Hidróxido de sodio	20
Ácido dinitro salicílico	10
Fenol	2
Sulfito de sodio	0,5



De cada disolución se tomó cantidades crecientes en mililitros y se transfirió a un tubo de ensaye, se adicionó 1 ml del reactivo DNS, se mezcló e incubó en baño María (agua en ebullición) durante 15 min, finalmente se realizó una lectura espectrofotométrica a 640 nm para obtener la curva estándar de dextrosa, en el intervalo de concentración de 0 a 1,5 mg/ml. La pendiente de la curva se utilizó para determinar la concentración de dextrosa de cada muestra problema (figura 9).

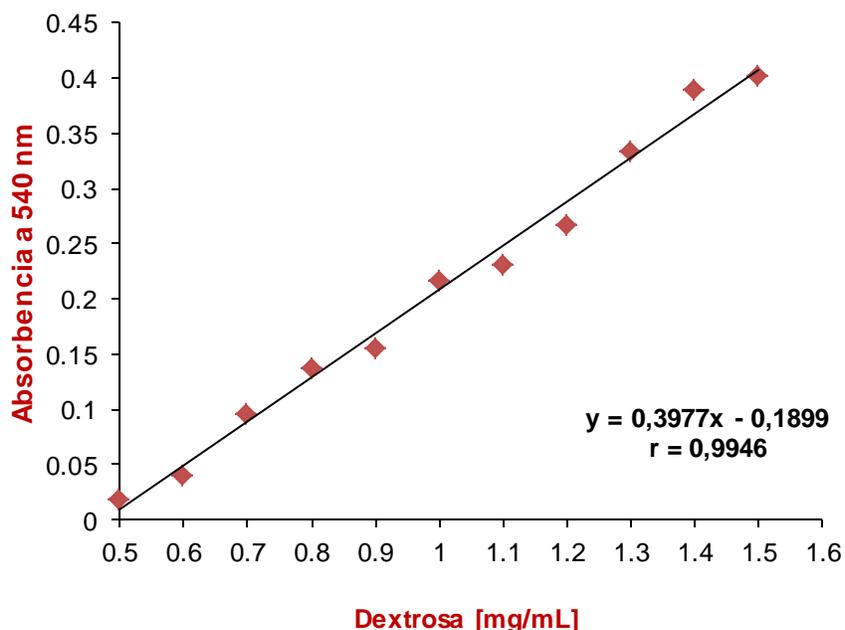


Figura 7. Curva calibración de dextrosa. Curva patrón: puntos azules. Curva teórica: línea negra. Coeficiente de correlación, $r = 0,9946$.

9.10 Identificación molecular

Los aislados se crecieron en agar dextrosa papa con capa de celofán durante 6 días a temperatura ambiente. El micelio se removi6 del papel celofán y se colocó en tubo falc6n a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. El micelio (40 μg) se colocó en un tubo que contenía 480 μl de TENS (Tris-HCl 200 mM a pH de 8,5; cloruro de sodio 250 mM; ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 25 mM y SDS al 0,5 %). Los componentes se mezclaron por inversión y se adicionó Fenol:Cloroformo:Alcohol isoamílico



(24:24:1) (v/v). De nuevo se mezcló por inversión por aproximadamente 10 min.

Las muestras se centrifugaron a 12 000 g por 45 min a 4 °C. La fase acuosa se recuperó y se extrajo con un volumen de Fenol:Cloroformo (1:1) (v/v). Posteriormente se mezcló por inversión y se obtuvo la fase acuosa por centrifugación a 12 000 g por 5 min. La fase acuosa se transfirió a un tubo limpio, se adicionó 0,54 ml de isopropanol y se mezcló por inversión. La mezcla se centrifugó a 12 000 g por 10 min, se recuperó el precipitado y se lavó 2 veces con etanol al 70 % a temperatura ambiente. El precipitado se secó y se suspendió en TE de pH 8,0.

9.11 Amplificación del fragmento ITS

Para la reacción de amplificación, se colocaron 25 µl (volumen final), 50-100 ng de ADN, ITS1 10 pM, ITS4 10 pM; dNTP's 200 mM; 1 unidad de Taq polimerasa (Fermentas) y agua hasta el volumen final.

Cuadro 3. Reacciones de una amplificación y desnaturalización del ADN.

Ciclos	Temperatura	Etapa
A) 1 ciclo 5 min	94 °C	Desnaturalización inicial
5 ciclos 30 s	94 °C	
30 s	55 °C	
30 s	72 °C	
B) 30 ciclos		
30 s	94 °C	Desnaturalización
30 s	58 °C	Alineamiento de primers
1,5 min	72 °C	Síntesis de ADN
C) 1 ciclo		
10 min	72 °C	Síntesis final de ADN

La secuencia de oligonucleótidos:

ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')



ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')

Con estos oligonucleótidos se amplificó un fragmento nucleotídico de 500 a 650 pares de bases (White *et al.*, 1990). Una alícuota de la reacción se analizó en un gel de agarosa al 1 % con TAE 1 X como regulador de corrida. Un poli nucleótido del tamaño esperado se encontró y se secuenció por el método de Sanger *et al.* 1997.

9.12 Electroforesis en gel de agarosa

El ADN se analizó en un gel de agarosa al 1 % con TAE 1X (Trisacetato 40 mM; EDTA 1 mM) como regulador de corrida. La muestra de ADN se mezcló con regulador de carga (EDTA 6 mM; Ficoll al 18 %; verde de bromocresol al 0,15 %; xileno cianol al 0,25 %) para aplicarlo al gel. La muestra se separó y los geles se incubaron en una solución de bromuro de etidio (10 mg/ml) para su tinción y se observaron bajo luz ultravioleta.

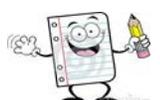
9.13 Análisis de correspondencia

Un análisis de correspondencia se realizó para estudiar la asociación o nivel de dependencia entre aislados fúngicos y su respuesta a las condiciones de cultivo. Las variables categóricas se registraron como crecimiento fúngico en medio sólido (FG), actividad óxido-reductora (OR), actividad Celulolítica (AC), actividad de Manganeseo de Peroxidasa (MnP), actividad Lacasa (LAC) y Celobiosa Deshidrogenasa (CDH) para facilitar la selección de los mejores aislados fúngicos. Las variables categóricas se organizaron en una matriz de 2 vías. Las variables FG, OR, AC, MnP, LAC y CDH se asignaron a las columnas y los aislados fúngicos se asignaron a las filas. La media de los valores se utilizó para el análisis estadístico. La distancia entre puntos en un espacio bidimensional indica la similitud o afinidad entre las variables categóricas. Una menor distancia entre las variables categóricas indica mayor similitud.



9.14 Análisis estadístico

Los datos se expresaron como la media \pm error estándar (ES), se realizó un análisis de varianza de una vía con el paquete estadístico Statistic versión 8.0, así como una prueba de comparación de medias Tukey ($\alpha = 0,05$) para determinar si existen diferencias significativas entre los aislados fúngicos evaluados y se realizó un análisis de correlación de *Pearson*. En el análisis de correspondencia, se utilizó la diferencia entre las frecuencias observadas y esperadas para comparar variables categóricas. Los datos se analizaron con el software Statistica versión 8 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, EE.UU.).



10. DISCUSIÓN

El estudio de las enzimas óxido-reductoras obtenidas a partir de hongos es una alternativa potencial para la sustitución de materiales químicos que se utilizan en el sector industrial. Un sector que se beneficiaría con la utilización de estas enzimas es la industria de la pulpa y papel, el cual sustituye las sustancias químicas en el proceso del blanqueo de la pulpa. Dentro de las ventajas de utilizar estos sistemas biológicos es su amplio uso en los sectores industriales, lo cual podría tener un costo rentable y ser amigable con el ecosistema.

En los últimos años las investigaciones acerca de las enzimas óxido-reductoras que pueden degradar lignina han aumentado considerablemente, esto con la finalidad de observar su posible uso en la eliminación de la lignina en la primera etapa del proceso del blanqueo de la pulpa química, sin embargo, existen países que realizan este procedimiento de manera convencional (utilizan Cloro elemental o sus derivados).

En este trabajo se realizó un escrutinio de 21 aislados fúngicos, que previamente se les había determinado la actividad enzimática óxido-reductora en medio sólido de fermentación. Posteriormente se decidió evaluar esta actividad en medio mínimo líquido con la finalidad de observar el comportamiento de los aislados en la producción enzimática óxido-reductora. Una vez realizadas las fermentaciones, los 21 aislados fúngicos se corroboró la producción enzimática. Estos datos muestran que los aislados 6, 13 y 19 presentaron mayor actividad entre los aislados ensayados, una vez que se realizó el análisis estadístico, mostró que no existieron diferencias significativas, sin embargo, numéricamente estos tres aislados destacaron. Estos son los primeros datos obtenidos de las cepas analizadas en medio sólido.

Una vez mostrados los datos de ambas condiciones fermentativas, realizamos un análisis de correlación de Pearson esto con la finalidad de observar la asociación



entre las variables problema. Los resultados obtenidos son una correlación de $r = 0,55$ y $p = 0,05$, lo cual indica que existe una relación positiva y por tanto las actividades enzimáticas son comparables. El coeficiente de correlación indicó que al cambiar el medio de fermentación podemos observar otro comportamiento de cada aislado ensayado, esto se relaciona posiblemente a la velocidad de crecimiento de los aislados fúngicos en cada una de las condiciones, por lo tanto, se observa una mayor producción enzimática en medio líquido en los aislados 13 y 19, los cuales se encuentran fuera de la línea de regresión. Con estos resultados podemos inferir que el medio mínimo líquido de fermentación es viable y por lo tanto podemos seguir con nuestra experimentación. En cuanto a la actividad óxido-reductora no se tiene ningún antecedente sobre la producción enzimática, por lo tanto, hace interesante el estudio de los aislados fúngicos para un posible uso biotecnológico.

En la industria de la pulpa y papel existen tres métodos para el blanqueo de la pulpa química: Blanqueo con cloro elemental, blanqueo libre de Cloro elemental (EFC) y blanqueo libre de Cloro total (TCF) (Ibarra *et al.*, 2006; Seo y Kim, 2015). Este último es de gran importancia ya que dentro de los componentes que utiliza se encuentran las enzimas de origen microbiano. En la industria de la pulpa y papel para utilizar un microorganismo en el blanqueo se deben cumplir ciertas características. En primera instancia el tipo de microorganismo, en segundo plano que éste produzca una gran cantidad de enzima, posteriormente que exista una mínima o nula actividad celulolítica y finalmente que la industria contenga dentro de su infraestructura tecnología compatible para el mantenimiento del hongo, la producción y manejo del extracto crudo enzimático (Savitha *et al.*, 2009).

En este estudio se determinó la actividad celulolítica (AC) con la finalidad de observar la capacidad de producción enzimática de AC en el medio de fermentación líquido, ya que esta característica es importante debido a que si existe gran cantidad, tendríamos degradación de las fibras de celulosa y por lo tanto, rendimientos inferiores de pulpa y pérdidas en la producción de papel. Los



aislados 18 y 21 presentan mayor actividad en comparación con los demás aislados analizados, de acuerdo al análisis de varianza y comparación de medias no existieron diferencias significativas.

De acuerdo a la literatura los hongos segregan una cierta cantidad de enzimas al medio donde se desarrollan de manera natural y su represión catabólica dependerá del sustrato que se encuentre en su entorno, por ello en este trabajo inferimos que al adicionar dextrosa como única fuente de carbono al medio de fermentación líquido, la producción de enzimas celulolíticas se bloquea y por consecuente, detectamos menores cantidades de la misma.

La degradación de lignina de la pulpa para papel a partir de extractos enzimáticos es debido al tipo de enzimas presentes. En la literatura existen reportes de cuatro enzimas relacionadas con la deslignificación, las cuales son, Lignina Peroxidasa (LiP) y Manganeso Peroxidasa (MnP), Lacasa y Celobiosa Deshidrogenas (CDH). En este estudio realizamos el análisis de estas cuatro enzimas en los 21 aislados fúngicos con la finalidad de saber en cuales hongos se encuentran presentes. En la literatura se reporta la producción de Lacasa y CDH en un amplio número de ascomicetos tales como, *Magnaporthe grisea*, *Neurospora crassa*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Penicillium* (algunas especies de fitopatógenos), *Trichoderma* y *Botryosphaeria* (Assavanig *et al.*, 1992; Vasconcelos *et al.*, 2000).

En nuestro estudio el 100 % del grupo M21 producen CDH y el 75 % actividad de Lacasa. La presencia de estas enzimas demuestra su relación de producción de acuerdo a lo reportado por algunos autores como necesarias para la obtención de nutrientes y de esta manera aumentar la biomasa micelial para la invasión y degradación de la pared celular vegetal. En el caso de las Peroxidosas analizadas, la MnP el 80 % de los aislados fúngicos produce esta enzima. Esta enzima no está relacionada con el metabolismo directo de componentes por lo cual, algunos autores hacen referencia que la MnP no se encuentra relacionada con el metabolismo de los componentes y que puede producirse tiempo después en



comparación con la Lacasa y CDH. La LiP no fue detectada en este trabajo. Esta enzima solo se ha detectado en los hongos de la podredumbre blanca. Perumal and Kalaichelvan, 1996, publicaron un reporte preliminar de niveles inferiores de LiP, esto en *Ganoderma lucidum* en medios modificados con lignina aislada del bagazo de caña de azúcar. Para nuestro estudio se infiere que la producción de esta enzima es nula posiblemente por las condiciones del medio de fermentación líquido. La aplicación biotecnológica de estas enzimas incluye varios sectores importantes tales como, la industria (de los alimentos, de la pulpa y papel y la textil) farmacología y en la biorremediación del suelo (Brijwani *et al.*, 2010).

El efecto de bi blanqueo se realizó para observar cualitativamente la deslignificación de la pulpa Kraft de pino con los extractos enzimáticos de los aislados 6, 13 y 19. Los análisis se realizaron por Cromatografía en Capa Fina (TLC) y Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas. Los resultados no mostraron alguna señal característica de los derivados de lignina en los cromatogramas obtenidos. Con estos resultados inferimos que los parámetros que se utilizaron en la experimentación no fueron necesarios para observar un efecto favorable, por lo cual, queda en perspectiva reestructuración de la metodología de bi blanqueo con el hongo seleccionado. Las perspectivas para la complementación de este trabajo serían un curso temporal de producción enzimática óxido-reductora del aislado seleccionado, determinar las condiciones óptimas de producción enzimática, purificar las enzimas presentes y determinar el efecto deslignificador del extracto enzimático en pulpa Kraft.

Del análisis de correspondencia se observó una fuerte asociación entre las variables categóricas de OR y CDH. Esto indica que el crecimiento de hongos dependía del tipo de nutriente y la capacidad de secretar enzimas óxido-reductoras presentes en el medio de cultivo. Los aislados fúngicos 1, 3, 7, 8, 14, 15, 16, 17, 18, se encuentran relacionadas con la variable de Crecimiento y los aislados 18 y 21 con la variable AC. Los aislados fúngicos 6, 13 y 19 mostraron un patrón de comportamiento diferente del resto del grupo, los cuales presentan un mayor relación a las variables de OR, CDH y LAC. Estos hongos están más

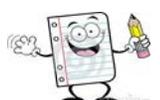


distantes de los otros aislados, lo que indica que los mecanismos y componentes del inventario genómico utilizado para la regulación de las enzimas de degradación de la pared celular de las plantas son diversos en diferentes hongos (Glass *et al.*, 2013, Alvarez *et al.*, 2015).



11. CONCLUSIÓN

El aislado fúngico 13 presentó mayor actividad enzimática óxido-reductora



12. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez N. M. 2015. ESTUDIO DE UN AISLADO FÚNGICO CON ACTIVIDAD XILANOLÍTICA. Tesis doctoral. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas (UMSNH). Michoacán.
- Alvarez N. M., Reyna L. G. E., Flores G. A., López G. R. y Martínez P. M. M. 2015. Selection and molecular identification of fungal isolates that produce xylanolytic enzymes. *Genetics and Molecular Research*. 14 (3):8100-8116.
- Arana C. A., A. Téllez J., Yagüe S. Fermiñán E., Carbajo J. M., Domínguez A., González T., Villar J. C. y González A. E. 2010. Delignification of *Pinus radiata* kraft pulp by treatment with a yeast genetically modified to produce laccases. *Forest Systems*. 19 (2):234-240.
- Assavanig A., Amornkitticharoen B., Ekpaisal N., Meevootisom V. y Flegel T.W. 1992. Isolation, characterization and function of laccase from *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 38 (2):198–202.
- Bajpai P., Anand A. y Bajpai P. K. 2007. Bleaching with lignin-oxidizing enzymes. *Biotechnol Ann Rev*. 12:349-378.
- Bartnicki-Garcia, S. y Nickerson, W. J. 1962. Nutrition, growth and morphogenesis of *Mucor rouxii*. *Journal of Bacteriology*. 84: 841-858.
- Berka, R. M. y Cherry, J. R. 2006. Basic Biotechnology. En: Colin Ratledge Bjorn Kristiansen Eds, third edition, Cambridge University press 2006. Chapter 20. 478-498.
- Blackwell, M. 2011. THE FUNGI: 1, 2, 3 ... 5.1 MILLION SPECIES?. *American Journal of Botany*. 98 (3):426–438.
- Brijwani K., Rigdon A. y Vadlani P. V. 2010. Fungal Laccases: Production, Function, and Applications in Food Processing. *Enzyme Research*. 1:10
- Calderón O. M. A. 2009. Caracterización parcial de la Celobiosa



Deshidrogenasa de *Colletotrichum lindemuthianum*. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. UMSNH.

- Carbajo G. J. M. 2015. Utilización de hongos de podredumbre blanca en la producción de pasta de celulosa de alto rendimiento. Tesis Doctoral. Madrid, España. Universidad Complutense de Madrid.
- Chaparro F. D., Rosas D. C. y Varela A. 2009. Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática de hongos descomponedores de madera (Quindío, Colombia). Revista Iberoamericana de Micología. 24(4):238-243.
- Chutani P. y Sharma K. K. 2015. Biochemical evaluation of xylanases from various filamentous fungi and their application for the deinking of ozone treated newspaper pulp. Carbohydrate Polymers. 127:54–63.
- Coconi L. N., Ortiz V. E., Fernández Francisco, Loske A. M. y Gómez L. M. A. 2015. Recombinant expression of four oxidoreductases in *Phanerochaete chrysosporium* improves degradation of phenolic and non-phenolic substrates. Journal of Biotechnology. 209:76-84.
- Ghose T. K. 1987. Measurement of cellulase activities. Pure and Applied Chemistry. 59:257-268.
- Glass N. L., Schmoll M., Cate J. H. D. y Coradetti S. 2013. Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi. Annu. Rev. Microbiol. 67: 477-498.
- Guzik U., Hupert-Kocurek K. y Wojcieszynska D. 2014. Immobilization as a Strategy for Improving Enzyme Properties-Application to Oxidoreductases. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 19:8995-9018.
- Ibarra D., Camarero S., Romero J., Martínez M. J. y Martínez A. T. 2006. Integrating laccase–mediator treatment into an industrial-type sequence for totally chlorine-free bleaching of eucalypt kraft pulp. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 81:159–1165.
- Jafari V., Nieminen K., Sixta H. y Van Heiningen A. 2015. Delignification and cellulose degradation kinetics models for high lignin content softwood Kraft pulp during flow-through oxygen delignification. Cellulose. 22:2055–2066.
- Kaur P., Bhardwaj N., K. y Sharma J. 2016. Pretreatment with xylanase and



- its significance in hemicellulose removal from mixed hardwood kraft pulp as a process step for viscose. *Carbohydrate Polymers*. 145:95–102.
- Kazuchika Y., Natthanon P., Haruo K., y Shiro S. 2013. Characterization of lignin-derived products from Japanese beech wood as treated by two-step semi-flow hot-compressed water. *Journal of Wood Science*. 59:149–154.
 - Kirk, T. K. y Farrell, R. L. 1987. Enzymatic “combustion”: The microbial degradation the lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* 41:465-505.
 - Kudangaa T., Nyanhongo G. S., Guebitz G. M. y Burtona S. 2011. Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: A review. *Enzyme and Microbial Technology*. 48:195–208.
 - Landa Z. L. M. 2011. ESCRUTINIO PARA LA OBTENCIÓN DE HONGOS PRODUCTORES DE CELULASAS. Tesis maestría. Instituto de investigaciones químico biológicas (UMNSH). Michoacán.
 - Lee D. S., Wi S. G., Lee Y. G., Cho E. J., Chung B. Y., y Bae H. J. 2011. Characterization of a New α -L-Arabinofuranosidase from *Penicillium* sp. LYG 0704, and their Application in Lignocelluloses Degradation. *Molecular Biotechnology*. 49: 229-239.
 - Liers C., Ullrich R., Steffen T., Hatakka A. y Hofrichter M. 2006. “Mineralization of ^{14}C -labelled synthetic lignin and extracellular enzyme activities of the wood-colonizing ascomycetes *Xylaria hypoxylon* and *Xylaria polymorpha*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 69 (5):573–579.
 - Lowry D. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. y Randall R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193:268-275.
 - Lutzoni F. y Miadlikowska J. 2009. Lichens. *Current Biology*. 19:502-503.
 - Miller G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31:426–428.
 - Monte M. C., Fuente E., Blanco A. y Negro C. 2009. Waste management from pulp and paper production in the European Union. *Waste Managament*. 29:293-308.



- Monterola N. K. Y. 2013. Actividad de una disacárido oxido-reductasa en un aislado fúngico silvestre. Tesis Licenciatura. Universidad del Mar, Campus Puerto Escondido, Oaxaca.
- Nurmesniemi H., Pöykiö R. y Keiski R. L. 2007. A case study of waste management at the Northern Finnish pulp and paper mill complex of Stora Enso Veitsiluoto Mills. *Waste Management*. 27:939-1948.
- Ochoa A. J. A. G. 2008. Feasibility of recycling pulp and paper mill sludge in the paper and board industries. *Resource, Conservation and Recycling*. 52:965-972.
- Ozturk U. R. y Kasikara P. N. 2007. Enhanced Production of Manganese Peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*. *BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY*. 50:913-920.
- Papinutti V. L., Diorio L. A. y Forchiassin F. 2003. Production of laccase and manganese peroxidase by *Fomes sclerdermeus* grown on wheat bran. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 30:157–160.
- Perumal K. y Kalaichelvan P. T. 1996. Production of extracellular lignin peroxidase and laccase by *Ganoderma lucidum* PTK-3 on sugarcane bagasse lignin. *Indian J. Exp. Biol*. 34:1121–1125.
- Polishchuk A., Valev D., Tarvainen M., Mishra S., Kinnunen V., Antal T., Yang B., Rintala J. y Tyystjärvi E. 2015. Cultivation of *Nannochloropsis* for eicosapentaenoic acid production in wastewaters of pulp and paper industry. *Bioresource Technology*. 193:469-476.
- Pringle A., Bever J. D., Gardes M., Parrent J. L., Rillig M. C. y Klironomo J. N. 2009. Mycorrhizal symbioses and plant invasions. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. 40:699-715.
- Rico C. A. 2010. Tratamientos enzimáticos con lacasas y mediadores naturales para la eliminación de lignina y lípidos presentes en pastas de celulosa. Proyecto Europeo BIORENEW. Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla.
- Sanger F., Nicklen, S. y Coulson A. R. 1997. DNA sequencing with



- chainterminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 74:5463-7
- Savitha S., Sadhasivam S. y Swaminathan K. 2009. Modification of paper properties by the pretreatment of wastepaper pulp with *Graphium putredinis*, *Trichoderma harzianum* and fusant xylanases. Bioresource Technology. 100:883–889.
 - Schmit J. P. y Mueller G. M. 2007. An estimate of the lower limit of global fungal diversity. Biodiversity and Conservation. 16:99-111.
 - Seo J. H. y Kim H. J. 2015. Effect of H₂O₂ bleaching with ultrasonication on the properties of thermomechanical pulp and unbleached kraft pulp. Ultrasonics Sonochemistry. 23:347–353.
 - Sigoillot C., Camarero S., Vidal T., Record, E., Asther M., Pérez-Boada, M., Martínez M. J., Sigoillot, J. C., Asther M., Colom J. F. y Martínez A. T. 2005. Comparison of different fungal enzymes for bleaching high-quality paper pulps. Journal of Biotechnology. 115:333-343.
 - Sumathi S. y Hung Y. T. 2006. Treatment of pulp and paper mill wastes, In: Waste treatment in the process industries. Eds: Taylor&Francis. ISBN 0-8493-7233-X, USA. 453-497.
 - Tien M. y Kirk T. K. 1983. Lignin-Degrading Enzyme from the Hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. SCIENCE. 221:661-663.
 - Vasconcelos A. F. D., Barbosa A. M., Dekker R. F. H., Scarminio I. S. y Rezende M. I. 2000. Optimization of laccase production by *Botryosphaeria* sp. in the presence of veratryl alcohol by the response-surface method. *Process Biochemistry*. 35 (10):1131–1138.
 - Vivekanand V., Dwivedi P., Sharma A., Sabharwal N., Singh R. P. 2008. Enhanced delignification of mixed wood pulp by *Aspergillus fumigatus* laccase mediator system. World J Microbiol Biotechnol. 24:2799–2804.
 - White T. J. Bruns T., Lee S. y Taylor J. 1990. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, Inc.



- Widsten, P. y Kandelbauer, A. 2008. Laccase applications in the forest products industry: A review. *Enzyme and Microbial Technology*. 42:293–307.
- Wong D. W. S. 2009. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Appl. Biochem. Biotechnol*. 157:174-209.
- Xu F. 2005. Applications of oxidoreductases: Recent Progress. *Industrial Biotechnology*. 8:38-50.
- Yang Z. Yu-pu L. y Qiong W. 2012. Patterns of variation in chemical compositions of wood from natural populations of *Pinus manssoniana* Lamb. In Guizhou Province, China. *Forestry Studies in China*. 14:112-117.
- Zhang L, Yan L., Wang Z., Laskar D. D., Swita M. S., Cort J. R. y Yang B. 2015. Characterization of lignin derived from water-only and dilute acid flow through pretreatment of poplar wood at elevated temperatures. *Biotechnol Biofuels*. 8:203.

Paginas consultadas en la web

Nomenclature of EC 1 Oxidoreductases. <http://enzymes.me.uk/enzyme/ec>

http://www.biologia.edu.ar/plantas/cell_vegetal.htm

