



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
CENTRO MULTIDISCIPLINARIO DE ESTUDIOS EN BIOTECNOLOGÍA**

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LA CEPA TA-CMU DE
Trametes sp.**

**TESIS QUE PRESENTA:
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO ERICK MAGAÑA RUÍZ**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
OPCIÓN BIOTECNOLOGÍA PECUARIA**

**DIRECTOR:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS CON ESPECIALIDAD EN
BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS GERARDO VÁZQUEZ MARRUFO**

MORELIA, MICHOACÁN, JULIO DEL 2015



EL PRESENTE TRABAJO SE DESARROLLÓ EN EL LABORATORIO DE CONSERVACIÓN Y BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA DEL CENTRO MULTIDISCIPLINARIO DE ESTUDIOS EN BIOTECNOLOGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO, BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. GERARDO VÁZQUEZ MARRUFO. SE AGRADECE EL APOYO ECONÓMICO DE LA CIC-UMSNU MEDIANTE EL PROYECTO APROBADO EN EL “PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN 2014-2015”. TAMBIÉN SE AGRADECE EL APOYO ECONÓMICO DEL CECTI-MICHOACÁN MEDIANTE SU PROGRAMA DE “APOYO A PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN Y ACCIONES PARA LA CONSOLIDACIÓN DE CUERPOS ACADÉMICOS Y FORMACIÓN DE GRUPOS COLEGIADOS” DEL AÑO 2014. SE CONTÓ CON APOYO DEL CONACYT MEDIANTE EL OTORGAMIENTO DE BECA A ESTUDIOS DE MAESTRÍA CON NÚMERO DE BECARIO 286266



ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
I. RESUMEN	1
II. SUMMARY	2
III. INTRODUCCIÓN GENERAL	3
3.1 Genero <i>Trametes</i>	3
3.2 Bioquímica de enzimas lignocelulósicas	5
3.3 Aplicaciones Biotecnológicas de Ligninasas	9
3.4 Relevancia del Presente Trabajo	10
IV. HIPÓTESIS	15
V. OBJETIVOS	16
5.1 Objetivo General	16
5.2 Objetivos Particulares	16
VI. RESULTADOS	18
6.1 CAPÍTULO 1. Identificación genético molecular de la cepa TA-CMU y análisis de la actividad de enzimas ligninolíticas.	19
6.2 CAPÍTULO 2. Actividad de enzimas ligninolíticas en presencia de rastrojo de maíz y modificaciones estructurales a dicho sustrato por la cepa silvestre TA-CMU de <i>Trametes versicolor</i> .	41
6.3 CAPÍTULO 3. Remoción de fenoles provenientes de agua residual papelera y degradación de licor negro por la cepa silvestre TA-CMU de <i>Trametes versicolor</i> .	60
6.4 CAPÍTULO 4. Degradación de colorantes sintéticos por la cepa silvestre TA-CMU de <i>Trametes versicolor</i> .	87
VII. DISCUSIÓN GENERAL	105
VIII. CONCLUSIÓN GENERAL	111
IX. PERSPECTIVAS	112

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
ϵ	Coeficiente de extinción molar
μg	Microgramos
μL	Microlitros
a.a	Aminoácidos
AAO	Aril alcohol oxidasa
ABTS	3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AR	Agua residual Industrial papelera
ARN	Ácido ribonucleico
CEM	Caldo Extracto de Malta
CMU	Cepario Michoacano Universitario
DMP	2,6-Dimetoxifenol
DQO	Demanda Química de Oxígeno
Lac	Lacasa
LN	Licor Negro
LiPs	Lignin peroxidasas
MnPs	Manganeso Peroxidasas
NM	Naranja de Metilo
PODs	Peroxidasas

ÍNDICE DE FIGURAS

1. INTRODUCCIÓN

No. Figura	Título	Página
1	Características morfológicas del género <i>Trametes</i>	4
2	Tipos de pudrición de madera en hongos	5
3	Estructura química de lignina	6
4	Principales mediadores de lacasas extracelulares	7
5	Reacciones simplificadas de la Lignin Peroxidasa y Glioxal Oxidasa	8
6	Reacciones simplificadas de la Manganese Peroxidasa y Lacasa	9

5. RESULTADOS

5.1 CAPÍTULO 1

No. Figura	Título	Página
1	Morfología de <i>Trametes versicolor</i>	21
2	Relaciones filogenéticas del género <i>Trametes</i> empleando los genes nLSU, ITS, RPB1, RPB2 y TEF1	22
3	Análisis filogenético de la cepa TA-CMU	29
4	Cinética de crecimiento de la cepa silvestre TA-CMU de <i>Trametes</i> sp. en medio líquido PDB basal y adicionado CuSO ₄ y MnSO ₄ a 150 µM	30
5	Actividad enzimática basal de enzimas ligninolíticas de la cepa silvestre TA-CMU de <i>T. versicolor</i>	31
6	Actividad enzimática de ligninasas de la cepa silvestre TA-CMU de <i>T. versicolor</i>	32
7	Actividad enzimática de ligninasas de la cepa silvestre TA-CMU de <i>T. versicolor</i>	32

5.2 CAPÍTULO 2

No. Figura	Título	Página
1	Componentes lignocelulósicos en plantas	44
2	Porcentaje de los componentes lignocelulósicos en distintos tipos de residuos agrícolas	46
3	Cinética de crecimiento de la cepa silvestre TA-CMU de <i>T. versicolor</i> en medio líquido basal PDB y suplementado con rastrojo de maíz en distintas formulaciones	50
4	Actividad enzimática de ligninasas de la cepa silvestre TA-CMU de <i>T. versicolor</i>	51
5	Actividad enzimática de ligninasas de la cepa silvestre TA-CMU de <i>T. versicolor</i>	51
6	Análisis de la delignificación del rastrojo de maíz	52



5.3 CAPÍTULO 3

No. Figura	Título	Página
1	Separación del Licor Negro a través del proceso de pulpeo	64
2	Componentes típicos del Licor Negro	66
3	Cinética de crecimiento de la cepa TA-CMU en agar en presencia de distintas concentraciones de agua residual papelera	71
4	Cinética de crecimiento de la cepa TA-CMU en AEM en presencia de distintas concentraciones de agua residual papelera	71
5	Cinética de crecimiento de la cepa TA-CMU en AEM en presencia de LN a distintas concentraciones	72
6	Cinética de oxidación de la cepa TA-CMU en AEM en presencia de LN a distintas concentraciones	72
7	Cinética de oxidación en placa de licor negro 1% (v/v)	73
8	Cinética de crecimiento de la cepa silvestre TA-CMU de <i>T. versicolor</i> en medio líquido PDB basal y adicionado con agua residual papelera (100 % v/v)	74
9	Actividad enzimática de ligninasas de la cepa silvestre TA-CMU de <i>T. versicolor</i> en medio líquido suplementado con Licor Negro (1% v/v) y glucosa (2% w/v)	74
10	Actividad enzimática de ligninasas de la cepa silvestre TA-CMU de <i>T. versicolor</i> en medio líquido con Agua Residual Papelera	75
11	Cinética de decoloración por bioadsorción (micelio inactivado) y biodegradación (micelio vivo) por parte de la cepa TA-CMU de <i>T. versicolor</i> en medio líquido con Agua Residual Papelera	76
12	Cinética de decoloración por bioadsorción (micelio inactivado) y biodegradación 77(micelio vivo) de la cepa TA-CMU de <i>T. versicolor</i> en medio líquido con licor negro (1% v/v y glucosa 2% w/v)	76
13	Determinación de fenoles totales provenientes de medios líquidos con licor negro (1% v/v y glucosa 2% w/v) y agua	77

residual papelera con interacción de la cepa TA-CMU de *T. versicolor*

- | | | |
|----|--|----|
| 14 | Ensayos de decoloración de licor negro (1% v/v y glucosa 2% w/v) y agua residual papelera (100% v/v) con extracto enzimático crudo por parte de la cepa TA-CMU de <i>T. versicolor</i> | 78 |
|----|--|----|

5.4 CAPÍTULO 4

No. Figura	Título	Página
1	Estructura química de los colorantes más comunes	90
2	Ensayos de degradación de colorantes sintéticos	96
3	Actividad enzimática de ligninasas de la cepa silvestre TA-CMU de <i>T. versicolor</i>	97
4	Cinética de decoloración por bioadsorción por parte de la cepa TA-CMU de <i>T. versicolor</i> en medio líquido con Naranja de Metilo 150 mg/L	98
5	Ensayos de decoloración de Naranja de Metilo (150 mg/L) por parte de la cepa TA-CMU de <i>T. versicolor</i>	99

I. RESUMEN

El género *Trametes* incluye a especies de hongos que se caracterizan por la producción de lacasas extracelulares, lignin peroxidasas (LiPs) y manganeso peroxidasas (MnPs). Los primeros reportes de la presencia de actividades enzimáticas de ligninasas en el género *Trametes* se realizaron en la especie *T. versicolor* durante la última década del siglo pasado. Debido a la baja especificidad de estas enzimas es posible su aplicación en distintos procesos industriales, biotecnológicos y de biorremediación. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad de producción de lacasa extracelular, LiP y MnP de un aislado silvestre de *Trametes* sp. bajo distintos inductores de actividad enzimática, así como probar su eficiencia en el biotratamiento de sustratos orgánicos recalcitrantes y xenobióticos. En una primera etapa se analizaron las relaciones filogenéticas de la cepa TA-CMU, determinando que pertenecía a la especie *Trametes versicolor*. La cepa fue crecida en medio sólido de extracto de malta, para los ensayos de decoloración en placa adicionado con distintos xenobióticos, así como en medio líquido de extracto de papa bajo la presencia de diversos inductores de actividad enzimática. De los inductores inorgánicos, el cobre mostrará un mayor incremento de actividad enzimática de ligninasas, que el manganeso con 490 U L^{-1} para la lacasa y 94.6 U L^{-1} para las MnP 17.8 U L^{-1} . Sin embargo, el mayor incremento ocurrió en presencia de rastrojo de maíz, con valores de 535 U L^{-1} para la lacasa, 87.6 U L^{-1} para la MnP y 109.4 U L^{-1} para la LiP. En términos de xenobióticos y efluentes con fenoles, el agua residual de papelería arrojó mayores actividades enzimáticas de ligninasas a comparación del Licor Negro, con 404.5 U L^{-1} para la lacasa, 62.3 U L^{-1} para la MnP y 128 U L^{-1} para la LiP. Sin embargo, el porcentaje de fenoles remanentes fue menor en el Agua Residual (48.7%). Con extracto crudo enzimático sólo el Licor Negro fue decolorado de manera significativa. Soluciones acuosas de los tintes Fucsina Ácida, Chicago Sky Blue, Azul Ácido y Azul Remazol Brillante fueron decoloradas en su totalidad, sin embargo, la de Naranja de Metilo se decoloró sólo un 81%. De éste último, los ensayos de bioadsorción mostraron una decoloración del 12% al séptimo día de incubación. Finalmente con extracto crudo enzimático, dicho colorante es degradado significativamente durante las primeras horas de incubación. La cepa TA-CMU presenta las principales enzimas del complejo ligninolítico las cuales actúan eficientemente sobre sustratos orgánicos diversos, incluidos residuos agrícolas y xenobióticos

Palabras clave: *Trametes*, enzimas ligninolíticas, inductores orgánicos, biorremediación.

II. SUMMARY

The genus *Trametes* includes fungal species characterized by the production of extracellular enzymes such as laccase, lignin peroxidase (LiPs) and manganese peroxidase (MnPs). The first reports of the presence of the enzymatic activities of ligninases in the genus *Trametes* were performed in the species *T. versicolor* during the last decade. Due to the low specificity of these enzymes is possible its application on different industrial and biotechnological processes as well as in biorremediation. The aim of this study was to evaluate the capacity to produce extracellular laccase, LiPs and MnPs from a wild strain of *Trametes* sp, under different inducers of enzyme activity and prove its efficiency in degrading recalcitrant organic substrates, and xenobiotics. In a first step the genetic relationships of the TA-CMU strain was analyzed, determining that it belonged to the species *Trametes versicolor*. For the plate tests, the strain was grown on malt extract solid medium added with different xenobiotics and inoculated in potato dextrose broth under the presence of various inducers of enzyme activity. Within the inorganic inductors, copper showed the greatest increase in enzyme activity of ligninases, 490 U L⁻¹ for laccases, 94.6 U L⁻¹ for MnPs and 17. U L⁻¹ for LiPs, compared with manganese. However, the highest increase occurred in the presence of corn straw 535 U L⁻¹ for laccase, 87.6 U L⁻¹ for MnP and 109.4 U L⁻¹ in the case of LiP. The paper wastewater showed higher enzyme activities of ligninases compared with Black Liquor, 404.5 U L⁻¹ for laccase, 62.35 U L⁻¹ for MnP and 128 U L⁻¹ for LiP. Nevertheless, the percentage of remaining phenols was lower in wastewater (48.7%). From tests with crude enzyme extract, only the Black Liquor was degraded significantly. Synthetic dyes Acid Fuchsin, Chicago Sky Blue, and Acid Blue Bright Blue Remazol were fully decolorized, however Methyl Orange was decolorized only 81%. The biosorption tests showed 12% discoloration of this dye by the seventh day of incubation. Finally, such dye is degraded significantly during the first hours of incubation in the presence of crude enzyme extract. The TA-CMU strain presents the main ligninolytic enzyme complex which act efficiently on various organic substrates, including agricultural residues and xenobiotics.

Keywords: *Trametes*, ligninolytic enzymes, organic inductors, bioremediation.

III. INTRODUCCIÓN GENERAL

3.1 Género *Trametes*

Los hongos son un grupo diverso de organismos que se encuentran en prácticamente cualquier ecosistema. Dentro del reino Fungi, el phylum Basidiomycota incluye a grupos de hongos que forman cuerpos fructíferos en forma de repisas sobre la madera; estas características también incluyen la producción de esporas sexuales en una célula especial llamada basidio y la reproducción asexual se realiza por conidios o esporas cuando existen estos dos tipos de estructuras. El género *Trametes* se creó inicialmente por Fries (1835), colocándolo en la tribu Polyperei junto con todas las especies coriáceas que presentan un himenio poroide caracterizado por un contexto continuamente descendiente a la trama himenial. Más tarde Quélet (1886) redefine la sistemática de los poliporales y separa a especies con poros regulares, incluyendo especies estipitadas y sésiles o resupinadas de especies con poros alveolares a intrincados, incluyendo, por ejemplo a *Trametes gibbosa* y *T. suaveolens*. Posteriormente, se consideraron otras características morfológicas relevantes para definir los nuevos géneros del “clásico *Trametes*”, por ejemplo, Quélet (1886) incluye la presencia de un tomento en la superficie abhimenial como elemento distintivo para *Coriolus*.

De acuerdo a la pigmentación del contexto, se crearon los géneros *Coriolopsis* Murril (1905) en base a *Trametes occidentales* (Klotzsch), ahora *Coriolopsis polizona* y *Pycnoporus* Karsten (1881) basado en *Trametes cinnabarinaria*, para distinguir a especímenes trametoides con color café o siena. Patouillard (1900), reunió a distintos géneros de acuerdo a sus afinidades en su “*série des Trametes*” dentro de los cuales incluyó a géneros poroides, laminados e intrincados. Considerando al mitismo del contexto como un nuevo carácter. Kotlaba y Pouzar (1957), restringieron al género *Trametes* a especies con sistema hifático trimítico, sin embargo, Patouillard seguía incluyendo en el “grupo de *Trametes*” a todos los géneros con sistema di o trimítico y esporas hialinas, lisas e inamiloides (figura 1).

Finalmente, el tipo de pudrición (blanca y parda) fue revelado por Nobles (1958) como una característica distintiva entre los géneros de la familia Polyporaceae (figura 2). Por consiguiente, las habilidades derivadas del tipo de pudrición se consideraron una nueva característica del grupo *Trametes*. Ésta característica consiste en descomponer la lignina de la madera para poder acceder a la celulosa y la hemicelulosa, que se encuentran embebidas

dentro de la matriz de lignina, de ahí que jueguen un papel ecológico fundamental en el ciclo de carbono.

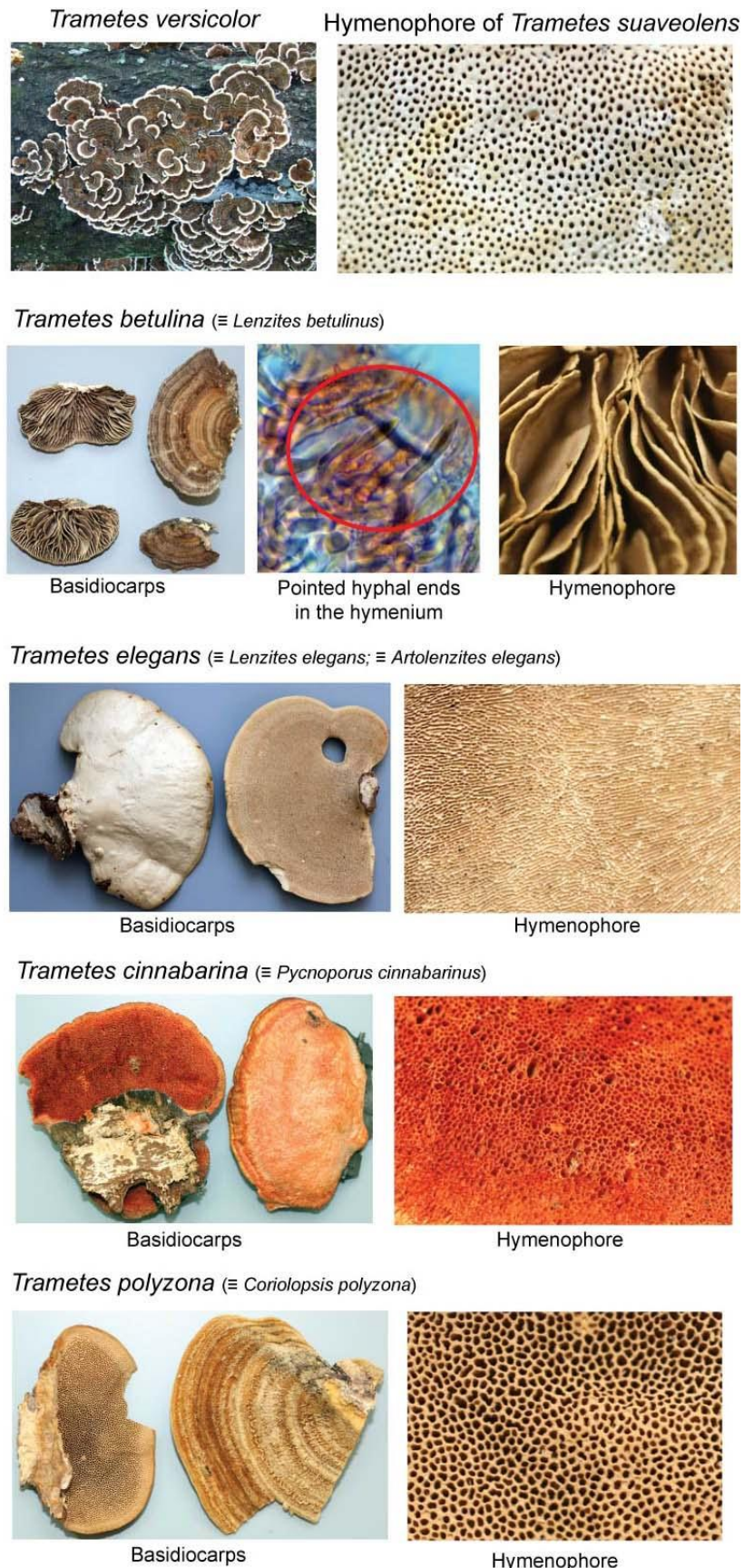


Figura 1. Características morfológicas del género *Trametes* (Tomado de Tomšovský, 2012)

Actualmente se consideran tres mecanismos de descomposición de la madera, denominados pudrición blanca, pudrición café y pudrición blanda o suave.

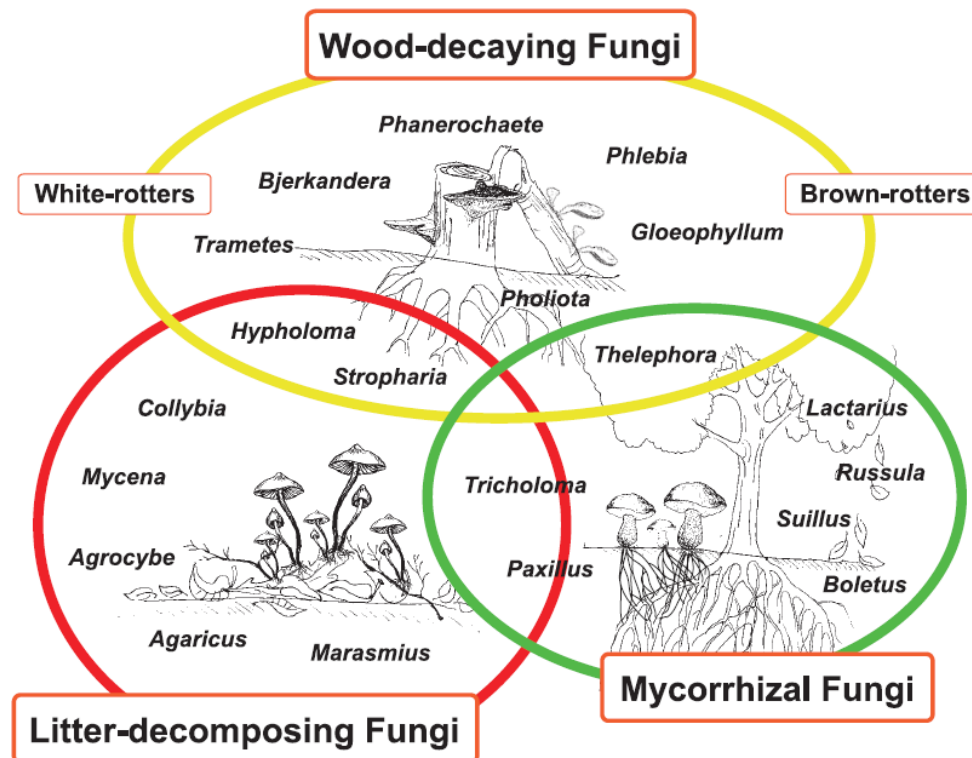


Figura 2. Tipos de pudrición de madera por hongos (tomado de Steffen, 2003).

Los hongos de pudrición blanca producen una serie de enzimas ligninolíticas extracelulares, tales como lacasas, lignin peroxidasas (LiPs) y manganeso peroxidasas (MnPs) (Arantes y Ferreira-Milagres, 2007). El género *Trametes* incluye a especies que se caracterizan por la producción de éstas enzimas. Los primeros reportes de la presencia de actividades enzimáticas de LiP y MnP en el género *Trametes* se realizaron en la especie *T. versicolor* durante la última década del siglo pasado (Johansson y Nyman, 1993; Johansson *et al.*, 1993; Jönsson y Nyman, 1994). Posteriormente se ha documentado la actividad de lacasa, lignin peroxidasa y peroxidasa dependiente de Mn en otras especies del género, incluyendo *T. gallica* (Sun *et al.*, 2004) y *T. pubescens* (Nikitina *et al.*, 2005).

3.2 Bioquímica de enzimas ligninolíticas

Los complejos de enzimas lignocelulósicas se pueden agrupar de acuerdo al polímero de la pared celular vegetal donde actúan (Figura 3). Estas enzimas secretadas por los microorganismos incluyen las celulasas o enzimas hidrolíticas, pectoliasas y glacturonasas, hemicelulasas, así como oxidoreductasas, que incluyen a las lacasas y peroxidasas (PODs) como las lignin peroxidasas (LiP) y las peroxidasas dependiente de manganeso (MnP). El

sistema enzimático ligninolítico de los hongos basidiomicetes representa uno de los pocos sistemas naturales capaces de mineralizar completamente la lignina (Hatakka, 1994; Osono, 2007). Se ha encontrado que las principales enzimas involucradas en la degradación de la lignina por los hongos de pudrición blanca son las lacasas extracelulares (Lac), las lignin peroxidadas (LiPs) y las peroxidadas dependientes de manganeso (MnPs). Las reacciones oxidativas que pueden llevar acabo las lacasas para despolimerizar la lignina incluyen el rompimiento entre enlaces C α -C β , la hidroxilación, rompimiento de estructuras aromáticas y la desmetilación (Sariaslani, 1989) (figura 3).

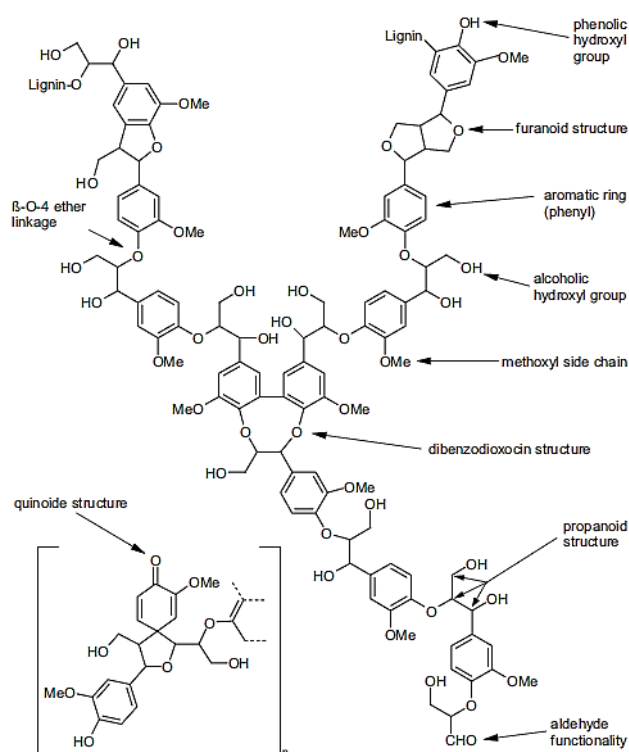
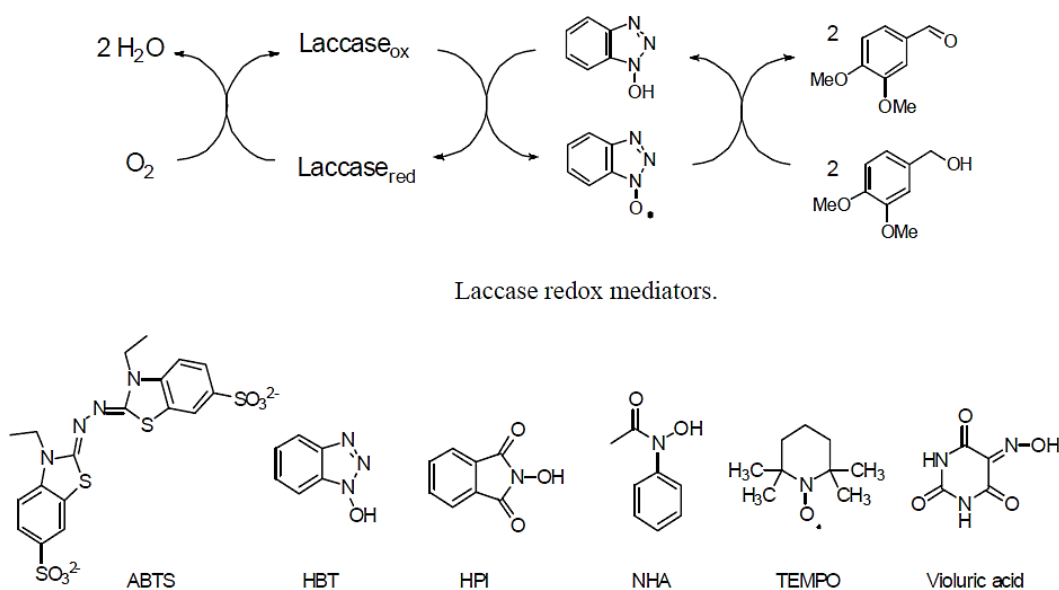


Figura 3. Estructura química de la lignina (tomado de Bommarius y Riebel, 2004).

Una forma de clasificar a las fenol oxidasas es de acuerdo a su tipo de actividad, formando así los grupos: cresolasas (EC 1.14.18.1), catecoloxidasa (EC 1.10.3.1) y lacasas (EC 1.10.3.2) (Suzuki *et al.*, 2003). Las lacasas pertenecen a la familia de las oxidasas, enzimas que utilizan al cobre como cofactor, se encuentran distribuidas en plantas, bacterias y hongos. Particularmente en hongos están involucradas en distintos procesos biológicos tales como la degradación de la lignina y la detoxificación de compuestos xenobióticos circundantes al micelio de manera extracelular, intracelularmente se les ha involucrado en la esporulación, la producción de pigmentos, la formación de rizomorfos, el desarrollo del cuerpo fructífero y la patogénesis hacia plantas (Thurston, 1994).

Estas cuproproteínas han sido utilizadas en la industria para la degradación de compuestos fenólicos en efluentes, la degradación de la lignina en procesos de biopulpeo, la eliminación de compuestos tóxicos, así como biosensores para la detección de compuestos aromáticos que tienen afinidad importante por dichas enzimas (Temp y Eggert, 1999). La forma en la que dichas enzimas actúan es catalizando la oxidación de cuatro electrones y reduciendo el oxígeno a agua, que a su vez está acompañada por la oxidación típica de un sustrato fenólico el cual genera un radical libre; el cual es generalmente inestable. También, puede experimentar una segunda oxidación por catálisis enzimática para formar quinonas, o puede ocurrir una reacción no enzimática tal como una hidratación o desprotonación, y/o podría participar en una reacción de polimerización, dando como resultado un compuesto amorfo insoluble como la melanina (Thurston, 1994). Además, las lacasas pueden oxidar a sustratos no fenólicos en presencia de mediadores apropiados como el ABTS (2,2'-azino-bis 3-etilbenzotriolina-6-sulfonato). Estas enzimas tienen una amplia especificidad de sustrato así como de mediadores redox (Johannes, 2000) (figura 4).

Figura 4. Principales mediadores de lacasas extracelulares (tomado de Woolridge, 2014).



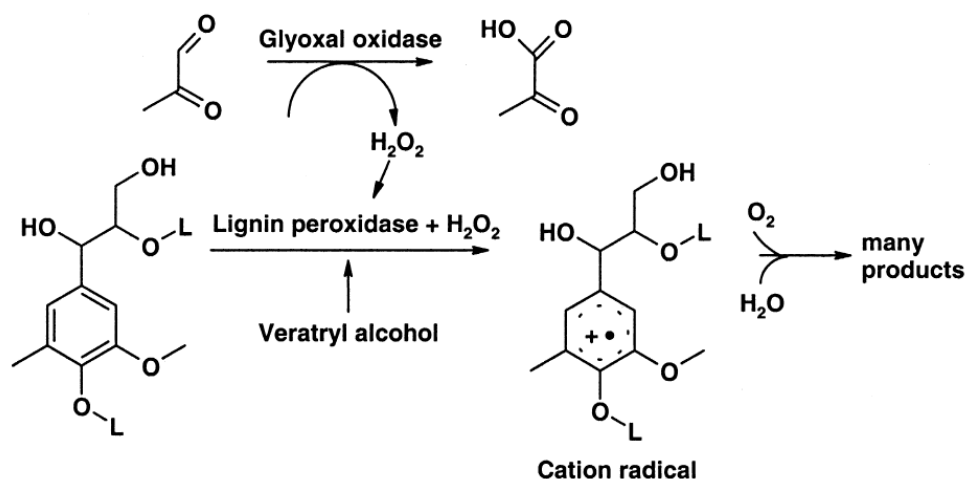
Las peroxidasas se clasifican en dos superfamilias de acuerdo a sus diferencias estructurales, la Superfamilia de las Peroxidasas Animales (Kimura e Ikeda-Saito, 1988) y la Superfamilia de las Peroxidasas Bacterianas, Fúngicas y de Plantas (Welinder y Gajhede, 1993). Las peroxidasas fúngicas engloban proteínas de secreción como las lignin peroxidasas (LiPs) y la manganeso peroxidasas (o peroxidasa dependiente de Mn+2) (MnPs) producidas por los hongos ligninolíticos (Hatakka, 1994).

En cuanto a sus características estructurales, las peroxidasas presentan dos dominios bien definidos en una estructura dominada por diez hélices alfa (50% de la molécula), junto con cinco láminas beta, cuatro de ellas formando pares antiparalelos.

Las LiPs son hemoproteínas glicosiladas que cuentan con una protoporfirina IX como grupo prostético, las cuales se diferencian en sus mecanismos catalíticos respecto a las MnPs. Las LiPs actúan sustrayendo un solo electrón de los anillos aromáticos de los compuestos de lignina, lo que lleva a la formación de un radical catiónico y a subsecuentes reacciones de ruptura de enlaces que oxidan tanto compuestos fenólicos como no fenólicos (Nakatani *et al.*, 2010) (figura 5).

Estas enzimas son potencialmente valiosas en procesos industriales de la elaboración de pulpa de papel y cartón así como en la eliminación de residuos xenobióticos. Dichas actividades enzimáticas son producidas por hongos de podredumbre blanca (*WRF* por sus siglas en inglés) durante su metabolismo secundario, incluyendo especies de hongos comestibles y no comestibles. Dado que la oxidación de la lignina no proporciona ninguna energía neta para el hongo, la síntesis y secreción de estas enzimas son a menudo inducidas por la limitación de nutrientes (principalmente de carbono y nitrógeno) junto con peróxido de hidrógeno. La LiP interactúa con la lignina en presencia de un cofactor llamado alcohol veratrílico, un metabolito secundario de los hongos de podredumbre blanca.

Fig 5. Reacciones simplificadas de la Lignin Peroxidasa y Glioxal Oxidasa (tomado de Kirk y Kullen, 1998).



Las LiPs (E.C. 1.11.1.14) son glicoproteínas que contienen un grupo hemo como cofactor. Catalizan la despolimerización oxidativa dependiente de H_2O_2 de una variedad de compuestos no fenólicos de la lignina y una amplia gama de los compuestos fenólicos como

el guayacol, el alcohol vanilínico y el catecol, entre otros. Las LiP pueden oxidar sustratos aromáticos no fenólicos debido a su potencial redox.

Las MnPs (E.C. 1.11.1.13) son glicoproteínas extracelulares que catalizan la oxidación de Mn (II) dependiente de peróxido, como sustrato de reducción, al manganeso (III). El potencial de oxidación por el manganeso (III) se limita solamente a las estructuras fenólicas de la lignina. Sin embargo, para la oxidación de sustratos no fenólicos por el manganeso (III), los radicales reactivos se deben formar en presencia de un segundo mediador, los ácidos orgánicos, tales como oxalato y malonato, son los compuestos primarios que actúan como segundos mediadores en la producción de radicales reactivos (Dashtban et al., 2010) (figura 6). La MnP es la oxidoreductasa ligninolítica más común presente en los basidiomicetos y oxida el Mn (II) a Mn (III), misma que ataca las estructuras fenólicas de la lignina.

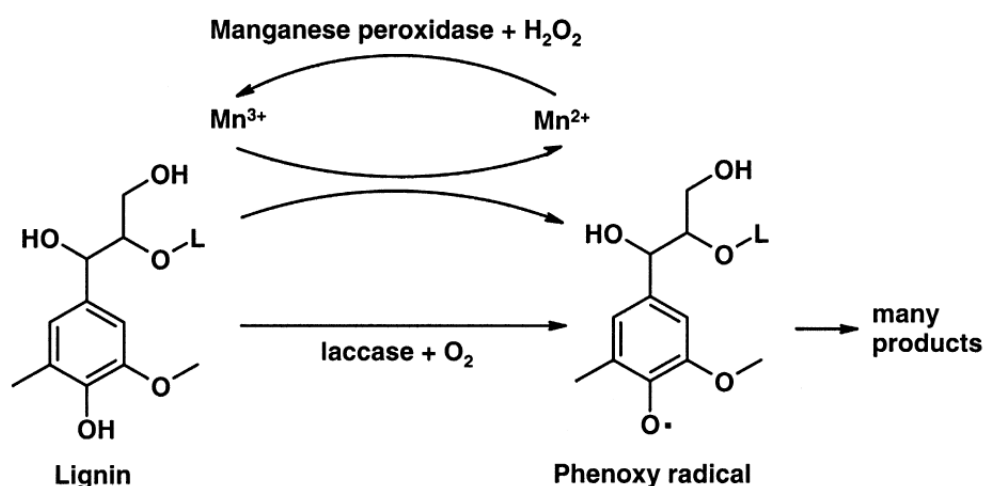


Fig 6. Reacciones simplificadas de la Manganosa Peroxidasa y Lacasa (tomado de Kirk y Kullen, 1998).

3.3 Aplicaciones Biotecnológicas de las enzimas ligninolíticas

El interés biotecnológico de los basidiomicetos se ha diversificado en los últimos años con relación a su capacidad para degradar lignina. La baja especificidad de los mecanismos que usan los hongos de pudrición blanca para transformar y mineralizar el polímero de lignina y otros compuestos aromáticos sustenta la base de la aplicabilidad biotecnológica de este tipo de hongos y de las enzimas del sistema ligninolítico (Cohen *et al.*, 2002). Una de las primeras aplicaciones biotecnológicas de los hongos de pudrición blanca fue la mejora de residuos agrícolas para el uso como alimento animal (Cohen *et al.*, 2002). Esta idea surgió

a principios del siglo pasado, y desde esta fecha se han realizado numerosos estudios hacia la mejora de la digestibilidad de residuos vegetales

Otra aplicación biotecnológica de los hongos de pudrición blanca es su utilización en la obtención de pulpa de papel a través de un proceso denominado biopulpeo. El pretratamiento con hongos del material lignocelulósico supone una alternativa al tratamiento químico de este material, dando lugar a un tipo de pulpa de papel denominada como biomecánica (Kirk *et al.*, 1992). Este pretratamiento supone una serie de ventajas energéticas, fisicoquímicas y medioambientales en la producción de este tipo de pasta (Akhtar *et al.*, 1998).

Una de las potenciales aplicaciones biotecnológicas de los hongos de podredumbre blanca está en el campo de la biorremediación. La biorremediación se define como el proceso de conversión de residuos peligrosos y contaminantes en compuestos menos tóxicos mediante el uso de las propiedades catalíticas de los organismos vivos, o bien en la reducción de estos contaminantes medioambientales a niveles no detectables o aceptables (Liu y Suflita, 1993; Pointing, 2001; Cohen *et al.*, 2002).

Finalmente, también se han desarrollado estudios de degradación y mineralización de compuestos xenobióticos en cultivos de fermentación en estado sólido. De esta manera se simularía la forma de colonización y el patrón de crecimiento de los hongos en el suelo. Estos experimentos se han llevado a cabo usando residuos lignocelulósicos como soporte para el crecimiento de estos hongos (Wolter *et al.*, 1997a; Wolter *et al.*, 1997b; Martens *et al.*, 1999).

3.4 Relevancia del presente trabajo

El presente trabajo propone el uso de la cepa silvestre TA-CMU aislada en el estado de Michoacán, cuya evidencia preliminar indicaba la producción de lacasas en medio con ácido tánico. Los principales objetivos estuvieron orientados a la correcta identificación de la cepa y su aplicación en procesos biotecnológicos basados en su alto potencial ligninolítico; los cuales están enfocados al tratamiento de residuos agrícolas así como a procesos de biorremediación a nivel industrial, como es el tratamiento de residuos generados durante el proceso de pulpeo así como en la detoxificación de agua residual papelera y en la degradación de distintos colorantes sintéticos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Akhtar, M., Blanchette, R. A., Myers, G., Kirk, T. K. (1998). An overview on biomechanical pulping research. En: Young, R. A. y Akhtar, M. (Eds). Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry. *TAPPI Press*. Atlanta.
- [2] Arantes, V., Ferreira-Milagres A. M. (2007). The synergistic action of ligninolytic enzymes (MnP and Laccase) and Fe^{3+} reducing activity from white-rot fungi for degradation of Azure B. *Enzyme and Microbial Technology*, 42:17-22.
- [3] Bommarius, A.S., Riebel, B. (2004). *Biocatalysis*. Atlanta, USA: Wiley-VCH Verlag GmbH y Co. KGaA.
- [4] Cohen, R., Persky L., Hadar, Y. (2002). Biotechnological applications and potential of wood degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58:582-594.
- [5] Dashtbanm, M., Schraft, H., Seyd, A.T., Qin, W. (2010). Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *International Journal Biochemistry Molecular Biology*, (1):36-50.
- [6] Fries, E. (1835). *Corpus Florarum provincialium Sueciae I. Floram Scanicam*, 349 p.
- [7] Hatakka, A. (1994). Lignin-modifying enzyme from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiology Reviews*, 13:125-135.
- [8] Johannes, C. (2000). Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2), 524-528.
- [9] Jönsson, L., Nyman, P. O. (1994). Tandem lignin peroxidase genes of the fungus *Trametes versicolor*. *Biochimica et Biophysica acta*, 1218(3):408-412.
- [10] Johansson, T., Nyman P. O. (1993). Isozymes of lignin peroxidase and manganese (II) peroxidase from the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*. I. Isolation of enzyme forms and characterization of physical and catalytic properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 300(1):49-56.
- [11] Johansson, T., Nyman, P. O., Cullen, D. (2002). Differential regulation of *mnp2*, a new manganese peroxidase- encoding gene from the ligninolytic fungus *Trametes versicolor* PRL 572. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4): 2077–2080.
- [12] Johansson, T., Welinder, K. G., Nyman, P. O. (1993). Isozymes of lignin peroxidase and manganese (II) peroxidase from the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*. II. Partial sequences, peptide maps, and amino acid and carbohydrate compositions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 300(1):57-62.

- [13] Justo, A., Hibbett, D. S. (2011). Phylogenetic classification of *Trametes* (Basidiomycota, Polyporales) based on a five-marker dataset. *Taxon*, 60(6): 1567-1583.
- [14] Karsten, P. A. (1881). Enumeratio Boletinearum et Polyporearum Fennicarum, systemate novo dispositarum. *Revue Mycologique*, Toulouse 3(9):16–19.
- [15] Kimura, S. Ikeda-Saito, M. (1988). Human myeloperoxidase and thyroid peroxidase, two enzymes with separate and distinct physiological functions, are evolutionarily related members of the same gene family. *Proteins*, 3, 113-120.
- [16] Kirk, T. K., Schultz, E., Cornnors, W. J., Lorenz, L. F., Zeikus, J. G. (1978). Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochate chrysosporium*. *Archives of Microbiology*, 117: 277-285.
- [17] Kotlaba, F., Pouzar, Z. (1957). On the classification of European pore fungi. *Ceska Mycol*, 11:152–170.
- [18] Liu, S., Suflita, J. M. (1993). Ecology and evolution of microbial populations for bioremediation. *Trends in Biotechnology*, 11:344-352.
- [19] Martens, R., Zadrazil, F. (1998). Screening of white-rot fungi for their ability to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Folia Microbiologica*, 43:97-103.
- [20] Murrill, W. A. 1905. The polyporaceae of North of America. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 32(7):358.
- [21] Nagai, M., Sato, T., Watanabe, H., Saito, K., Kawata, M., Enei, H. (2002). Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinus edodes*, and decolorization of chemically different dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60: 327-335.
- [22] Nakatani, M., Hibi, M., Minoda, M., Ogawa, J., Yokozeki, K., Shimuzu, S. (2010). Two laccase isoenzymes and a peroxidase of a comercial laccase-producing basidiomycete, *Trametes* sp. Ha1. *New Biotechnology*, 27: 2317 – 323.
- [23] Nikitina, O. V., Shleev, S. V., Gorshina, E. S., Rusinova, T. V., Serezhenkov, V. A., Burbaev, D. S., Belovolova, L. V., Yaropolov, A. I. (2005). Isolation and purification of enzymes from ligninolytic complex of the basidial fungus *Trametes pubescens* (Schumach.) Pilát and study of their properties. *Biochemistry (Mosc)*, 70(11):1274-1279.
- [24] Nobles, M. K. (1958). Cultural characters as a guide to the taxonomy and phylogeny of the Polyporaceae. *Canadian Journal of Botany* 36:883–926
- [25] Osono, T. (2007). Ecology of ligninolytic fungi associated with leaf litter decomposition. *Ecological Research*, 22:955-974.

- [26] Patouillard, N.T. (1900). Essai taxonomique sur les familles et les genres des Hymenomycetes. Reimpression, A Asher & Co. 1960, Leiden. 184 p.
- [27] Paszczyński, A., Huynh, V.B., Crawford, R. (1985). Enzymatic activities of an extracellular, manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiology Letters*.
- [28] Pointing S. B., Pelling A. L., Smith G. J. D., Hyde K. D., Reddy C. A. (2005). Screening of basidiomycetes and xylariaceous fungi for lignin peroxidase and laccase gene-specific sequences. *Mycology Research* 109 (1): 115–124.
- [29] Quélet, L. (1886). *Enchiridion Fungorum*. O. Doin, Paris, 352 p.
- [30] Sariaslani, F.S. (1989). Microbial enzymes for oxidation of organic molecules. *Critical Reviews in Biotechnology*, 9, 171-257.
- [31] Steffen, K.T. (2003). Degradation of recalcitrant biopolymers and polycyclic aromatic hydrocarbons by litter-decomposing basidiomycetous fungi. Bachelor thesis. Division of Microbiology Department of Applied Chemistry and Microbiology Viikki Biocenter, University of Helsinki Finland. 69 p.
- [32] Sun, X., Zhang, R., Zhang, Y. (2004). Production of lignocellulolytic enzymes by *Trametes gallica* and detection of polysaccharide hydrolase and laccase activities in polyacrylamide gels. *Journal of Basic Microbiology*, 44(3):220-231.
- [33] Suzuki, T., Endo, K., Ito, M., Tsujibo, H., Miyamoto, K., Inamori, Y. (2003). A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: purification, characterization, nucleotide sequence and expression. *Bioscience and Biochemical Biotechnology*, 67(10), 2167-2175.
- [34] Temp, U., Eggert, C. (1999). Novel Interaction between fungal laccase and cellobiose dehydrogenase during Pigment Synthesis in the white rot fungus *Pleurotus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 65(2), 389-395.
- [35] Thurston, C. F. (1994). The struct Johansson T., Nyman PO. 1993. Isozymes of lignin peroxidase and manganese (II) peroxidase from the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*. I. Isolation of enzyme forms and characterization of physical and catalytic properties. *Arch Biochem Biophys*, 300(1):49-56.
- [36] Welinder, K.G. (1992) Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology*, 2, 388-393.
- [37] Woolridge, E.M. (2014). Mixed Enzyme Systems for Delignification of Lignocellulosic Biomass. *Catalysts*4, 1-35.

- [38] Wolter, M., Zadrazil, F., Martens, R., Bahadir, M. (1997). Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by white rot fungi. En: Rosen D, Tel-Or E, Hadar Y, and Chen Y. (Eds). *Modern agriculture and the Enviroment*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.

IV. HIPÓTESIS

La cepa TA-CMU secreta las principales enzimas ligninolíticas extracelulares las cuales son capaces de actuar eficientemente sobre sustratos orgánicos diversos, incluyendo residuos agrícolas y xenobióticos.

V. OBJETIVOS

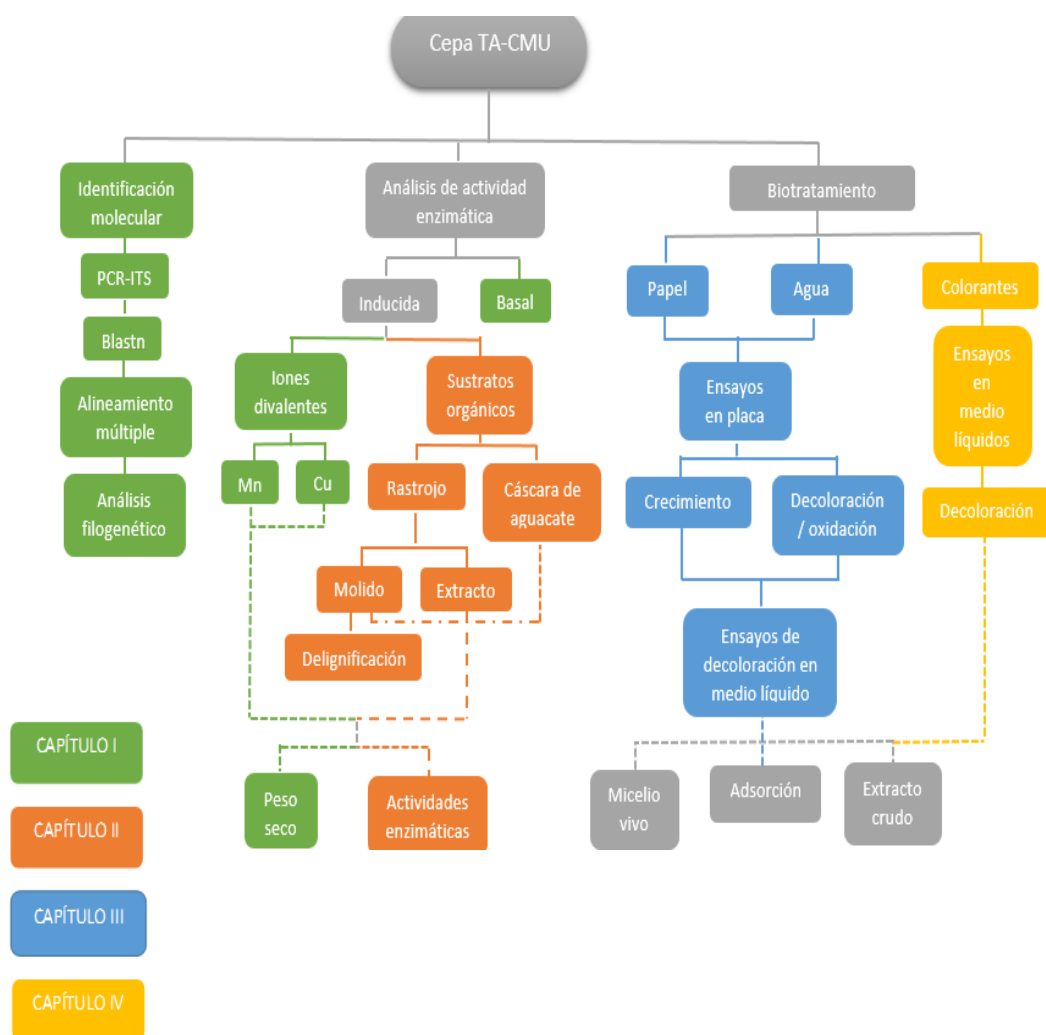
5.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar a la cepa TA- CMU, evaluar su capacidad para producir las principales enzimas ligninolíticas y probar su potencial para procesar sustratos orgánicos.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- i. Establecer las relaciones filogenéticas de la cepa TA-CMU.
- ii. Analizar la actividad de las tres principales enzimas ligninolíticas en la cepa TA-CMU en distintas condiciones de cultivo.
- iii. Determinar el proceso de delignificación de rastrojo de maíz (*Zea mays*) por parte de la cepa TA-CMU.
- iv. Analizar la capacidad oxidativa de la cepa TA-CMU y su complejo de enzimas ligninolíticas para el biotratamiento de residuos provenientes de la industria papelera.
- v. Evaluar el potencial de la cepa TA-CMU y su complejo de enzimas ligninolíticas para el biotratamiento de distintos colorantes sintéticos.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



VI. RESULTADOS

CAPÍTULO 1

6.1 IDENTIFICACIÓN GENÉTICO MOLECULAR DE LA CEPA TA-CMU Y ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS

Erick Magaña-Ruiz^a, Ma. Soledad Vázquez-Garcidueñas^b, Gerardo Vázquez-Marrufo^a

^aCentro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. ^bDivisión de Estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. E-mail: gvazquezmarrufo@yahoo.com.mx

RESUMEN

Trametes es un género de hongos cosmopolitas ubicado dentro del grupo de los hongos de pudrición blanca. Aunque *Trametes* es uno de los géneros más estudiados dentro de los poliporales, las relaciones taxonomicas a nivel de especie no están claramente definidas. Mediante el análisis de la región interespaciadora (ITS) de la Unidad Ribosomal Nuclear se evaluaron las relaciones filogenéticas de la cepa silvestre TA-CMU, aislada en el estado de Michoacán. El análisis Blastn en el Genbank mostró valores máximos de identidad (95% o más) con regiones ITS de especies del género *Trametes*. Con las secuencias ITS extraídas del Genbank se generó un patrón de agrupamiento que ubicó a la cepa TA-CMU dentro de un solo clado junto con otras cepas de *T. versicolor* de distintas regiones geográficas. Se evaluó la producción de enzimas ligninolíticas extracelulares por parte de la cepa TA-CMU y el efecto de dos metales divalentes (Cu^{+2} y Mn^{+2}) sobre dichas actividades. El cobre provocó un incremento de la actividad enzimática de lacasa al pasar de un valor basal de 82.48 U L^{-1} a 490.5 U L^{-1} , de MnP al pasar de un valor basal de 13.62 U L^{-1} a 94.6 U L^{-1} , pero no de LiPs al pasar de un valor basal de 40.71 U L^{-1} a 17.88 U L^{-1} . El manganeso no incrementó de manera significativa dichas actividades enzimáticas. La mayor actividad enzimática observada se detectó en la lacasa extracelular con un incremento fue de hasta seis veces. Por otro lado, los iones metálicos no influyeron significativamente en el aumento de biomasa.

Palabras clave: *Trametes*, ITS, iones metálicos divalentes, lacasa, Mn-Peroxidasa, lignin-peroxidasa.}

ABSTRACT

Trametes is a genus of cosmopolitan fungi located within the group of white rot fungi. Although *Trametes* is one of the most studied genera within poliporales, the taxonomic relationships at the species level are not clearly defined. By analyzing the nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS), the phylogenetic relationships of the wild strain TA-CMU, isolated in the state of Michoacan were evaluated. BLASTN analysis from the Genbank showed a 95% or more of identity with ITS regions of species within the genus *Trametes*. ITS sequences taken from Genbank were used to generate a clustering pattern, which placed the TA-CMU strain within a single clade together with other strains of *T. versicolor* from different geographical regions. The production of extracellular ligninolytic enzymes by the strain TA-CMU and the effect of two divalent metals (Cu^{+2} and Mn^{+2}) on those activities were evaluated. Copper resulted in increased the enzymatic activity of laccase going from 82.48 U L^{-1} to 490.5 U L^{-1} , MnP going from 13.62 U L^{-1} to 94.6 U L^{-1} but not in the case of LiPs. Manganese did not significantly increase such enzymatic activities. The highest enzymatic activity observed was the extracellular laccase activity, increasing up to six times. Furthermore, metal ions did not significantly affect the increased biomass.

Keywords: *Trametes*, ITS, divalent metal ions, laccase, Mn peroxydase, lignin peroxidase.

INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Trametes* (Polyporales, Basidiomycota) están presentes en casi todos los ecosistemas forestales y se encuentran con frecuencia habitando árboles de diferentes géneros, incluyendo los considerados forestalmente como de “maderas duras” en todo los bosques templados del hemisferio norte (Gilbertson y Ryvarden 1987). Estos hongos juegan un papel importante en los ecosistemas naturales como descomponedores de madera y muestran un enorme potencial para la biorremediación y biodegradación de distintos sustratos. Las especies del género *Trametes* se caracterizan por presentar basidiocarpos sésiles pilados (figura 1), un sistema hifal trimítico, esporas suaves que no son ni dextrinoides ni amiloides, carecer de cistídios verdaderos, así como por participar en la pudrición de madera dentro del grupo de hongos de pudrición blanca (Ryvarden 1991).

Aunque *Trametes* es uno de los géneros dentro de los poliporales más estudiados, su taxonomía a nivel de especie no está del todo definida con claridad.

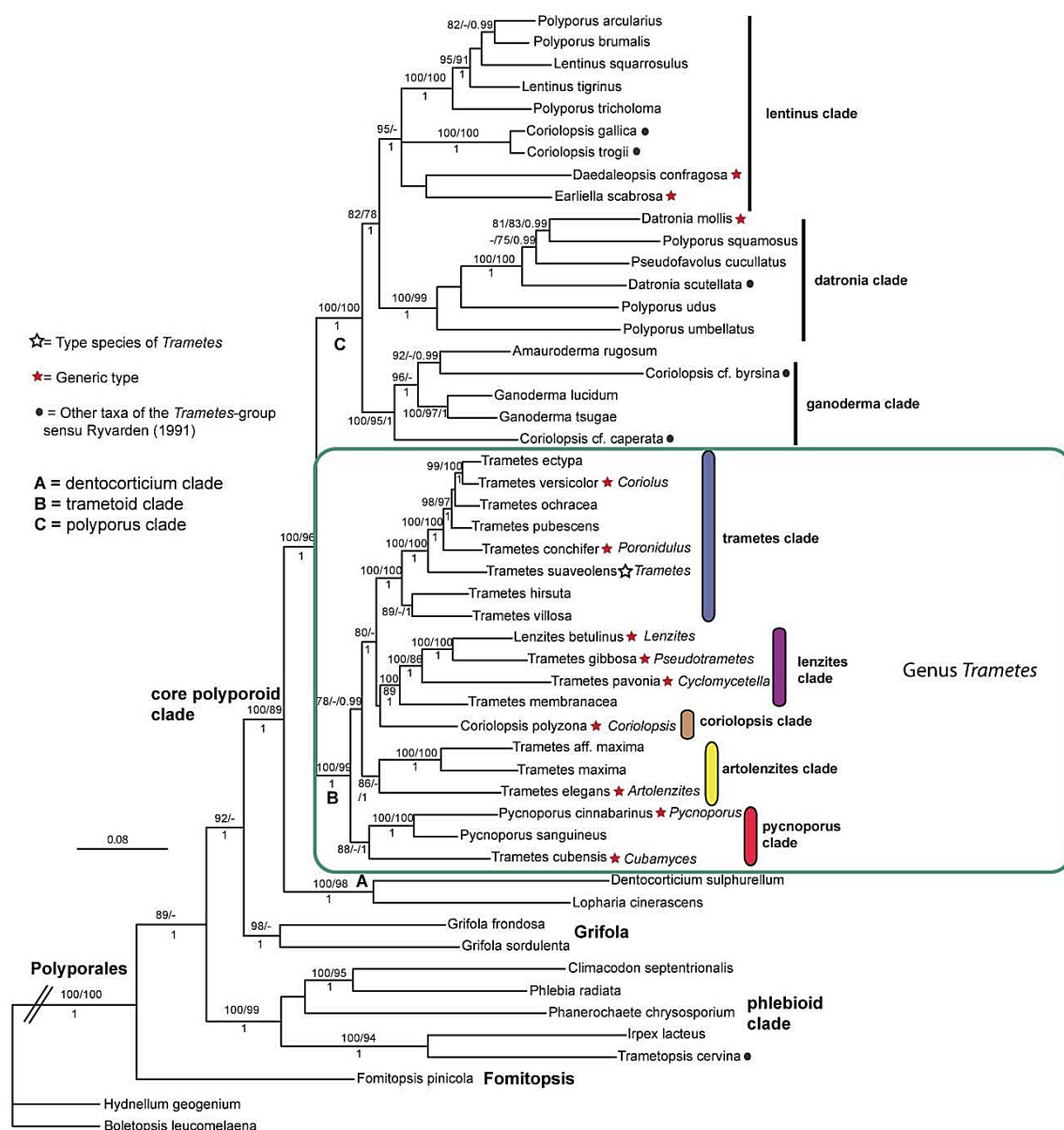
Figura 1. Morfología de *Trametes versicolor* (tomado de MacGillivray, 2013)



Los primeros análisis moleculares de *Trametes* y géneros relacionados fueron llevados a cabo por Hibbett y Donoghue (1995) y Ko y Jung (1999); quienes contribuyeron significativamente a entender la estructura y filogenia de la familia Polyporaceae, basándose en ADN mitocondrial de la subunidad ribosomal pequeña. Ko (2000), empleó la subunidad pequeña de RNA ribosomal mitocondrial (mt SSU rDNA) y la región interespaciadora (ITS) para dividir a la familia Polyporaceae en dos subgrupos, el clado de *Trametes* y el clado de *Cerrena*. Más tarde Rajchenberg (2011) sugirió un sustento morfológico y citológico para el grupo *Lenzites-Coriolopsis-Pycnoporus-Trametes* en base a su comportamiento nuclear, tetrapolaridad y sistema hifal trimítico. Tomšovský y colaboradores (2006) ya han reconocido un clado principal de *Trametes* para un grupo pequeño de especies mejor representativas del género *Coriolus*. Welti y colaboradores (2012), reconocen que es necesaria una comparación de características morfológicas y filogenéticas para poder distinguir a distintas especies dentro de género *Trametes*. La región ITS es el marcador

molecular más utilizado para la delimitación de especies de hongos, pero se ha demostrado que tiene una variación molecular baja en *Trametes* resultando en filogenias mal resueltas para algunas de las especies y en límites de las especies poco claras, especialmente en el complejo de especies de *T. versicolor* (*T. versicolor* sensu stricto, *T. ochracea*, *T. pubescens*, *T. ectypa*) (Carlson *et al.*, 2014) (figura 2).

Figura 2. Relaciones filogenéticas del género *Trametes* empleando los genes nLSU, ITS, RPB1, RPB2 y TEF1 (tomado de Justo y Hibbert, 2011).



A la fecha se han descrito más de 70 especies dentro del género (CABI Bioscience, CBS & Landcare Research, Index Fungorum, 2014), las cuales presentan una amplia distribución mundial encontrándose principalmente en bosques mesófilos de montaña. El conocimiento de la diversidad de hongos en México es aún incipiente, aunque se estiman

cerca de 200 000 especies (Aguirre-Acosta *et al.*, 2014). De acuerdo con Cifuentes (2008), en México, se han descrito 35 géneros y 111 especies de basidiomicetos ubicados dentro de la Familia Polyporaceae, de los cuales *T. cervina* (Schwein.) Bres., 1903, *T. cingulata* Berk., 1854, *T. cubensis* (Mont.) Sacc., 1891, *T. drummondii* (Klotzsch) Ryvarden, 1976, *T. ectypa* (Berk. & M.A. Curtis) Gilb. & Ryvarden, 1987, *T. hirsuta* (Wulfen) Pilát, 1939, *T. incerta* (Curr.) Cooke., 1886, *T. marianna* (Pers.) Ryvarden, 1973, *T. máxima* (Mont.) A. David & Rajchenb., 1985, *T. membranacea* (Sw.) Kreisel, 1971, *T. modesta* (Kunze ex Fr.) Ryvarden, 1972, *T. pavonia* (Hook.) Ryvarden, 1972, *T. pubescens* (Schumach.) Pilát, 1939, *T. suaveolens* (L.) Fr., 1838, *T. versicolor* (L.) Lloyd, 1921 y *T. villosa* (Sw.) Kreisel, 1971, pertenecen al género *Trametes*. En el estado de Michoacán se han descrito a las especies *Trametes cervina* (Schw.) Bres, *Trametes elegans* (Sprengel., Fries) Fries, *Trametes hirsuta* (Wulf.:Fr.) Pilat. = *Coriolus hirsutum* (Wulf: Fr.) Quél., *Trametes hispida* (Bagl.) Fr., *Trametes versicolor* (Fr.) Pilat. = *Polyporus versicolor* L: Fr. y *Trametes villosa* (Fr.) Kreisel.

En distintas especies del género *Trametes* se ha estudiado la producción o el incremento de la actividad de las principales enzimas ligninolíticas bajo la acción de distintos inductores orgánicos e inorgánicos así como iones metálicos divalentes (Baldrian, 2004; Yamanaka *et al.*, 2008; Cho *et al.*, 2009, Viswanath *et al.*, 2014). Por ejemplo, se han reportado cepas de *T. hirsuta*, *T. trogii*, *T. versicolor* y *T. pubescens* (MB89) productoras de lacasas extracelulares pero no de LiPs ni de MnPs (Baldrian, 2004; Couto y San Román, 2005; Osma *et al.*, 2006; Strong, 2001; Moldes *et al.*, 2012). Sin embargo existen reportes en la literatura de distintas cepas de *Trametes versicolor*, así como otras de *T. villosa* y *T. pubescens* en las cuales se han detectado las actividades enzimáticas de las tres principales enzimas del complejo ligninolítico (Casieri *et al.*, 2007; Yamanaka *et al.*, 2008; Winqvist *et al.*, 2008).

En nuestro grupo de trabajo se aisló a la cepa TA-CMU encontrándose que ésta producía de manera basal lacasa extracelular, la cual incrementaba sus niveles de actividad en presencia de rastrojo de maíz y cobre (Arredondo-Santoyo *et al.*, datos no publicados). Tampoco se ha determinado aún la producción de lignin peroxidasa y peroxidasa dependiente de Mn. La presencia de las tres principales enzimas relacionadas con la degradación de lignina en la cepa TA-CMU incrementaría el potencial biotecnológico de ésta, haciendo factible su aplicación en procesos industriales de importancia regional como el biopulpeo y la detoxificación ambiental, entre otros. Dado que dicha cepa es un aislado

silvestre del estado de Michoacán, es factible que cualquier desarrollo biotecnológico derivado de su estudio sea sujeto de patentes que beneficien a la entidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa de estudio

Se estudió la cepa TA-CMU de *Trametes* sp. aislada en el municipio de Pátzcuaro del estado de Michoacán y depositada en el Cepario Michoacano Universitario del CMEB-UMSNH.

Medios de cultivo

Se utilizó el medio sólido agar de dextrosa y papa (PDA, Difco™, USA) para el mantenimiento de la cepa y la obtención de inóculos para los ensayos de cinética enzimática. El medio se preparó de acuerdo a las instrucciones del proveedor y posteriormente se esterilizó a 121°C y 15 lbs/in² durante 15 minutos.

Para la realización de cinéticas de crecimiento y determinación de actividad enzimática en medio líquido se empleó el medio completo de caldo papa dextrosa (PDB Difco™, USA) y para los ensayos en sustrato sólido se empleó el medio completo de agar extracto de malta (EMA, Difco™, USA), los cuales se prepararon de acuerdo a las instrucciones del proveedor y se esterilizó de la manera previamente descrita.

Obtención de inóculos

Se incubó la cepa TA-MU de *Trametes* sp. en placas de PDA de 6 mm de diámetro a 28°C para la generación de inóculos (Yamanaka *et al.*, 2008). Se permitió el desarrollo del micelio hasta que cubrió $\frac{3}{4}$ partes de la superficie del medio de cultivo y posteriormente se removieron del límite de la colonia inóculos con un sacabocados de 6 mm de diámetro, los cuales fueron utilizados para los ensayos en medio líquido.

Métodos genético moleculares

Extracción de ADN

El ADN genómico se extrajo de micelio cultivado por siete días sobre medio sólido PDA. Se recuperó el micelio y se congeló con N₂ líquido, se levigó en mortero hasta pulverizarlo, transfiriéndose a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Se adicionaron 500 µL de buffer de lisis (SDS 2%; NaCl 100 mM; EDTA 50 mM; Tris-HCl-pH 8 100 mM) y se agitó en vórtex vigorosamente durante 1 minuto. Se incubó a 60°C por 30 minutos, agitando en vórtex cada 10 minutos. Posteriormente se agregaron 500 µL de fenol/cloroformo (1:1 v/v) agitándose en vortex por 3 minutos y centrifugándose a 1 500 g durante 10 minutos. Se transfirió la fase acuosa (sobrenadante) a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, adicionando 1 unidad de RNAsa e incubando a 37°C por 30-40 min. Se precipitó el ADN con un volumen equivalente de isopropanol frío y se incubó a -20°C por 60 minutos. Se centrifugó de la manera previamente descrita, se desechó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 250 µL de etanol al 70%. Se desechó el etanol y se dejó secar la pastilla a 30°C. La pastilla seca se resuspendió en un volumen de 25 µL de agua desionizada esterilizada. El ADN obtenido se almacenó a -20°C para uso posterior.

Ensayos de PCR

Para el ensayo de amplificación de la región ITS (ITS1-5.8S-ITS2) de la Unidad Ribosomal nuclear se empleó el par de oligonucleótidos ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC -3') (White *et al.*, 1990). Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 25 µL. La composición de la mezcla de reacción fue: buffer Tris-HCl 10 mM, pH 8.0; MgCl₂ 1.5 mM; dNTP's 0.2 mM para cada uno de los oligos; 5 U de *Taq* DNA polimerasa recombinante (Invitrogen, USA), 2.5 ng totales de ADN templado; el volumen final se ajustó a 25 µL con agua desionizada esterilizada. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Palm-Cycler™ Gradient Thermal Cycling (R Corbett Life Science, USA) mediante el siguiente protocolo de amplificación: un clico inicial de desnaturalización a 95°C por 5 minutos seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 minuto, alineamiento 55°C por 1 minuto y extensión 72°C por 2 minutos, con una extensión final a 72°C a 10 min.

Los productos obtenidos se analizaron en geles de agarosa (1.5% p/v) teñidos con 0.75 µL de Syber Safe (Invitrogen, USA). Los productos de PCR (650 pb) fueron secuenciados por Elim Biopharmaceuticals, Inc. (USA)

Análisis de secuencias

Para la visualización del electroferograma se utilizó el programa Chromas Lite 2.1.1. Las secuencias fueron editadas a mano para remover ambos extremos en los cuales no era posible identificar los nucleótidos correspondientes. Una vez editada la secuencia, ésta fue comparada con aquellas depositadas en el GenBank utilizando el software de comparación entre secuencias BLAST (Altschul *et al.* 1997) disponible en el sitio de internet National Center for Biotechnology Information (NCBI, USA). Se seleccionaron aquellas secuencias que mostraron un mayor porcentaje de identidad y un menor valor de E con la secuencia del producto de amplificación aquí obtenido. Con las secuencias seleccionadas se realizó un alineamiento múltiple con ayuda del programa MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2011).

Dicho alineamiento se empleó para el cálculo de las distancias genéticas y la construcción del árbol filogenético. Las distancias genéticas entre las secuencias analizadas se calcularon empleando el modelo de sustitución de nucleótidos Kimura de 2 vías con una distribución gamma de 4. Los valores obtenidos de dicho análisis se utilizaron para construir el árbol filogenético mediante el criterio Neighbor Joining. La significancia estadística fue evaluada con un bootstrap de 1000 repeticiones. Todos los cálculos anteriores se realizaron empleando el paquete MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2011)

Cultivo en medio líquido

Los cultivos en medio líquidos de la cepa TA-CMU se realizaron en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 25 mL de medio PDB. Dicho medio fue inoculado con tres cilindros de 6 mm de diámetro obtenidos de la manera previamente descrita. Los cultivos así inoculados se incubaron a 28 °C y 120 rpm. El crecimiento se determinó midiendo el peso seco a distintos tiempos de incubación, mientras que para la determinación de las actividades enzimáticas que se describen posteriormente se tomaron alícuotas del medio extracelular en campana de flujo laminar. Tanto las cinéticas de crecimiento como las de actividad se realizaron en tres ensayos independientes por triplicado y el resultado de las mediciones fue promediado, obteniéndose la desviación estándar para cada punto de la curva de crecimiento. En el caso de los ensayos de inducción de la actividad enzimática, los cultivos se suplementaron con CUSO_4 y MnSO_4 a una concentración de 150 μM . Para evaluar si las diferencias en la producción de biomasa en cada punto de la cinética eran significativas se realizó un análisis ANOVA y una prueba a Tukey ($p < 0.05$) empleando el paquete Prism 3.0.

Determinación de la actividad de lacasa extracelular

La determinación de actividad enzimática de lacasa extracelular se realizó cuantificando la formación del catión ABTS⁺ de acuerdo a Nagai *et al.* (2002). La mezcla de reacción se preparó de la siguiente manera: 800 μL de buffer de fosfatos pH 4 (0.1 M de ácido cítrico, 0.2 M de fosfato de sodio dibásico), 100 μL de ABTS 1M (2, 2'- azino-bis (3-etilbenztiazolina-6-sulfonato) y 100 μL del sobrenadante del medio de cultivo centrifugado; para ello se tomó una alícuota de 300 μL del medio de cultivo el cual se centrifugó a 1 500 x g durante 10 minutos. La mezcla de reacción se incubó a 30°C durante 20 min al término de los cuales se agregaron 100 μL de TCA (ácido tricloro acético 5% (v/v) para detener la reacción. La actividad enzimática fue cuantificada espectrofotométricamente a 420 nm, utilizando el valor de ϵ del ABTS de 36 M⁻¹cm⁻¹.

Determinación de la actividad de lignin peroxidasa

La actividad enzimática de LiP se determinó cuantificando la oxidación del alcohol veratrílico a veratraldehído de acuerdo a Tien y Kirk (1988). La mezcla de reacción contenía 700 μL de buffer de tartratos 0.3 mM pH 2.5; 50 μL de alcohol veratrílico 10 mM, 50 μL de peróxido de hidrógeno 5 mM como iniciador de la reacción enzimática y 200 μL del sobrenadante del medio de cultivo centrifugado como se describió previamente. La mezcla de reacción se incubó a 25°C durante 2 minutos. La actividad enzimática fue cuantificada espectrofotométricamente a 310 nm, utilizando el valor de ϵ del veratraldehído de 9,3 M⁻¹cm⁻¹.

Determinación de la actividad de manganeso peroxidasa

La actividad enzimática de MnP se determinó cuantificando la formación del complejo tartrato de manganeso de acuerdo a Pascynski *et al.* (1985). La mezcla de reacción contenía 500 μL de buffer de tartrato de sodio 0.1 mM pH 5; 75 μL de MnSO₄ 10 mM, 75 μL de 2,6-dimetoxifenol 10 mM, 50 μL de peróxido de hidrógeno 5 mM como iniciador de la reacción enzimática y 300 μL del sobrenadante del medio de cultivo centrifugado como se describió previamente. La mezcla de reacción se incubó a 25°C durante 2 minutos. La actividad enzimática fue cuantificada espectrofotométricamente a 334 nm, utilizando el valor del ϵ del tartrato de manganeso de 18,3 M⁻¹cm⁻¹.

Cálculo de los valores de actividad enzimática

Para el cálculo de la actividad enzimática se empleó la siguiente fórmula:

$$AE = \frac{(Abs.)(VT)}{(\varepsilon)(Vm)}$$

Donde, la actividad enzimática (AE) es igual al producto de la absorbancia de la mezcla de reacción (Abs) por el volumen total de la muestra (VT) dividido entre el producto del coeficiente de extinción molar del cromóforo (ε) por el volumen del sobrenadante del medio de cultivo adicionado a la mezcla de reacción (Vm).

RESULTADOS

Relaciones genéticas de la cepa TA-CMU

Se amplificó la región ITS de la Unidad Ribosomal nuclear de la cepa de estudio, obteniéndose una secuencia de 674 pb libre de indeterminaciones. El análisis Blastn mostró una máxima identidad con secuencias ITS de cepas de *Trametes versicolor* del 86%. Se realizó un análisis filogenético como se describe en Materiales y Métodos, obteniéndose el patrón de agrupamiento que se muestra en la figura 3.

Como se puede observar, la cepa TA-CMU se agrupa con distintos aislados geográficos de *T. versicolor*, en un subgrupo que es soportado por un valor bootstrap del 100%, apartándose del resto de las especies del género incluídas en el análisis. Las tres cepas incluídas en el clado junto con TA-CMU provienen de distintas regiones de China.

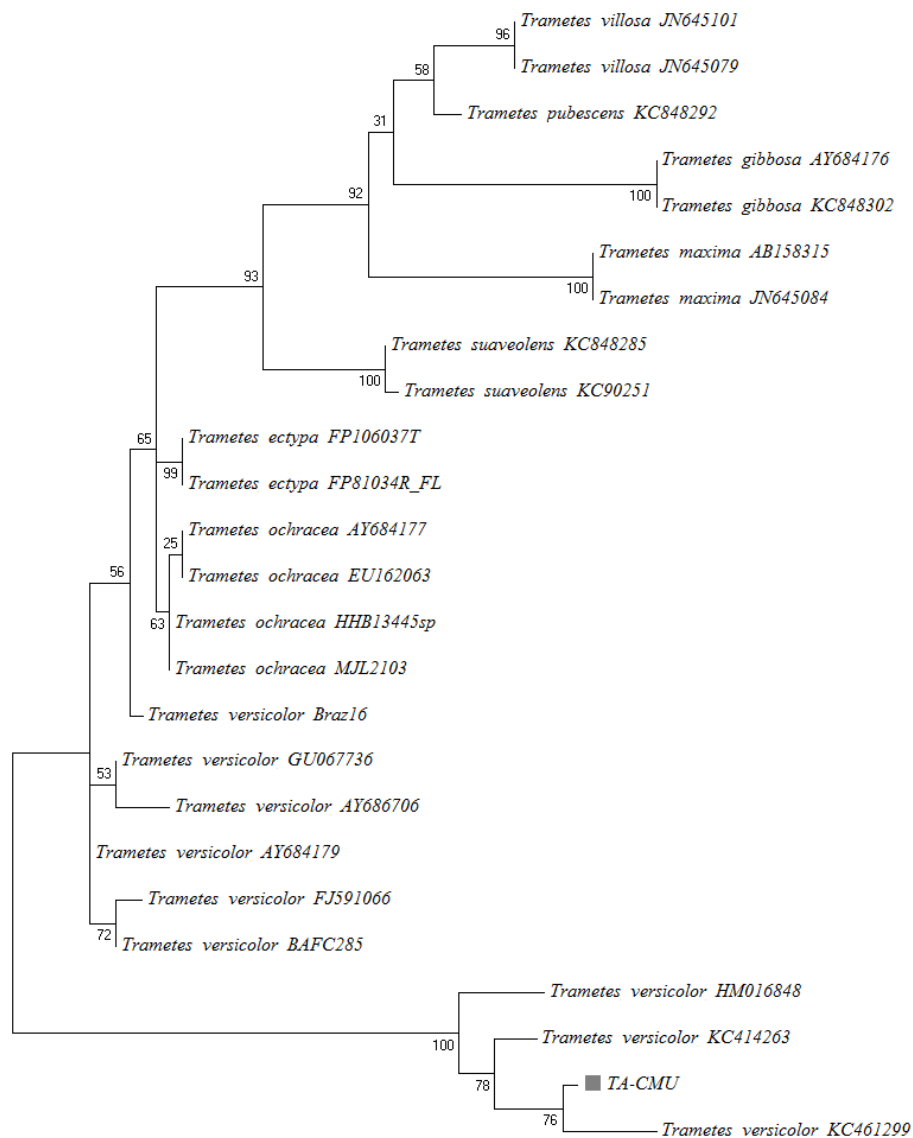


Figura 3. Análisis filogenético de la cepa TA-CMU. Se muestra el patrón de agrupamiento de la secuencia ITS de la Unidad Ribosomal de la cepa TA-CMU con aquellas secuencias extraídas del GenBank que mostraron máxima identidad con la secuencia de estudio, de acuerdo al análisis Blastn.

Cinéticas de crecimiento en medio líquido y actividad enzimática de ligninasas

Ésta cinéticas se realizaron de la manera anteriormente descrita, determinándose el aumento de biomasa en medios de cultivos adicionados con CUSO_4 y MnSO_4 150 μM (Figura 4). La cinética de crecimiento de la cepa TA-CMU en medio PDB con CUSO_4 y MnSO_4 150 μM no presentó variaciones significativas con respecto a la cinética control, en ausencia de los iones metálicos. La fase logarítmica de crecimiento comenzó al tercer día de incubación y se prolongó hasta el séptimo día en donde entra a fase estacionara.

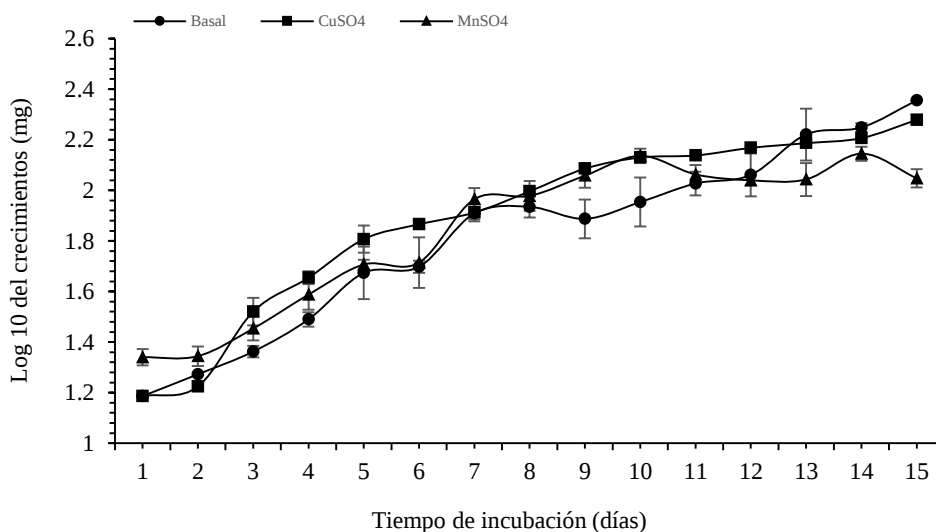


Figura 4. Cinética de crecimiento de la cepa silvestre TA-CMU de *T. versicolor* en medio líquido PDB basal y adicionado CuSO_4 y MnSO_4 a $150 \mu\text{M}$. La cepa se incubó a 28°C y 120 rpm, determinándose el aumento de biomasa (peso seco) gravimétricamente.

En la figura 5 se puede observar la actividad enzimática de lacasa, LiP y MnP en medio basal PDB. La actividad enzimática de LiP mostró valores altos desde el primer día de incubación llegando al máximo hacia el quinto día con un valor 40.71 U L^{-1} al sexto día. En el caso de las MnPs, se observa desde el comienzo de la cinética una mayor actividad que continúa su incremento hasta un máximo de 13.62 U L^{-1} al noveno día. En el caso de la actividad enzimática de lacasa se observa un primer incremento de actividad al quinto día y un máximo de actividad de 82.48 U L^{-1} hacia el noveno día de la cinética.

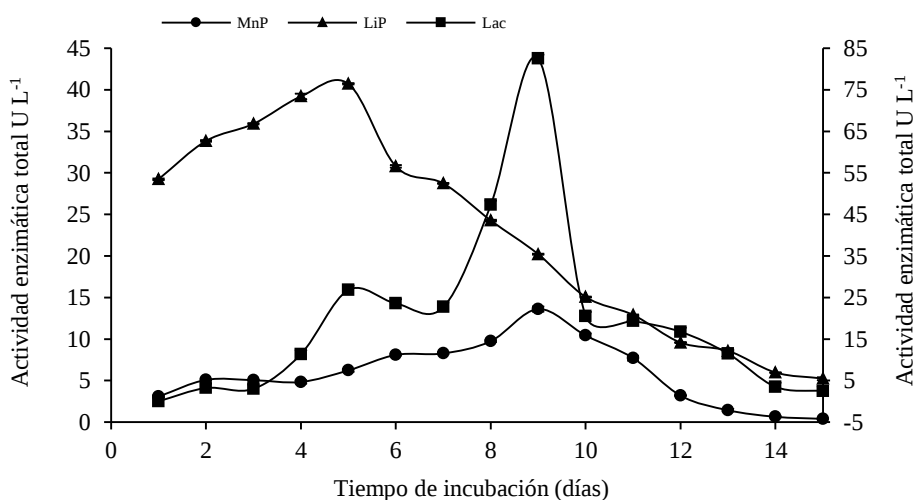


Figura 5. Actividad enzimática basal de enzimas ligninolíticas de la cepa silvestre TA-CMU de *T. versicolor*. Las actividades de LiP y MnP aparecen graficadas en el eje primerio (izquierda), y la de lacasa en el eje secundario (derecha). Los cultivos se incubaron en medio basal PDB a 28°C y 120 rpm.

La actividad enzimática de ligninasas se determinó también con en medio PDB adicionado con CuSO_4 (Figura 6). Durante los primeros seis días de incubación la actividad de LiP es prácticamente cero, a partir del séptimo día se detecta actividad la cual incrementa paulatinamente llegando al pico máximo de actividad de 17.85 U L^{-1} al noveno cuarto día. En cuanto a la actividad de MnP, ésta mostró incremento desde el segundo día de incubación hasta el cuarto día, para poseteriormente alcanzar su máximo de 94.66 U L^{-1} al sexto día de incubación. En el caso de la actividad de lacasa extracelular, la actividad mostró un máximo de actividad de 490.51 U L^{-1} al noveno día de incubación, manteniéndose así dos días subsecuentes para decaer rápidamente hasta un valor de 14.89 U L^{-1} .

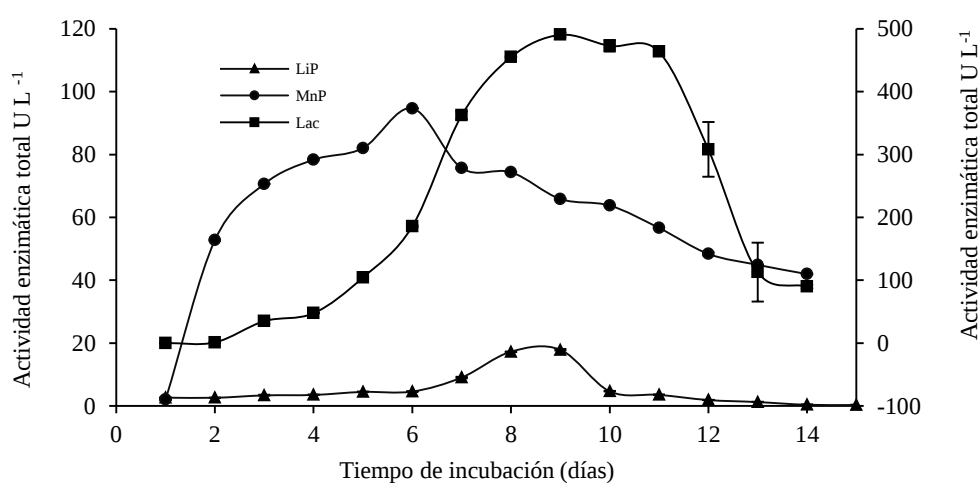


Figura 6. Actividad de enzimas ligninolíticas de la cepa silvestre TA-CMU de *T. versicolor*. Los cultivos se incubaron en medio basal PDB CuSO_4 , $150 \mu\text{M}$ a 28°C y 120 rpm . Las actividades de LiP y MnP aparecen graficadas en el eje primerio (izquierda), y la de lacasa en el eje secundario (derecha).

La actividad enzimática de ligninasas se determinó también con en medio PDB adicionado con MnSO_4 (Figura 7). Durante los primeros ocho días de incubación la actividad de LiP es prácticamente cero, a partir del noveno día se detecta actividad la cual incrementa paulatinamente llegando al pico máximo de actividad de 20.72 U L^{-1} al décimo cuarto día. En cuanto a la actividad de MnP, ésta mostró incremento desde el segundo día de incubación hasta el sexto día, manteniéndose en ese nivel dos días más para poseteriormente alcanzar su máximo de 82.04 U L^{-1} al décimo día de incubación. En el caso de la actividad de lacasa extracelular, la actividad mostró un máximo de actividad de 93.25 U L^{-1} al sexto día de incubación con una caída rápida al siguiente día hasta un valor de 26.89 U L^{-1} .

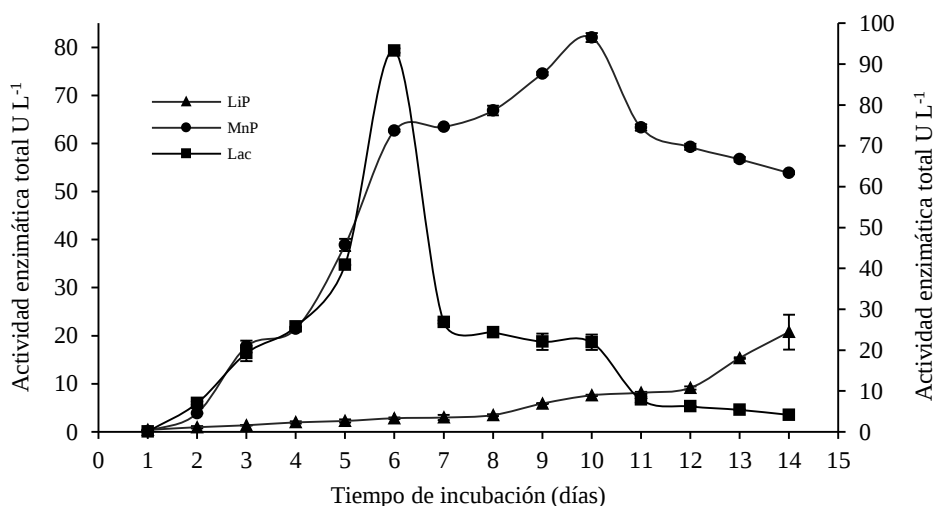


Figura 7. Actividad de enzimas ligninolíticas de la cepa silvestre TA-CMU de *T. versicolor*. Los cultivos se incubaron en medio basal PDB MnSO₄, 150 μ M a 28°C y 120 rpm. Las actividades de LiP y MnP aparecen graficadas en el eje primario (izquierda), y la de lacasa en el eje secundario (derecha).

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se seleccionó un aislado silvestre, la cepa TA-CMU, de un basidiomicete nativo del estado de Michoacán el cual mostraba potencial oxidativo para decolorar estructuras polifenólicas al ser incubado en medio sólido en presencia de ácido tánico. Un primer interés de éste trabajo fue determinar las afinidades taxonómicas de la cepa TA-CMU, la cual había sido previamente clasificada dentro del género *Trametes* (Arredondo-Santoyo, datos no publicados). Zhao y colaboradores (2011) anteriormente habían dilucidado las relaciones genéticas en el género *Trametes* a través las secuencias del Inrterespaciador Interno Transcrito de la Subunidad Ribosomal Nuclear Pequeña (ITS). Por tal motivo se analizó la secuencia ITS de la cepa aquí estudiada y se comparó con secuencias ITS de otras cepas de *T. versicolor* ahí depositadas. Las especies empleadas para la construcción de la filogenia fueron seleccionadas con base a los trabajos de Tomššovský (2008) y Justo y Hibbet (2011), quienes han establecido con base en el análisis filogenético molecular las afinidades entre especies del género y géneros relacionados dentro de los poliporales. En particular estos últimos autores analizan la filogenia de *Trametes* y géneros relacionados empleando la región ITS y otros cuatro marcadores genéticos, concluyendo que el interespaciador es un buen marcador para diferenciar al complejo *T. versicolor* del resto de especies dentro del género. No obstante, para resolver las afinidades taxonómicas en el grupo o complejo de especies asociadas a *T. versicolor*, que incluye a *T. ectypa*, *T. ochracea* y *T. pubescens*, es necesario emplear en marcadores genéticos, morfológicos y biológicos (intercompatibilidad); que sugieren, en conjunto, que los grupos dentro de este complejo (*T.*

versicolor, *T. ectypa*, *T. ochracea* y *T. pubescens*) son especies biológicas distintas o se encuentran en proceso de especiación.

El patrón de agrupamiento generado ubica a la cepa TA-CMU dentro de un solo clado junto con otras 10 cepas de *T. versicolor*. El hecho de que la cepa TA-CMU se agrupe con un alto valor bootstrap con otras cepas de *T. versicolor* de distintas regiones geográficas indica claramente que, no obstante que dicho taxa parece estar formado por un complejo de especies, la cepa aquí estudiada es *T. versicolor*. Aunque es posible utilizar otro marcador genético para obtener información filogenética adicional de la cepa TA-CMU, como el gen de la segunda subunidad más grande de la RNA polimerasa II (RPB2), los antecedentes delineados anteriormente por Justo y Hibbet (2011) y los resultados obtenidos con la región ITS en este trabajo indican que muy probablemente la resolución filogenética no aumentará significativamente, ya que habría que realizar un análisis de intercompatibilidad con tal fin. Debido a que la cepa TA-CMU fue obtenida de materia orgánica en descomposición y no de un basidiocarpo, el análisis morfológico con fines taxonómicos no es posible. No obstante, ni en México, ni en el estado de Michoacán se han descrito las otras especies del complejo, y si se ha documentado la presencia de *T. versicolor*, lo que refuerza la conclusión de que la cepa TA-CMU pertenece a dicha especie.

Se analizó la producción de enzimas ligninolíticas extracelulares de la cepa TA-CMU, encontrando que ésta es capaz de producir las tres enzimas estudiadas en cultivos basales, siendo la MnP la que produce menos eficientemente y la lacasa la de mayor actividad. Además, los picos de actividad de las tres enzimas se presentaron en fases distintas del proceso de crecimiento del hongo. En éste sentido, se puede observar que la MnP es la primera actividad en ser detectada seguido de la lacasa. En relación a la actividad de LiP, existen estudios en los que se ha mostrado que en la mayoría de los hongos de pudrición blanca, incluyendo algunas especies del género *Trametes*, producen bajas cantidades de LiP o no la producen en lo absoluto, esto pese a que son eficientes degradadores de lignina (Eriksson *et al.*, 1990; Blanchette *et al.*, 1992; Hatakka, 1994). En particular, se han observado cepas de *T. versicolor* deficientes para la producción de enzimas ligninolíticas, como el caso de la cepa 1666 obtenida en Rusia, la cual mostró bajas actividades de las tres enzimas ligninolíticas aun en un diseño optimizado de cultivo (Shakhova *et al.*, 2011). Tampoco la cepa 951022 proveniente de Korea mostró actividad de LiP en cultivos basales (Han *et al.*, 2005).

La adición de metales divalentes a medios de cultivo resultó en un incremento de las actividades enzimáticas de lacasa y MnP pero no de LiP. Ya se ha observado el incremento

de la actividad de lacasa extracelular en presencia de CuSO_4 a concentraciones de 150 μM , o mayores a 500 μM (Palmier *et al.*, 2000). Swamy y Rammsay (1999) reportan que las actividades de lacasa extracelular y MnP se ven incrementadas cuando se adiciona Mn^{+2} al medio de cultivo. Por otro lado, la capacidad del CuSO_4 y el MnSO_4 de incrementar los niveles de actividad enzimática es significativamente distinta, encontrándose un mayor incremento en presencia de cobre. En el presente trabajo la actividad de lacasa de la cepa TA-CMU se incrementó 6 veces cuando se agregó Cu^{+2} al medio de cultivo en comparación con la actividad basal. Estos datos son congruentes con reportes previos de la literatura en relación al incremento de la actividad de lacasa en presencia de cobre en *T. versicolor*. Así, la actividad enzimática de las cepas MB 52 y MB 54 de *T. versicolor* alcanzó valores de 9000, 10000 U L^{-1} , respectivamente, cuando se añadió 1 mM de Cu^{+2} al medio de cultivo, en contraste con la condición basal de incubación en la cual no se detectó actividad enzimática (Galhaup y Haltrich, 2001). De la misma forma, Lorenzo *et al.* (2006) encuentran que de distintos iones metálicos probados, solo el Cu^{+2} incrementó de manera significativa (12 veces) la actividad de lacasa en la cepa CBS100.29 de *T. versicolor*, con respecto al cultivo basal sin cobre. De manera interesante, en dicho trabajo se observó la actividad de dos isoenzimas, las cuales mantenían actividad tanto en condiciones basales como inducidas con iones durante todo el proceso de incubación, aunque variando la proporción de actividad de cada una.

Recientemente Lebrun y colaboradores (2011) analizaron el efecto de la adición de Cu^{+2} sobre la actividad de las tres principales enzimas ligninolíticas de la cepa de colección ATCC32745 de *T. versicolor*, encontrando que la LiP no presentaba actividad en ausencia del metal y que las actividades de lacasa y MnP se incrementaban hasta 310 y 41 veces, respectivamente, con respecto al cultivo control sin metal. En contraste, se han caracterizado cepas en las que ninguna de las tres enzimas ligninolíticas incrementa su actividad en respuesta a la adición de Cu^{+2} al medio de cultivo (Shakhova *et al.*, 2011).

Collin y Dobson (1997) documentaron por primera vez en *T. versicolor* la inducción de la transcripción de un gen de lacasa en presencia de cobre, con el correspondiente aumento en actividad enzimática, en concentraciones del ion entre 0.4 y 400 μM . Posteriormente se han identificado elementos de respuesta a metales (MRE, por sus siglas en inglés) en la regiones regulatorias de los genes de lacasa en *T. pubescens* y *Trametes* sp. (Janusz *et al.*, 2013). También se han identificado dichas secuencias regulatorias en los genes MPG1 de MnP y LPGIV de LiP en *T. versicolor*, cuyos productos han sido caracterizados (Johansson and Nyman, 1996). No obstante, se han encontrado cepas de *T. versicolor* cuyos

genes de lacasa (Shakhova *et al.*, 2011) no responden incrementando la transcripción en presencia de Cu. También se ha observado un gen de MnP que inhibe la transcripción aun a una concentración de 1 μ M de Mn (Kim *et al.*, 2005), y se ha descrito que el gen *mnp2* que no posee MREs en su región regulatoria incrementa hasta 250 veces su transcripción en presencia del metal que cuando no lo tiene, mientras que el gen *mnp1* que sí tiene estos elementos regulatorios únicamente incrementa ocho veces su transcripción (Johansson *et al.*, 2002). Así, todo lo anterior muestra que aunque las actividades de lacasa y la MnP de la cepa TA-CMU responden a la adición de los metales que comúnmente incrementan tanto transcripción como actividad, el proceso de regulación de dichas enzimas en la cepa TA-CMU necesita ser estudiado con detalle a futuro con la finalidad de identificar los elementos genéticos y bioquímicos que participan.

Las cinéticas de crecimiento no mostraron diferencias significativas entre los distintos inductores empleados en comparación con el control (basal), sin embargo se detectó un ligero incremento de biomasa en los medios suplementados CuSO₄, en comparación con aquellos que contenían MnSO₄. En este sentido se sugiere que la presencia de iones inorgánicos no influye significativamente en el aumento de biomasa en medios de cultivo líquidos. Vasentini y colaboradores (2005) han establecido una correlación entre la biomasa total producida y las características del medio del cultivo, dentro de las cuales destacan las fuentes de carbono, nitrógeno, así como el pH y la temperatura.

CONCLUSIONES

De acuerdo al análisis filogenético se concluye que la cepa de estudio pertenece a la especie *Trametes versicolor*, o por lo menos al complejo formado por esta especie con *T. ectypa*, *T. ochracea* y *T. pubescens*. Dicha cepa es capaz de producir las tres principales actividades enzimáticas ligninolíticas (lac, LiP, MnP) que distinguen a los hongos de pudrición blanca. Además, las actividades enzimáticas de lacasa y MnP mostraron un incremento respecto al control bajo la adición de CuSO₄ y MnSO₄, respectivamente. En ese sentido, el Cu⁺² resultó ser el mejor inductor de actividad para la lacasa y MnP pero no para las LiP. Por otro lado, la adición de estos metales divalentes no influyó en la producción de biomasa durante la cinética de crecimiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Aguirre-Acosta, E., Ulloa, M., Aguilar, S., Cifuentes, J., Valenzuela, R. (2014). Biodiversidad de hongos en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, Supl. 85: S76-S81.
- [2] Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215:403-410.
- [3] Alexis Carlson, A., Justo, A., Hibbet, D.S. (2014). Species delimitation in *Trametes*: a comparison of ITS, RPB1, RPB2 and TEF1 gene phylogenies. *Mycologia*, 106(4), 000–000.
- [4] Baldrian, P. (2004). Increase of laccase activity during interspecific interactions of white-rot fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, 50, 245–253.
- [5] Blanchette, R.A., Farrell, R.L., Burns, T.A., Wendler, P.A., Zimmermann, W., Brush, T.S., Snyder, R.A. (1992). Biological control of pitch in pulp and paper production by *Ophiostoma piliferum*. *Tappi Journal*, 75 102–106.
- [6] CABI Bioscience, CBS & Landcare Research. www.indexfungorum.org. (consultado en 2014).
- [7] Casieri, L., Varese, G.C., Anastasi A., Prigione, V., Svobodova, K., Marchisio, V.F., Novotny, C. (2008). Decolorization and detoxification of reactive industrial dyes by immobilized fungi *Trametes pubescens* and *Pleurotus ostretus*. *Folia Microbiology*, 53:44-52.
- [8] Cho, N.S. Wilkolazka, A.J., Magdalena Staszczak, M., Cho, H.Y., Ohga, S. (2009). The Role of Laccase from White Rot Fungi to Stress Conditions. *Journal of The Faculty Of Agriculture Kyushu University*, 54 (1), 81–83.
- [9] Cifuentes, J. (2008). Hongos. En: S. Ocegueda y J. Llorente-Bousquets (coords.). Catálogo taxonómico de especies de México. En: Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO. México, CD1. Base de datos SNIB-CONABIO. México.
- [10] Collins, P., Dobson, A. D. (1997). Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Applied and Enviromental Microbiology*, 63, 3444-3450.
- [11] Couto, S. R., Sanromán, M. A. (2005). Coconut flesh: a novel raw material for laccase production by *Trametes hirsute* under solid-state conditions. Application to Lissamine Green B decolourization. *Journal of Food Engineering* 71:208-213.
- [12] Eriksson, K.E., Blanchette, R.A., Ander P. (1990). Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components, *Springer*, New York, USA.

- [13] Galhaup, C., Haltrich, D. (2001). Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56: 225-232.
- [14] Gilbertson, R.L. (1994). European polypores. *Synopsis Fungorum*, 7(2):388–743.
- [15] Haglund, C., Levín, L., Forchiassin, F., López, M., Viale, A. (2002). Degradation of environmental pollutants by *Trametes troglitii*. *Revista Argentina de Microbiología*, 34: 157-62.
- [16] Han, M., Choi, H., & Song, H. (2005). Purification and characterization of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor*. *The journal of microbiology*, 43(6), 555.
- [17] Hatakka, A. (1994). Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi. Production and role in lignin degradation, *FEMS Microbiology Review*, 13 125–135.
- [18] Hibbett, D. S., Donoghue, M. J. (1995). Progress toward a phylogenetic classification of the Polyporaceae through parsimony analyses of ribosomal DNA sequences. *Canadian Journal of Botany*, 73(supply 1):S853–S861.
- [19] Hibbett, D. S., Donoghue, M. J. (2011). Phylogenetic classification of *Trametes* (Basidiomycota, Polyporales) based on a five-marker dataset. *International Journal of Taxonomy, Phylogeny and Evolution*, 60:1567-1583.
- [20] Johansson, T., & Nyman, P. O. (1996). A cluster of genes encoding major isozymes of lignin peroxidase and manganese peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Gene*, 170(1), 31-38.
- [21] Johansson, T., Nyman, P. O., & Cullen, D. (2002). Differential regulation of *mnp2*, a new manganese peroxidase-encoding gene from the ligninolytic fungus *Trametes versicolor* PRL 572. *Applied and environmental microbiology*, 68(4), 2077-2080.
- [22] Kim, Y., Yeo, S., Kum, J., Song, H., & Choi, H. T. (2005). Cloning of a manganese peroxidase cDNA gene repressed by manganese in *Trametes versicolor*. *JOURNAL OF MICROBIOLOGY-SEOUL*-, 43(6), 569.
- [23] Kirk, T.K., Burgess, R.R., Koning, J.W. (1992). Use of fungi in pulping wood: an overview of biopulping research. En: Leatham, G. F. (Eds). *Frontiers in industrial Mycology*. Proceedings of Industrial Mycology symposium. Routledge, Chapman & Hall. New York.
- [24] Kirk, T.K., Schultz, E., Cornnors, W.J., Lorenz, L.F., Zeikus, J.G. (1978). Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochate chrysosporium*. *Archives of Microbiology*, 117: 277-285.

- [25] Ko, K., Sand, J.H.S. (1999). Molecular phylogeny of *Trametes* and related genera. *Antonie van Leeuwenhoek*, 75:191–199.
- [26] Ko, K., Sand, J.H.S. (2000) Phylogenetic Study of Polypores Based on Molecular Sequences. Thesis (Supervisor Prof. H.S. Jung) for the Degree of Doctor in Philosophy, School of Biological Sciences, Seoul National University. 324.
- [27] Levin, L., Forchiassin, F., Ramos, A. M. (2002). Copper induction of lignin-modifying enzymes in the white-rot fungus *Trametes trogii*. *Mycologia*, 94(3), 377–383.
- [28] Levin, L., Forchiassin, F. (2012). Contributions to research on white-rot fungi, lignin-degrading enzymes, and their industrial and environmental applications. Fungi: Types, Environmental Impact and Role in Disease. Nova Science Publishers Inc.
- [29] Lorenzo, M., Moldes, D., Sanromán, M.Á. (2006). Effect of heavy metals on the production of several laccase isoenzymes by *Trametes versicolor* and on their ability to decolourise dyes. *Chemosphere*. 63(6): 912-917.
- [30] Messner, K. Srebotnik, E. (1994). Biopulping: An overview of developments in an environmentally safe papermaking, *FEMS Microbiology Review*, 13, 351–365.
- [31] Moldes, D., Fernández-Fernández, M., Sanromán, M.A. (2012). Role of Laccase and Low Molecular Weight Metabolites from *Trametes versicolor* in Dye Decolorization. *The ScientificWorld Journal*, 9.
- [32] Nagai, M., Sato, T., Watanabe, H., Saito, K., Kawata, M., Enei, H. (2002). Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinus edodes*, and decolorization of chemically different dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60: 327-335.
- [33] Osma, J. F., Toca, H. J. L., Rodríguez-Couto, S. (2007). Banana skin: A novel waste for laccase production by *Trametes pubescens* under solid-state conditions: application to synthetic dye decolouration. *Dyes and Pigments*, 75: 32-37.
- [34] Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B. and Sannia, G. (2000). Copper Induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 920-924.
- [35] Paszczyński, A., Huynh, V.B., Crawford, R. (1985). Enzymatic activities of an extracellular, manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiology Letters*.
- [36] Rajchenberg M. (2011). Nuclear behavior of the mycelium and the phylogeny of polypores (Basidiomycota). *Mycologia*, 103 (4):677–702.

- [37] Ryvarden, L. (1991). Genera of polypores: nomenclature and taxonomy. *Synopsis Fungorum*, 5:1–363.
- [38] Shakhova, N.V., Golenkina, S.A., Stepanova, E.V., Loginov, D.S., Psurtseva, N.V., Fedorova, T.V., Koroleva, O.V. (2011). Effect of submerged cultivation conditions and inducers on biosynthesis of extracellular laccase by a *Trametes versicolor* 1666 strain. *Applied biochemistry and microbiology*, 47(9), 808-816.
- [39] Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood and Evolutionary distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28:2731-2739.
- [40] Tomšovský, M., Homolka, L. (2003). Laccase and other ligninolytic enzyme activities of selected strains of *Trametes* spp. from different localities and substrates. *Folia Microbiologica (Praha)*, 48(3):413-416.
- [41] Tomšovský, M., Kolařík, M., Pažoutová, S., Homolka, L. (2006). Molecular phylogeny of European *Trametes* (Basidiomycetes, Polyporales) species based on LSU and ITS (nrDNA) sequences. *Nova Hedwigia*, 82(3-4) 269-280.
- [42] Viswanath, V., Rajesh, B., Janardhan, A., Kumar, A.P., Narasimha, G. (2014). Fungal Laccases and Their Applications in Bioremediation. *Enzyme Research*.
- [43] Vesentini, D., Dickinson, D.J., Murphy, J.R. (2005). The production of extracellular mucilaginous material (ECMM) in two wood-rotting basidiomycetes is affected by growth conditions. *Mycologia*, 97(6), 1163–1170.
- [44] White, T. J., Bruns T., Lee, S., Taylor, J.W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322, In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds. Innis, M. A., Gelfand, D.H., Sninsky J.J., White, T.J. Academic Press, Inc., New York.
- [45] Welti, S., Moreau, P.A., Favel A., Courtecuisse, R., Haon, M., Navarro, D., Taussac, S., Lesage-Meessen, L. (2012). Molecular phylogeny of *Trametes* and related genera, and description of a new genus *Leiotrametes*. *Fungal Diversity*, 55:47–64.
- [46] Winqvist, E., Moilanena, U., Mettälä, A., Leisola, M., Hatakka, A. (2008). Production of lignin modifying enzymes on industrial waste material by solid-state cultivation of fungi. *Biochemical Engineering Journal* 42:128–132.
- [47] Yamanaka, R., Soares, C.F., Mathews, D.R., Machado, K.M.G. (2008). Ligninolytic enzymes produced by *Trametes villosa* CCB 176 under different culture conditions. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39: 78 – 84.

CAPÍTULO 2

6.2 ACTIVIDAD DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS EN PRESENCIA DE RASTROJO DE MAÍZ Y MODIFICACIONES ESTRUCTURALES A DICHO SUSTRATO POR LA CEPA SILVESTRE TA-CMU DE *Trametes versicolor*

Erick Magaña-Ruiz^a, Ma. Soledad Vázquez-Garcidueñas^b, Gerardo Vázquez-Marrufo^a

^aCentro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. ^bDivisión de Estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. E-mail: gvazquezmarrufo@yahoo.com.mx

RESUMEN

La documentación sobre la capacidad de especies de hongos basidiomicetes para degradar componentes lignocelulósicos en el ambiente natural se ha centrado particularmente en especies del género *Trametes*. En ese contexto se han probado distintos residuos agroindustriales para inducir la actividad de enzimas ligninolíticas en *Trametes* spp. con buenos resultados. Por esto, en el presente trabajo se analizó la capacidad oxidativa de un aislado silvestre de *T. versicolor* y la influencia del rastrojo de maíz molido e infusión de rastrojo en el incremento de la actividad enzimática de ligninasas. La máxima actividad enzimática para la lacasa y manganeso peroxidasa se observó en presencia de rastrojo de maíz molido, con valores de 535 U L⁻¹ para lacasa, y 431.9 U L⁻¹ para la manganeso peroxidasa, los días 15 y 9 de incubación respectivamente. Por su parte, la actividad enzimática de la manganeso peroxidasa se detectó durante los primeros días de la cinética enzimática tanto en el medio con rastrojo molido como en aquel con infusión de rastrojo. No se encontró actividad de LiP bajo la presencia de éstos inductores. Respecto al proceso de delignificación de rastrojo de maíz (*Zea mays*) se encontró que la modificación de la pared celular secundaria así como del tejido vascular ocurre durante las primeras dos semanas de contacto con el hongo, también se observó que dicho proceso ocurre de manera diferencial siendo la lignina el primer polímero en ser atacado enzimáticamente.

Palabras clave: Basidiomicetos, ligninasas, capacidad oxidativa, delignificación.

ABSTRACT

The documentation about the ability of species of basidiomycetous fungi degrading lignocellulosic components in natural environments has been particularly focused on species of the genus *Trametes*. In that context, different agro-industrial residues have been used with good results to induce the activity of ligninolytic enzymes in *Trametes* genera. Because of this, in the current work, the oxidative capacity of a wild strain of *T. versicolor* and the influence of maize stalks and corn extract on the increasing of the enzyme activity of ligninases was carried out. The highest enzymatic activity for the extracellular laccase and MnP was observed in media with maize stalks, 535 U.mL⁻¹ for laccase and 431.9 U.mL⁻¹ for MnP, the 15th and 9th days of incubation. However, no LiPs enzymatic activity was found in the presence of these inductors. Regarding the process of delignification of maize stalks (*Zea mays*), it was found that the modification of the secondary cell wall and vascular tissue occurs during the first two weeks of contact with the fungus. It was also noticed that this process occurred differentially, being the lignin polymer the first structure to be attacked enzymatically.

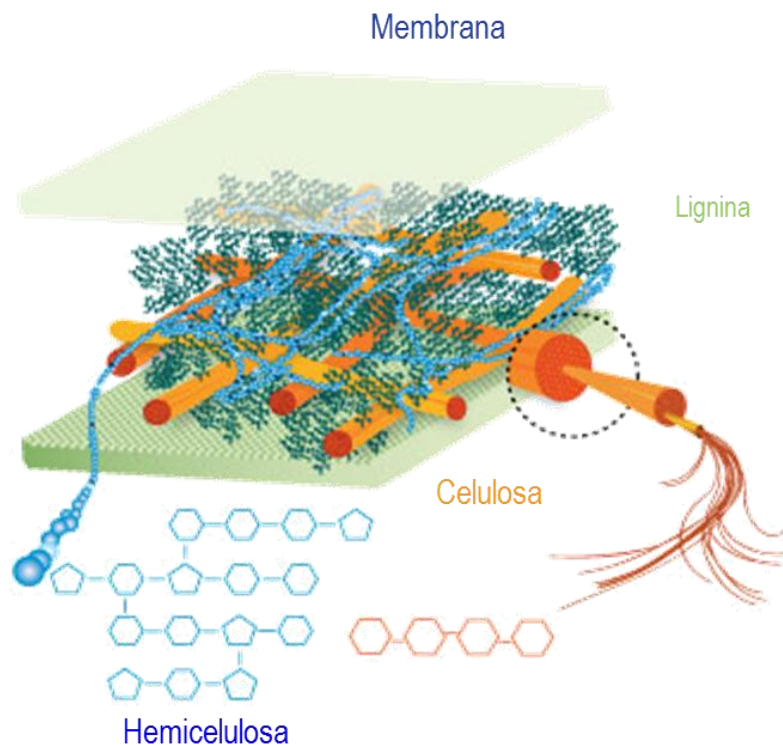
Keywords: *Basidiomycetes, ligninases, oxidative capacity, delignification.*

INTRODUCCIÓN

Los materiales lignocelulósicos son muy abundantes en el planeta, formando parte de los tejidos vegetales y consecuentemente encontrándose en todos los residuos agrícolas, agroindustriales y subproductos. Este material está constituido principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina (figura 1). De éstos, la lignina es el más abundante en el mundo vegetal y el más resistente a la degradación (Sánchez *et al.*, 2009). Dicho polímero es la única fibra no polisacárido que se conoce, la cual realiza múltiples funciones que son esenciales para la vida de las plantas. Por ejemplo, posee un papel principal en el transporte interno de agua, nutrientes y metabolitos; proporciona rigidez a la pared celular y actúa como puente de unión entre las células de la madera, creando un material que es notablemente resistente a los impactos, compresiones y flexiones así como al ataque de los microorganismos, impidiendo la penetración de las enzimas destructivas en la pared celular. Su estructura es compleja (está formada por una unidad base que comprende un anillo aromático -molécula cíclica- y una cadena lateral de tres carbonos). En función de la sustitución sobre el anillo resultan tres unidades monoméricas distintas. En contraste a los polisacáridos, la lignina presenta una amplia gama de enlaces, lo que la hace un polímero

muy heterogéneo. Estos pueden darse entre ambos anillos o entre el anillo y uno de los carbonos de la cadena o entre una cadena y otra (Le Gall *et al.*, 21015).

Figura 1. Componentes lignocelulósicos en plantas (tomado de Dávila *et al.*, 2001).



La lignina también es difícilmente atacable por el hecho de que sus enlaces necesitan una alta energía de activación para la despolimerización en sus unidades. Esta última característica, junto a la notable diversidad de la lignina, son las dos razones que hacen que muy pocos microorganismos sean capaces de degradarla (Woolridge, 2014).

Los reportes encontrados en la literatura sobre la capacidad de especies de hongos para degradar lignina en el ambiente natural se han enfocado principalmente en especies de basidiomicetes de pudrición blanca, principalmente de los géneros *Pleurotus*, *Trametes* y *Phanerochaete* (Wong *et al.*, 2009)

Se ha reportado también que la habilidad de los hongos basidiomicetes para degradar componentes lignocelulósicos en la naturaleza ha sido aprovechada para estudiar el proceso de degradación de lignina en rastrojo destinado como alimento para animales de granja. Dichos estudio incluyen, entre otros, al proceso de degradación de lignina de distintos tipos de rastrojo por parte de *P. chrysosporium*, *Phlebia radiata* (Dorado y col., 1999), y varias especies del género *Pleurotus* (Gutiérrez y col., 1996;). El proceso de degradación de lignina

puede llevar a aumentar la digestibilidad de diversos tipos de rastrojo, con un consecuente incremento en la productividad de los rumiantes de granja.

Se ha reportado que la cepa K-3 de *Phanerochaete chrysosporium* y la cepa FP90031-sp de *Ceriporiopsis subvermispora* mejoran la capacidad de digestión in vitro de pasto de Bermuda (*Cynodon dactylon* L. Pers) por parte de microorganismos del rumen (Akin *et al.*, 1993). La digestibilidad in vitro del rastrojo de trigo también se ve mejorada después de la incubación con *Pluerotus ostreatus* y *Trametes gibbosa* (Jalc y col., 1996).

Por otra parte, distintos residuos agroindustriales han sido empleados para inducir la actividad de enzimas ligninolíticas en *Trametes* spp. con buenos resultados, entre los que se pueden mencionar la cáscara de plátano (Osma *et al.*, 2007), la pulpa de coco (Rodríguez-Couto y Sanromán, 2005), cáscara de avena (Winqvist *et al.*, 2008), residuos de manzana (Landolo *et al.* 2011), bagazo de caña (Iqbal *et al.*, 2011) y tallos de plantas de uva (Levin *et al.*, 2012), aceite vegetal (Yamanaka *et al.*, 2008), entre otros. También se ha observado la producción de Lac, LiP y MnP cuando se cultiva a *Trametes* spp. en rastrojo de arroz (Vyas *et al.*, 1994) y rastrojo de trigo (Iqbal *et al.*, 2011), algo de particular importancia para este trabajo.

Existe una gran variabilidad en la capacidad de producción de las tres principales enzimas ligninolíticas en cepas silvestres pertenecientes a distintas especies del género *Trametes* (Tomsovský y Homolka, 2003). Derivado de lo anterior se destaca que cuando se tiene un nuevo aislado silvestre de *Trametes* spp., no necesariamente va a tener las mismas características de producción de enzimas ligninolíticas de aislados previamente reportados, que la actividad de dichas enzimas puede incrementarse in vitro tomando residuos agrícolas como inductores de actividad como en el caso del rastrojo de maíz, el cual además puede incrementar su valor nutricional mediante un pretratamiento enzimático para su aplicación como alimento ganado bovino.

Porcentaje del componente	Residuo agrícola			
				
	Rastrojo de maíz	Rastrojo de trigo	Rastrojo de arroz	Bagazo de caña de
Celulosa	33.7 – 41.2	32.9 – 50h	36.2 - 47	40 – 41.3
Hemicelulosa	31.9 – 36.6	24 – 35.5	19 – 24.5	27 – 37.5
Lignina	6.1 – 15.9	8.9 – 17.3	9.9 - 24	10 - 20

Figura 2. Porcentaje de los componentes lignocelulósicos en distintos tipos de residuos agrícolas (modificado de Nigam *et al.*, 2011).

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa de estudio

Se estudió la cepa TA-CMU de *Trametes versicolor* aislada en el municipio de Pátzcuaro del estado de Michoacán y depositada en el Cepario Michoacano Universitario del CMEB-UMSNH.

Medios de cultivo

Se utilizó el medio sólido agar de dextrosa y papa (PDA, Difco™, USA) para el mantenimiento de la cepa y la obtención de inóculos para los ensayos de cinética enzimática. El medio se preparó de acuerdo a las instrucciones del proveedor y posteriormente se esterilizaron a 121°C y 15 lbs/in² durante 15 minutos.

Para la realización de cinéticas de crecimiento y determinación de actividad enzimática en medio líquido se empleó el medio completo PDB (Difco™, USA), y para los ensayos de fermentación en sustrato sólido se empleó el medio completo EMA (Difco™, USA), los cuales se prepararon de acuerdo a las instrucciones del proveedor y se esterilizó de la manera previamente descrita.

Obtención de inóculos

Se incubó la cepa TA-MU de *Trametes versicolor* en placas de PDA de 6 mm de diámetro a 28°C para la generación de inóculos (Yamanaka *et al.*, 2008). Se permitió el desarrollo del micelio hasta que cubrió $\frac{3}{4}$ partes de la superficie del medio de cultivo y

posteriormente se removieron del límite de la colonia inóculos con un sacabocados de 6 mm de diámetro, los cuales fueron utilizados para los ensayos en medio líquido.

Cultivo en medio líquido

Los cultivos en medio líquidos de la cepa TA-CMU se realizaron en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 25 mL de medio líquido PDB. Dicho medio fue inoculado con tres cilindros de 6 mm de diámetro obtenidos de la manera previamente descrita. Los cultivos así inoculados se incubaron a 28 °C y 120 rpm. El crecimiento se determinó midiendo el peso seco a distintos tiempos de incubación, mientras que para la determinación de las actividades enzimáticas que se describen posteriormente se tomaron alícuotas del medio extracelular en campana de flujo laminar. Tanto las cinéticas de crecimiento como las de actividad se realizaron en tres ensayos independientes por triplicado y el resultado de las mediciones fue promediado, obteniéndose la desviación estándar para cada punto de la curva de crecimiento. Para evaluar si las diferencias en la producción de biomasa en cada punto de la cinética eran significativas se realizó un análisis ANOVA y una prueba a Tukey ($p < 0.05$) empleando el paquete Prism 3.0.

Determinación de la actividad de lacasa extracelular

La determinación de actividad enzimática de lacasa extracelular se realizó cuantificando la formación del catión ABTS⁺¹ de acuerdo a Nagai *et al.* (2002). La mezcla de reacción se preparó de la siguiente manera: 800 µL de buffer de fosfatos pH 4 (0.1 M de ácido cítrico, 0.2 M de fosfato de sodio dibásico), 100 µL de ABTS 1M (2, 2'- azino-bis (3-etilbenztiazolina-6-sulfonato) y 100 µL del sobrenadante del medio de cultivo centrifugado; para ello se tomó una alícuota de 300 µL del medio de cultivo el cual se centrifugó a 1 500 x *g* durante 10 minutos. La mezcla de reacción se incubó a 30°C durante 20 min al término de los cuales se agregaron 100 µL de TCA (ácido tricloro acético 5% v/v) para detener la reacción. La actividad enzimática fue cuantificada espectrofotométricamente a 420 nm, utilizando el valor de ϵ del ABTS de 36 M⁻¹cm⁻¹.

Determinación de la actividad de lignin peroxidasa

La actividad enzimática de LiP se determinó cuantificando la oxidación del alcohol veratrílico a veratraldehído de acuerdo a Tien y Kirk (1988). La mezcla de reacción contenía 700 µL de buffer de tartratos 0.3 mM pH 2.5; 50 µL de alcohol veratrílico 10 mM, 50 µL de peróxido de hidrógeno 5 mM como iniciador de la reacción enzimática y 200 µL del

sobrenadante del medio de cultivo centrifugado como se describió previamente. La mezcla de reacción se incubó a 25°C durante 2 minutos. La actividad enzimática fue cuantificada espectrofotométricamente a 310 nm, utilizando el valor de ϵ del veratraldehído de $9,3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Determinación de la actividad de manganeso peroxidasa

La actividad enzimática de MnP se determinó cuantificando la formación del complejo tartrato de manganeso de acuerdo a Pascynski *et al.* (1985). La mezcla de reacción contenía 500 μL de buffer de tartrato de sodio 0.1 mM pH 5; 75 μL de MnSO_4 10 mM, 75 μL de 2,6-dimetoxifenol 10 mM, 50 μL de peróxido de hidrógeno 5 mM como iniciador de la reacción enzimática y 300 μL del sobrenadante del medio de cultivo centrifugado como se describió previamente. La mezcla de reacción se incubó a 25°C durante 2 minutos. La actividad enzimática fue cuantificada espectrofotométricamente a 334 nm, utilizando el valor del ϵ del tartrato de manganeso de $18,3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Para el cálculo de la actividad enzimática se empleó la siguiente fórmula:

$$AE = \frac{(Abs.)(VT)}{(\epsilon)(Vm)}$$

Donde, la actividad enzimática (AE) es igual al producto de la absorbancia de la mezcla de reacción (Abs) por el volumen total de la muestra (VT) dividido entre el producto del coeficiente de extinción molar del cromóforo (ϵ) por el volumen del sobrenadante del medio de cultivo adicionado a la mezcla de reacción (Vm).

Modificaciones estructurales del rastrojo de maíz por parte de la cepa TA-CMU

Preparación del ensayo de fermentación en sustrato sólido

Para evaluar la degradación de rastrojo de maíz (*Zea mays*) en medio sólido se prepararon placas de Petri de 8 cm de diámetro con medio EMA en las cuales se colocó un portaobjeto previamente esterilizado en el centro antes de que el medio solidificara por completo. Se colocó un papel filtro estéril (Wathman No. 10, USA) sobre el portaobjeto con la finalidad de que el medio de cultivo sólido no entrara en contacto con el papel filtro, encima de éste se colocó rastrojo de maíz molido estéril y húmedo. En cada uno de los extremos del portaobjetos se colocó un inóculo cilíndrico de 6 mm de diámetro, proveniente

de un cultivo en fase logarítmica de crecimiento. Las placas así inoculadas se incubaron en oscuridad a 28°C evaluando los cambios estructurales a distintos tiempos de incubación mediante Microscopía Electrónica de Barrido.

Análisis estructural mediante Microscopía Electrónica de Barrido

Para cada uno de los tiempos de incubación evaluados las muestras de rastrojo de maíz inoculadas con el hongo y un control sin inocular se secaron a 60 °C por 12 horas y se colocaron en desecador para su posterior análisis.

Para ser analizadas por la Microscopía Electrónica de Barrido, se hicieron cortes de fibras de rastrojo de maíz con interacción de micelio (5X5 mm) que posteriormente fueron recubiertas finamente con un baño de iones de cobre emitidos por un revestidor de bombardeo iónico S150A PIRANI 10 para asegurar la conductividad de la superficie. Una vez metalizadas de la manera anteriormente descrita, las muestras se analizaron mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM, por sus siglas en inglés) empleando un microscopio JEOL JSM-6400 operado a 15 kV. Dichas observaciones se realizaron en el Instituto de Investigación Metalúrgica perteneciente a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH).

RESULTADOS

Cinética de crecimiento en medio líquido

Estas cinéticas se realizaron de la manera anteriormente descrita determinándose el incremento de biomasa en medios de cultivo líquidos con agitación así como el efecto de sustratos orgánicos diversos (figura 3). La cinética de crecimiento de la cepa TA-CMU en medio PDB con infusión de rastrojo y rastrojo molido mostraron diferencias significativas con respecto al medio basal. En el medio basal la cepa TA-CMU no presenta fase lag y la fase logarítmica de crecimiento se extiende desde el primer día de cultivo hasta el 7° día, en el que inicia la fase estacionaria. Hacia el 13° día de incubación el micelio parece retomar el crecimiento.

En cuanto al medio con rastrojo molido, en ésta condición se presentó la fase lag más prolongada, observándose el inicio de la fase logarítmica de crecimiento hasta el cuarto día y, entrando a la fase estacionaria al noveno día. En presencia de la infusión de rastrojo la

cepa TA-CMU mostró un rápido incremento de biomasa desde los primeros días de incubación, entrando a fase estacionaria al cuarto día (figura 3).

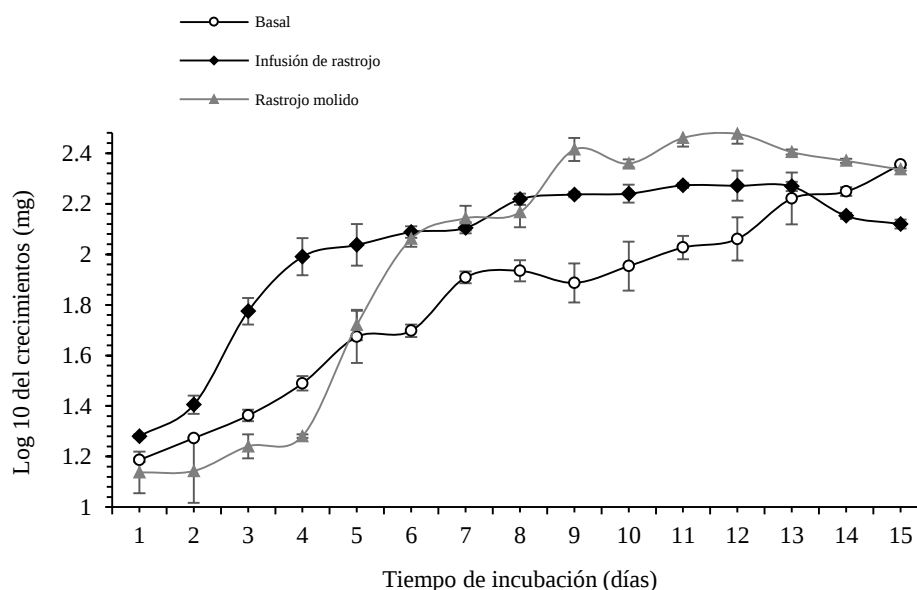


Figura 3. Cinéticas de crecimiento de la cepa TA-CMU de *T. versicolor* en medio líquido basal PDB y suplementado con rastrojo de maíz en distintas formulaciones. La cepa se incubó a 28°C y 120 rpm, determinándose el aumento de biomasa gravimétricamente.

Ensayos de actividad enzimática

En la figura 4, se puede observar la actividad enzimática de lacasa, LiP y MnP en medio PDB adicionado con extracto de rastrojo al 10% (v/v). La cinética de la actividad enzimática de lacasa se graficó en el eje secundario. La actividad enzimática de las LiP prácticamente no se detectó en esta condición de cultivo. En el caso de las Mns, dicha actividad se observó desde el inicio de la cinética y continuó su incremento hasta un máximo de 115.50 U L⁻¹ al noveno día de incubación. En el caso de la actividad enzimática de lacasa extracelulare se observó un primer incremento de actividad al quinto día de la cinética, llegando al máximo de actividad de 431.90 U L⁻¹ en el octavo día de la cinética.

En la figura 5 se observa actividad enzimática de ligninasas en medio basal PDB adicionado con rastrojo molido al 2% (p/v). La curva de la actividad enzimática de Lacasas se graficó en el eje secundario. No se detectó la actividad enzimática de LiP durante los primeros 8 días de incubación, sin embargo, a partir del noveno día se observó un incremento en la actividad, el cual llegó a un máximo de 49.27 U L⁻¹ en el décimo quinto día de incubación.

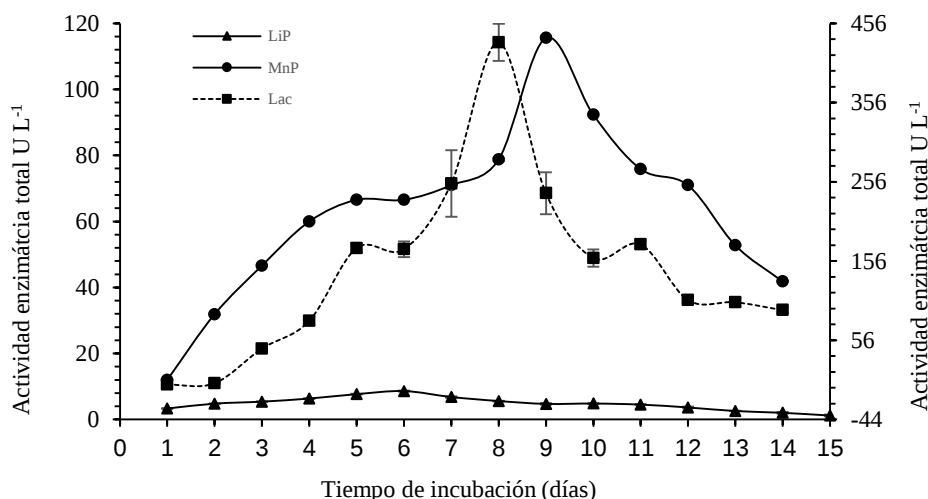


Figura 4. Actividad enzimática de ligninasas de la cepa silvestre TA-CMU de *T. versicolor*. Los cultivos se incubaron en medio basal PDB adicionado con extracto de rastrojo al 10% (v/v) a 28°C y 120 rpm.

En cuanto a la MnP, ésta mostró una fase log desde el primer hasta el tercer día de incubación, llegando a un máximo de 87.62 U L^{-1} al cuarto día, en el que entra a una fase estacionaria hasta el décimo día, a partir del cual empieza a entrar una caída de la actividad. Con respecto a la actividad enzimática de lacasa, se observó una fase lag durante los primeros tres días de incubación seguida de una fase logarítmica que se extiende desde el cuarto hasta el séptimo día de incubación en el que se alcanza un primer máximo de 481.64 U L^{-1} . Se observa entre los días 9 y 13 una fase de disminución de la actividad, para posteriormente alcanzar un incremento máximo de 535 U L^{-1} al décimo quinto día.

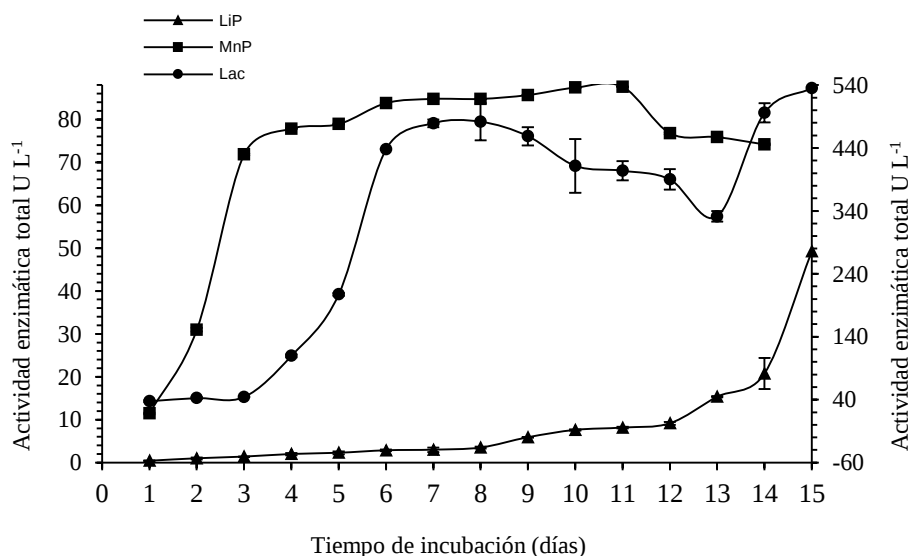


Figura 5. Actividad enzimática de ligninasas de la cepa silvestre TA-CMU de *T. versicolor*. Los cultivos se incubaron en medio basal PDB adicionado con rastrojo molido al 2% (p/v) a 28°C y 120 rpm.

Análisis de delignificación de rastrojo de maíz (*Zea mays*)

En la figura 6 se presenta el proceso de desestructuración de las fibras de rastrojo de maíz por parte de la cepa TA-CMU. En el Panel A de dicha figura se observa un corte transversal de fibras de rastrojo previo a la inoculación fúngica. Se puede distinguir la pared celular secundaria altamente lignificada al interior de los vasos y las traqueidas del xilema, resaltando la integridad y organización estructural de la misma (A y D). Después de 2 semanas de la inoculación con la cepa TA-CMU se puede identificar la degradación parcial y significativa de las paredes celulares en porciones en los conductos vasculares (B), así como la colonización por parte del micelio (E). A las 4 semanas se observó la desestabilización estructural de los vasos y las traqueidas del tejido vascular como resultado de la actividad ligninolítica generada por la presencia del hongo (C), así como la desestrucción del tejido de los conductos del xilema, y fragmentos remanentes (F).

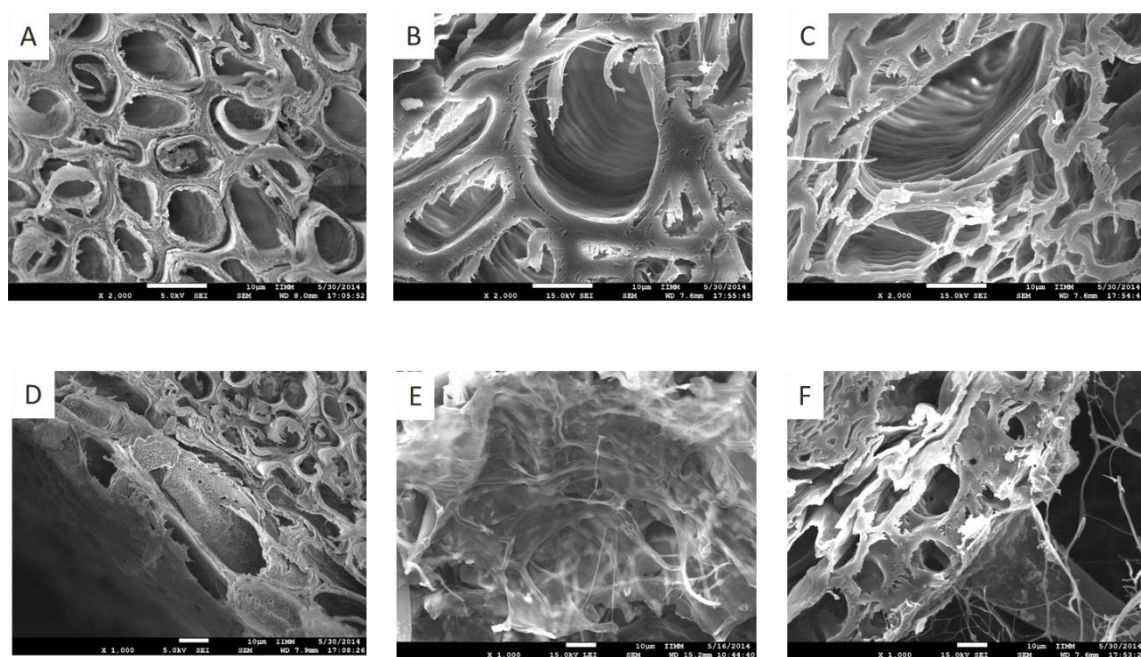


Figura 6. Análisis de la delignificación del rastrojo de maíz. Magnificación de 2000X (A-C), 1000X (D-F). Controles, rastrojo de maíz sin esterilizar A y D. Interacción Micelio-rastrojo de maíz B y E Interacción rastrojo-micelio (2 semanas de incubación) C y F Interacción rastrojo-micelio (4 semanas de incubación).

DISCUSIÓN

Los hongos de pudrición blanca degradan eficientemente la celulosa y la lignina, proceso que se lleva a cabo mediante reacciones oxidativas de enzimas secretadas como las lacasas, LiPs y MnPs. Estas dos últimas requieren la presencia de peróxido de hidrógeno para generar radicales libres que bombardean al sustrato. La actividad enzimática se encuentra relacionada con los requerimientos nutricionales del hongo. Por consiguiente los sustratos hidrocarbonados son requeridos para inducir la ligninólisis (Eriksson *et al.*, 1990; Leonowicz *et al.*, 1999; Carile *et al.*, 2001; Berovic, 2007) y consecuentemente obtener aumento de biomasa. Debido a ello en el presente trabajo se analizó la capacidad oxidativa de un aislado silvestre de *T. versicolor* y la influencia del rastrojo de maíz, infusión de rastrojo y cáscara de aguacate en el incremento de la actividad enzimática de ligninasas en un medio completo; derivado de éstos estudios se determinó además el proceso de delignificación de rastrojo de maíz (*Zea mays*).

Las cinéticas de crecimiento mostraron diferencias significativas entre el medio basal y aquel suplementado con rastrojo, aunque únicamente en la etapa inicial e intermedia del crecimiento, ya que al final del cultivo tanto el medio basal como el que tenía rastrojo molido mostraron la misma producción de biomasa, en contraste con el que se adicionó con infusión de rastrojo que parecía haber entrado a una etapa de decaimiento en el décimo quinto día de incubación

La actividad enzimática total en medio líquido suplementado con Rastrojo de Maíz e Infusión de rastrojo se siguió durante quince días. En ambas gráficas se observó que las actividades de las lacasas extracelulares arrojan las mayores actividades enzimáticas en comparación con las curvas de las peroxidases. Por otro lado, dentro del mismo tipo de inductores (rastrojo de maíz), la actividad de lacasas extracelulares fue mayor en los medios con rastrojo molido que en los que contenían infusión de rastrojo, 535 U.mL^{-1} y 431.9 U.mL^{-1} respectivamente. La presencia de dos picos en la curva de actividad de lacasas extracelulares en los medios suplementados con rastrojo molido puede deberse a la presencia de isoformas de lacasas que se expresan en condiciones distintas de cultivo. Ya se han reportado con anterioridad la presencia de dos isoformas de lacasas extracelulares en *T. versicolor* (Bourbonnais *et al.*, 1995; Carvalho *et al.*, 1999; Lorenzo, 2006). Las LiPs por su parte no mostraron actividad enzimática significativa bajo la presencia de éstos inductores. Durante los primeros días de incubación estas actividades enzimáticas aparecen inhibidas, sin embargo en presencia de rastrojo molido se observó un incremento en su actividad al noveno día. Schoemaker y Piontek, (1996), señalan que la LiP es una enzima producto del metabolismo secundario de los hongos de pudrición blanca y que su producción suele

requerir la presencia de inductores tales como compuestos aromáticos, entre ellos el alcohol veratrílico (p-dimetoxifenol), el cual a su vez es un metabolito secundario de éstos hongos. Ya se ha documentado que las LiPs no son producidas aparentemente por todos los hongos de pudrición blanca, especialmente en aquellos considerados como degradadores selectivos de lignina (Hatakka, 1994). Gutiérrez y colaboradores (2002), por ejemplo, mencionan no haber detectado la actividad enzimática de LiPs en cultivos con algunos hongos conocidos por ser eficientes degradadores de la lignina; añaden que a diferencia de las MnPs, las LiPs rara vez se detectan durante la descomposición de sustratos lignocelulósicos por hongos de pudrición blanca. Para esto Hammel y Cullen (2008) mencionan que la actividad catalítica de las LiPs decrece marcadamente conforme aumenta el tamaño de la estructura de la lignina y proponen que el alcohol veratrílico juega un papel importante evitando que la enzima se inactíve por permanecer largos periodos oxidada, de acuerdo con este punto de vista, el alcohol veratrílico actuaría como un donador de electrones eficiente para rescatar a la LiP de la inactivación oxidativa por H_2O_2 . Otro factor involucrado en ese sentido es la corta vida del alcohol veratrílico (4 ms) bajo condiciones ácidas, típicas de la madera que es sometida a principios de pudrición blanca (Candeias y Harvey, 1995; Bietti *et al.*, 1998). Respecto a las actividades enzimáticas de las MnPs reportadas en el presente trabajo, éstas aparecen durante la idiofase (fase de crecimiento), dentro de los primeros días de la cinética enzimática tanto en los medios con rastrojo molido como infusión de rastrojo como inductores. En éste contexto, ya se han documentado a las MnPs como las principales enzimas involucradas en la despolimerización de la lignina (Hofrichter, 2002; Urek y Pazarlioglu, 2007). Por su parte, Arantes y colaboradores (2007) señalan que la eficiencia en la degradación de la lignina está dado por la acción sinérgica de las lacasas extracelulares y las MnPs. Levin y Fochiassin (2012) reportan que la actividad ligninolítica está generalmente vinculada a la idiofase, cuando por agotamiento de fuente de carbono y nitrógeno cesa el crecimiento activo (trofofase). Particularmente las lacasas extracelulares pueden presentarse en la trofofase, aunque su producción se incrementa notablemente durante el crecimiento secundario, mencionan por otro lado, que la síntesis de LiPs y MnPs está asociada a la idiofase. En particular se ha observado la producción e incremento de lacasa y MnP en cepas distintas de *Trametes versicolor* en presencia de distintos residuos agrícolas y agroindustriales como rastrojo de trigo, de cebada, tallos de uvas, viruta de haya, sin embargo no se ha detectado la presencia de LiP (Schlosser *et al.*, 1997; Couto *et al.*, 2002; Valášková 2006). En otros trabajos se ha reportado que la producción de LiP ha

ocurrido sólo durante la fase inicial de transformación de rastrojo (Valmacena *et al.*, 1991; Vyas, 1994), lo cual es equiparable a lo reportado en el presente trabajo.

Por último, en base a las actividades enzimáticas encontradas, se realizaron ensayos de fermentación en estado sólido para evaluar el efecto que tenía el hongo y su batería de enzimas en la modificación de las paredes secundarias del rastrojo de maíz (*Zea mays*). Actualmente son pocos los estudios de modificación y delignificación de la pared celular vegetal por parte del basidiomicete *Trametes versicolor* a través de Microscopía Electrónica de Barrido (Barrasa *et al.*, 1995). En éstos ensayos se encontró que el proceso de delignificación ocurre durante las primeras dos semanas de contacto con el hongo, también se observó que dicho proceso ocurre de manera diferencial siendo la lignina el primer polímero en ser atacado enzimáticamente.

CONCLUSIONES

La cepa TA-CMU de *T. versicolor* mostró incremento de actividades enzimáticas de lacasas extracelulares y MnPs respecto a las control bajo la adición de rastrojo de maíz (*Zea mays*). En ese sentido, el rastrojo de maíz sólido resultó ser el mejor inductor de actividad para las tres principales enzimas del complejo ligninolítico. Por otro lado, se reporta capacidad de la cepa de realizar modificaciones a la pared celular secundaria de las fibras de maíz durante las primeras semanas de contacto, como parte del proceso de delignificación. Debido a lo anterior se sugiere que la cepa TA-CMU puede ser empleada para el tratamiento de distintos residuos agrícolas.

LITERATURA CITADA

- [1] Akin, D. E., Sethuraman, A., Morrison, III W. H., Martin, S. A., Eriksson, K. L. (1993). Microbial delignification with white rot fungi improves forage digestibility. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 4274-4282.
- [2] Arantes, A., Ferreira-Milagres, A.M. (2007). The synergistic action of ligninolytic enzymes (MnP and Laccase) and Fe^{3+} reducing activity from white-rot fungi for degradation of Azure B. *Enzyme and Microbial Technology*, 42, 17–22.
- [3] Barrasa, JM., Camero, S., Martínez, AT., Ruel, L. (1995). Ultrastructural aspects of wheat Straw delignification by *Phaneropchaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*. *Applied Microbial Biotechnology*, 43:766-770.

- [4] Berovic, B.B. (2007). *Grifola frondosa* (Dicks, Fr.) S.F. Gray (Maitake Mushroom): Medical Properties, Active Compounds and Biotechnological Cultivation. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 9, 000-000.
- [5] Bietti, M., Baciocchi, E., Steenken, S. (1998). Lifetime, reduction potential and base-induced fragmentation of the veratryl alcohol radical cation in aqueous solution. Pulse radiolysis studies on a ligninase 'mediator'. *The Journal of Physical Chemistry A*, 102:7337-7342.
- [6] Bourbonnais, R., Paice, M.G. (1990). Oxidation of non-phenolic substrates: an expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters*, 267, 99-102.
- [7] Candeias, L.P., Harvey, P.J. (1995). Lifetime and reactivity of the veratryl alcohol radical cation—implications for lignin peroxidase catalysis. *The Journal of Biological Chemistry*, 270:16745-16748.
- [8] Carvalho, M.E.A., Monteiro, M.C., Santanna, G.L. (1999). Laccase from *Trametes versicolor*. Stability at Temperature and Alkaline Conditions and Its Effect on Biobleaching of Hardwood Kraft Pulp. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 77-79: 723-733.
- [9] Carlile, M.J., Watkinson, S.C., Gooday, G.W. (2001). *The fungi* (Second editions). London: Academic Press.
- [10] Couto, S. R., Gundín, M., Lorenzo, M., & Sanromán, M. Á. (2002). Screening of supports and inducers for laccase production by *Trametes versicolor* in semi-solid-state conditions. *Process Biochemistry*, 38(2), 249-255.
- [11] Couto, S. R., Sanromán, M. A. (2005). Coconut flesh: a novel raw material for laccase production by *Trametes hirsute* under solid-state conditions. Application to Lissamine Green B decolourization. *Journal of Food Engineering* 71:208-213.
- [12] Dávila, G., Vázquez, D.R. (2001). Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales. *Mensaje Bioquímico* 30: 29-55.
- [13] Dorado, J., Almendros, G., Camarero, S., Martínez, A. T., Vares, T. Hatakka, A. (1999). Transformation of wheat straw in the course of solid-state fermentation by four ligninolytic basidiomycetes. *Enzyme and Microbial Biotechnology* 25: 605-612.
- [14] Eriksson, K., Blanchette, R., Ander, P. (1990). Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. *Springer-Verlag*, New York.
- [15] Gutiérrez, A., Bocchini, P., Galleti, G.C., Martínez, A.T. (2006). Analysis of lignin-polysaccharide complex formed during grass linoni degradation by cultures of *Pleurotus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 1928-1934.

- [16] Gutiérrez del Río, J.C., Martínez-Íñigo, M.J., Martínez, M.J., Martínez, A.T. (2001). Production of New Unsaturated Lipids during Wood Decay by Lignolytic Basidiomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(3), 1344–1350.
- [17] Hammel, K.E., Cullen, D. (2008). Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. *Current Opinion in Plant Biology*, 11:349–355.
- [18] Hatakka, A. (1994). Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiology Reviews*, 13:125–35.
- [19] Hofrichter, M., Vares, T., Kalsi, M., Galkin, S., Scheibner, K., Fritsche, W., Hatakka, A. (1999). Production of Manganese Peroxidase and Organic Acids and Mineralization of ¹⁴C-Labelled Lignin (¹⁴C-DHP) during Solid-State Fermentation of Wheat Straw with the White Rot Fungus *Nematoloma frowardii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1864–1870.
- [20] Iqbal, H. M. N., Asgher, M., Bahtti, H. N. (2011). Optimization of physical and nutritional factors for synthesis of lignin degrading enzymes by a novel strain of *Trametes versicolor*. *Bioresources Technology* 6 (2): 1273-1287.
- [21] Jalc, D., Nerud, F., Zitnan, R., Siroka, P. (1996). The effect of white-rot basidiomycetes on chemical composition and in vitro digestibility of wheat straw. *Folia Microbiologica* (Praha), 41: 73-75
- [22] Kirk, T. K., Schultz, E., Cornnors, W. J., Lorenz, L. F., Zeikus, J. G. (1978). Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochate chrysosporium*. *Archives of Microbiology*, 117: 277-285.
- [23] Landolo, D., Amore, A., Birolo, L., Leo, G., Olivieri, G., Faraco, V. (2011). Fungal solid-state fermentation on agro-industrial wastes for acid wastewater decolorization in a continuous flow packedbed bioreactor. *Bioresource Technology* 102: 7603–7607.
- [24] Le Gall, H., Philippe, F., Domon, J.M., Gillet, F., Pelloux, J., Rayon, C. (2015). Cell Wall Metabolism in Response to Abiotic Stress. *Plants*, 4, 112-166.
- [25] Leonwicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhangen, D., Wojtas-Wasilewska, M., Cho, N.S. (1999). Biodegradation of lignin by white-rot fungi. *Fungi Genetics and Biology*, 27, 175-185.
- [26] Levin, L., Forchiassin, F. (2012). Contributions to research on white-rot fungi, lignin-degrading enzymes, and their industrial and environmental applications. *Fungi: Types, Environmental Impact and Role in Disease*.

- [27] Lorenzo, M., Moldes, D. Sanroman, M.A. (2006). Effect of heavymetals on the production of several laccase isoenzymes by *Trametes versicolor* and on their ability to decolorize dyes. *Chemosphere*, 63: 912-917.
- [28] Moldes, D., Lorenzo, M., & Sanromán, M. A. (2004). Different proportions of laccase isoenzymes produced by submerged cultures of *Trametes versicolor* grown on lignocellulosic wastes. *Biotechnology letters*, 26(4), 327-330.
- [29] Nagai, M., Sato, T., Watanabe, H., Saito, K., Kawata, M., Enei, H. (2002). Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinus edodes*, and decolorization of chemically different dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60: 327-335.
- [30] Nigam, P.S. Singh, A. (2011). Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, 37, 52–68.
- [31] Osma, J. F., Toca, H. J. L., Rodríguez-Couto, S. (2007). Banana skin: A novel waste for laccase production by *Trametes pubescens* under solid-state conditions: application to synthetic dye decolouration. *Dyes and Pigments*, 75: 32-37.
- [32] Paszczyński, A., Huynh, V.B., Crawford, R. (1985). Enzymatic activities of an extracellular, manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiology Letters*.
- [33] Sanchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances* 27:185-194.
- [34] Schlosser, D., Grey, R., & Fritsche, W. (1997). Patterns of ligninolytic enzymes in *Trametes versicolor*. Distribution of extra-and intracellular enzyme activities during cultivation on glucose, wheat straw and beech wood. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47(4), 412-418.
- [35] Schoemaker, H.E., Piontek, K. (1996). On the interaction of lignin peroxidase with lignin. *Pure and Applied Chemistry*, 68(11), 2089-2096.
- [36] Tomšovský, M., Homolka, L. (2003). Laccase and other ligninolytic enzyme activities of selected strains of *Trametes spp.* from different localities and substrates. *Folia Microbiologica (Praha)* 48(3):413-416.
- [37] Tomšovský, M., Kolařík, M., Pažoutová, S., Homolka, L. (2006). Molecular phylogeny of European *Trametes* (Basidiomycetes, Polyporales) species based on LSU and ITS (nrDNA) sequences. *Nova Hedwigia* 82(3-4) 269-280.

- [38] Urek, R.O., Pazarlioglu, N.K. (2007). Enhanced Production of Manganese Peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50(6), 913-920.
- [39] Valášková, V., & Baldrian, P. (2006). Estimation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Piptoporus betulinus*. *Research in Microbiology*, 157(2), 119-124.
- [40] Valmaseda, M., Martínez, M. J., & Martínez, A. T. (1991). Kinetics of wheat straw solid-state fermentation with *Trametes versicolor* and *Pleurotus ostreatus*—lignin and polysaccharide alteration and production of related enzymatic activities. *Applied microbiology and biotechnology*, 35(6), 817-823.
- [41] Vyas, B. R. M., Volc, J., Sasek, V. (1994). Ligninolytic enzymes of selected white rot fungi cultivated on wheat straw. *Folia Microbiologica* (Praha) 39 (3): 235-240.
- [42] Winquist, E., Moilanena, U., Mettälä, A., Leisola, M., Hatakka, A. (2008). Production of lignin modifying enzymes on industrial waste material by solid-state cultivation of fungi. *Biochemical Engineering Journal* 42:128–132.
- [43] Wong, D.W. (2009). Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157, 174-209.
- [44] Woolridge, E.M. (2014). Mixed Enzyme Systems for Delignification of Lignocellulosic Biomass. *Catalysts*, 4, 1-35.
- [45] Yamanaka, R., Soares, C. F., Mathews, D. R., Machado, K. M. G. (2008). Ligninolytic enzymes produced by *Trametes villosa* CCB 176 under different culture conditions. *Brazilian Journal of Microbiology* 39: 78 – 84.

CAPÍTULO 3

6.3 REMOCIÓN DE FENOLES PROVENIENTES DE AGUA RESIDUAL PAPELERA Y DEGRADACIÓN DE LICOR NEGRO POR LA CEPA SILVESTRE TA-CMU DE *Trametes versicolor*

Erick Magaña-Ruiz^a, Ma. Soledad Vázquez-Garcidueñas^b, Gerardo Vázquez-Marrufo^a

^aCentro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. ^bDivisión de estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. E-mail: gvazquezmarrufo@yahoo.com.mx

RESUMEN

Se empleó a la cepa TA-CMU de *Trametes versicolor* para el biotratamiento de dos residuos provenientes del proceso de blanqueo del papel, el licor negro y el agua residual, determinándose tanto el decremento en la absorbancia como la actividad enzimática de ligninasas. Respecto a la actividad de lacasa extracelular, éstas fueron mayores en el Licor Negro (404.5 U L^{-1}) en comparación del agua residual papelerera (39.7 U L^{-1}). En cuanto a las actividades de las peroxidasas, también se obtuvieron valores superiores en los medios con Licor Negro (62.3 U L^{-1} para la MnP y 128.1 U L^{-1} para la LiP) que en aquellos con Agua Residual Papelerera (23.4 U L^{-1} para la MnP y 87.9 U L^{-1} para la LiP). De forma simultánea, se cuantificó espectrofotométricamente el decremento en la coloración del Agua Residual Papelerera y Licor Negro. En estos ensayos el porcentaje de decoloración fue superior al 60% para ambos casos. Se llevaron a cabo ensayos de biosorción en medio líquido en los cuales se pudo observar que el micelio inactivado es capaz de fijar mayor cantidad de moléculas coloridas por encima del 20%, en presencia de Licor Negro y Agua Residual Papelerera durante los primeros cuatro y nueve días de incubación, respectivamente. De forma complementaria se realizó la determinación de fenoles al inicio y término de las cinéticas de decoloración, observándose que el porcentaje de fenoles remanentes fue mayor en el Agua Residual (48.70%) respecto al Licor Negro (39.73 %), datos que se correlacionan con las actividades enzimáticas de ligninasas reportadas. Finalmente se evaluó la capacidad oxidativa de las enzimas presentes en un extracto enzimático crudo en la decoloración de licor negro y agua residual papelerera. En éstos ensayos sólo el Licor Negro fue degradado de manera significativa (44.3 %) durante las primeras horas de incubación.

Palabras clave: Decoloración, adsorción, ligninasas, capacidad oxidativa.

SUMMARY

The strain TA-CMU of the genus *Trametes versicolor* was employed for the biotreatment of two residues from the paper bleaching process, the black liquor and paper wastewater. In this process, the decrease in absorbance and the ligninases enzyme activity was determined for both residues, the black liquor and wastewater. Extracellular laccase activity was higher in the black liquor with 404.5 U L^{-1} compared to the paper wastewater with 39.7 U L^{-1} . Peroxidases activities showed higher values in the media with black liquor too (62.3 U L^{-1} for MnP and 128.1 U L^{-1} for LiP) than in those with paper wastewater (23.4 U L^{-1} for MnP and 87.9 U L^{-1} for LiP). Simultaneously, the decrease in the coloration of the paper wastewater and black liquor was spectrophotometrically quantified. In these tests, the decolorization percentage was over 60% for both cases. Adsorption tests were carried out in liquid medium in which it was observed that the inactivated mycelium has been capable of fixing largest amounts of colored molecules above 20% in the presence of black liquor and paper wastewater during the first four and nine days of incubation respectively. To complement this part, the determination of phenols at the beginning and end of the kinetics of color fading is performed. It was observed that the percentage of remaining phenols was higher in the wastewater (48.70%) compared to the black liquor (39.73 %). These data are correlated with the enzymatic activities of ligninases here reported. Finally, the oxidative capacity of the enzymes in the discoloration process of black liquor and wastewater present in a crude enzyme extract is evaluated. In these tests, only black liquor was degraded significantly (44.3 %) during the first hours of incubation.

Keywords: *Bleaching, adsorption, ligninases, oxidative capacity.*

INTRODUCCIÓN

La producción, uso y reciclaje del papel puede tener diversos efectos adversos sobre el medio ambiente. Los residuos generados como parte de la elaboración del papel pueden ser contaminantes de agua, tierra y aire. En el proceso de fabricación de papel se pueden utilizar diferentes tipos de materiales como es el caso de los provenientes de fibras vegetales, madera, el bagazo de caña, mezclas de fibras vegetales; mezclas de papel de desperdicio (Lundell *et al.*, 2011). El papel se fabrica a través de la separación de fibras celulósicas de origen vegetal.

La lignina es un aglutinante de las fibras de celulosa, que es un complejo polímero amorfo polifenólico, le da firmeza y rigidez al conjunto de fibras de celulosa; confiere impermeabilidad al agua de los vasos del xilema y también es una barrera físico-química contra los ataques por microorganismos, es de color café y no posee tiempo de fusión definido (Helmy y El-Melgi, 2002). La producción de pulpa consiste en liberar las fibras celulósicas contenidas en el segmento vegetal que es la lignina; por lo tanto el objetivo en la producción papelera es eliminar la lignina de los tejidos de las plantas (figura 1).

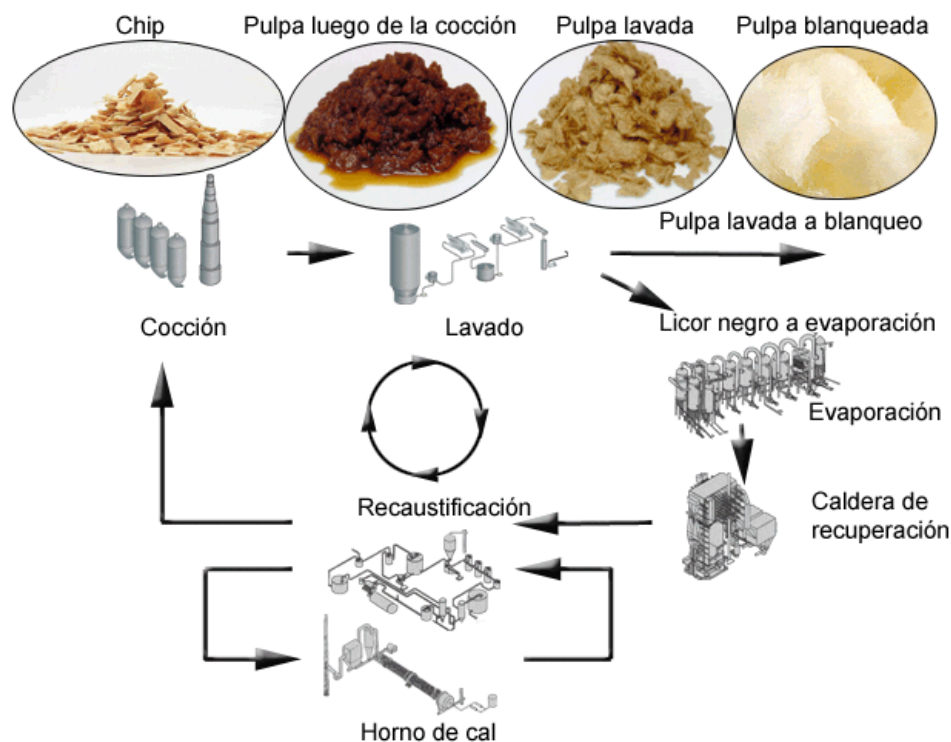


Figura 1. Separación del licor negro a través del proceso de pulpeo (tomado de Saarela *et al.*, 2007).

Para elaborar la pulpa, es necesario liberar las fibras de los materiales lignocelulósicos con un tratamiento químico, mecánico o con una combinación de ambos; el tratamiento que se le da a los materiales fibrosos se conoce como pulpeo (Braun *et al.*, 2005). La producción de pulpa y la fabricación de papel tienen un alto consumo de energía. Normas como la ISO 9000 y la ISO 14000 son ejemplos claros de calidad y gestión ambiental, las cuales se han ido implementando en todas las empresas, entre las que se encuentra la industria papelera, puesto que es una de las empresas que más recursos hídricos emplea durante su ciclo productivo, razón por la cual ha estado bajo vigilancia por parte de los entes reguladores. Las autoridades ambientales han prestado especial atención en los dos procesos papeleros que producen mayor impacto ambiental: la máquina de papel y las

corrientes contaminantes del molino de pulpa. La máquina de papel requiere alto consumo de agua, al finalizar el proceso el agua queda cargada de productos químicos que son adicionados para mejorar la calidad del papel, la carga orgánica que se le adiciona al agua es alta y de difícil degradación ya que la celulosa es un polímero natural altamente resistente a la oxidación (Wodrige, 2014). Como solución se han plantado la incorporación de plantas de tratamiento en los efluentes y la implementación del cierre del ciclo del agua dentro de la máquina de papel para que el agua pueda ser utilizada lo más eficientemente posible. Además, las corrientes que provienen de los gases de combustión de las calderas y de los gases generados durante la digestión de la madera, producen principalmente monóxido de carbono (CO) y óxidos de azufre, combinado con material proveniente del carbón que no se ha quemado completamente (Yadav *et al.*, 2010).

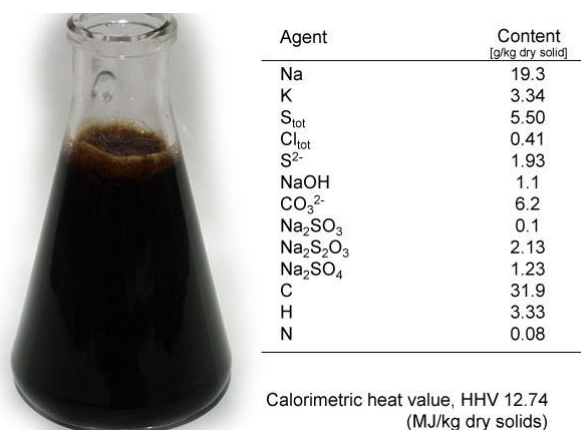
La corriente líquida más importante que produce el proceso de pulpeo es llamado licor negro, cuyo color se debe a la presencia de lignina de alto peso molecular (Peña, 2003), además de quinonas, grupos carboxílicos, radicales de hidroperóxido y grupos fenólicos (Mussatto *et al.*, 2007). El licor negro es una sustancia muy contaminante debido a su alto pH (12 a 13 unidades), a la gran carga de material orgánico disuelto, electrolitos e iones inorgánicos (Kralsson *et al.*, 2013); estos componentes contribuyen a la demanda química de oxígeno (DQO), lo cual conduce a la acumulación de una masa pastosa en el lecho del río, en donde es depositado, ocasionando la destrucción de todo tipo de vida, lo cual hace que sea poco biodegradable en condiciones normales como las encontradas en dichos cuerpos de agua.

El licor negro sin embargo, posee un alto valor energético para la industria, porque contiene compuestos orgánicos disueltos que equivalen a más del 50% del peso de madera procesada y a casi la totalidad de los reactivos utilizados en el proceso de cocción (Andreuccetti *et al.*, 2011). Las sustancias disueltas se pueden reutilizar en el proceso de pulpeo por medio de plantas recuperadoras de soda, evaporando y quemando la materia orgánica para recuperar hidróxido de sodio para ser usado nuevamente en el proceso de pulpeo, además la energía calórica liberada por la combustión del licor negro se puede aprovechar para producir vapor y energía siendo este el principal uso que se le ha dado a este residuo (Yang *et al.*, 2003). El inconveniente que presenta esta práctica es la rentabilidad, puesto que una instalación de este tipo requiere una producción muy alta, de lo contrario es más rentable desechar el licor negro y estar permanentemente adquiriendo más soda.

De manera adicional, estudios recientes han encontrado que la lignina contenida en el licor negro produce derivados para ser usados en cosméticos, pinturas, aglomerantes, alimento para ganado que tienen un valor más alto que su equivalente en energía, pero como ésta se quema totalmente, no hay disponibilidad (Rojas *et al.*, 2006; Vishtal y Kraslawski, 2011; Darweesh, 2014; Vélez *et al.*, 2014).

El licor negro derivado de procesos de pulpeo alcalinos (a la sosa), posee 5 elementos que están presentes en mayores concentraciones: sodio, azufre, carbono hidrógeno y oxígeno (figura 2). En términos de moléculas, el licor negro está compuesto principalmente por hidróxido de sodio sin reaccionar, materia orgánica en forma de lignina y celulosa, así como aceites vegetales y algunas cargas inorgánicas como azufre y carbonatos (Andreuccetti *et al.*, 2011). No obstante, la composición exacta del licor negro depende de los diferentes procesos de cocción que se implementa en cada industria de papel (Rojas *et al.*, 2006).

Figura 2. Componentes típicos de licor negro (tomado de Saarela *et al.*, 2007).



Cuando las plantas de pulpa vierte el licor negro directamente a un cuerpo de agua adyacente, comúnmente un río, produce un impacto ambiental considerable puesto que el pH (12-13) afecta el equilibrio biológico; además la gran carga de materia orgánica se convierte en alimento para los microorganismos que pueden proliferar en escala exponencial, dejando sin oxígeno al cuerpo de agua e impidiendo el proceso de biodegradación. Por estos motivos se han venido realizando investigaciones para nuevos modelos de tratamiento de aguas residuales derivadas de procesos de pulpeo alcalino.

Los hongos ligninolíticos han sido ampliamente estudiados para su aplicación en procesos biotecnológicos, uno de ellos el de biopulpeo (Wodrige, 21014). Su utilización en procesos de biorremediación se basan en la falta de especificidad que poseen las enzimas del sistema ligninolítico de los hongos degradadores de madera (Pointing, 2001; Ralph y Catcheside, 2002). Actualmente son escasos los estudios de cepas de hongos de

podredumbre blanca en el biotratamiento del llicor negro. Es por ello que el empleo de aislados silvestres de hongos resulta una alternativa en los procesos de tratamiento de aguas residuales y productos derivados de procesos de delignificación de la industria papelera.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa de estudio

Se estudió la cepa TA-CMU de *Trametes versicolor* aislada en el municipio de Pátzcuaro del estado de Michoacán y depositada en el Cepario Michoacano Universitario del CMEB-UMSNH.

Medios de cultivo

Se utilizó el medio sólido agar de dextrosa y papa (PDA, Difco™, USA) para el mantenimiento de la cepa y la obtención de inóculos para los ensayos de cinética enzimática. El medio se preparó de acuerdo a las instrucciones del proveedor y posteriormente se esterilizó a 121°C y 15 lbs/in² durante 15 minutos.

Para la realización de cinéticas de crecimiento y determinación de actividad enzimática en medio líquido se empleó el medio completo PDB (Difco™, USA), para los ensayos de fermentación en sustrato sólido se empleó el medio completo MEA (Difco™, USA), los cuales se prepararon de acuerdo a las instrucciones del proveedor y se esterilizó de la manera previamente descrita.

Obtención de inóculos

Se incubó la cepa TA-MU de *Trametes versicolor* en placas de PDA de 6 mm de diámetro a 28°C para la generación de inóculos (Yamanaka *et al.*, 2008). Se permitió el desarrollo del micelio hasta que cubrió $\frac{3}{4}$ partes de la superficie del medio de cultivo y posteriormente se removieron del límite de la colonia inóculos con un sacabocados de 6 mm de diámetro, los cuales fueron utilizados para los ensayos en medio líquido.

Cultivo en medio líquido

Los cultivos en medio líquidos de la cepa TA-CMU se realizaron en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 25 mL de medio líquido PDB. Dicho medio fue inoculado con tres cilindros de 6 mm de diámetro obtenidos de la manera previamente descrita. Los cultivos

así inoculados se incubaron a 28 °C y 120 rpm. El crecimiento se determinó midiendo el peso seco a distintos tiempos de incubación, mientras que para la determinación de las actividades enzimáticas que se describen posteriormente se tomaron alícuotas del medio extracelular en campana de flujo laminar. Tanto las cinéticas de crecimiento como las de actividad se realizaron en tres ensayos independientes por triplicado y el resultado de las mediciones fue promediado, obteniéndose la desviación estándar para cada punto de la curva de crecimiento. Para evaluar si las diferencias en la producción de biomasa en cada punto de la cinética eran significativas se realizó un análisis ANOVA y una prueba a Tukey ($p < 0.05$) empleando el paquete Prism 3.0.

Determinación de la actividad de lacasa extracelular

La determinación de actividad enzimática de lacasa extracelular se realizó cuantificando la formación del catión ABTS^{•+} de acuerdo a Nagai *et al.* (2002). La mezcla de reacción se preparó de la siguiente manera: 800 µL de buffer de fosfatos pH 4 (0.1 M de ácido cítrico, 0.2 M de fosfato de sodio dibásico), 100 µL de ABTS 1M (2, 2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) y 100 µL del sobrenadante del medio de cultivo centrifugado; para ello se tomó una alícuota de 300 µL del medio de cultivo el cual se centrifugó a 1 500 x g durante 10 minutos. La mezcla de reacción se incubó a 30°C durante 20 min al término de los cuales se agregaron 100 µL de TCA (ácido tricloro acético 5% (v/v) para detener la reacción. La actividad enzimática fue cuantificada espectrofotométricamente a 420 nm, utilizando el valor de ϵ del ABTS de 36 M⁻¹cm⁻¹.

Determinación de la actividad de lignin peroxidasa

La actividad enzimática de LiP se determinó cuantificando la oxidación del alcohol veratrílico a veratraldehído de acuerdo a Tien y Kirk (1988). La mezcla de reacción contenía 700 µL de buffer de tartratos 0.3 mM pH 2.5; 50 µL de alcohol veratrílico 10 mM, 50 µL de peróxido de hidrógeno 5 mM como iniciador de la reacción enzimática y 200 µL del sobrenadante del medio de cultivo centrifugado como se describió previamente. La mezcla de reacción se incubó a 25°C durante 2 minutos. La actividad enzimática fue cuantificada espectrofotométricamente a 310 nm, utilizando el valor de ϵ del veratraldehído de 9,3 M⁻¹cm⁻¹.

Determinación de la actividad de manganeso peroxidasa

La actividad enzimática de MnP se determinó cuantificando la formación del complejo tartrato de manganeso de acuerdo a Pascynski *et al.* (2003). La mezcla de reacción contenía 500 μL de buffer de tartrato de sodio 0.1 mM pH 5; 75 μL de MnSO_4 10 mM, 75 μL de 2,6-dimetoxifenol 10 mM, 50 μL de peróxido de hidrógeno 5 mM como iniciador de la reacción enzimática y 300 μL del sobrenadante del medio de cultivo centrifugado como se describió previamente. La mezcla de reacción se incubó a 25°C durante 2 minutos. La actividad enzimática fue cuantificada espectrofotométricamente a 334 nm, utilizando el valor del ϵ del tartrato de manganeso de 18,3 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Para el cálculo de la actividad enzimática se empleó la siguiente fórmula:

$$AE = \frac{(Abs.)(VT)}{(\epsilon)(Vm)}$$

Donde, la actividad enzimática (AE) es igual al producto de la absorbancia de la mezcla de reacción (Abs) por el volumen total de la muestra (VT) dividido entre el producto del coeficiente de extinción molar del cromóforo (ϵ) por el volumen del sobrenadante del medio de cultivo adicionado a la mezcla de reacción (Vm).

Ensayos de Biodegradación y Bioadsorción

Las muestras de agua residual y licor negro fueron colectadas de la empresa “Crisoba Industrial S.A. de C.V.”, ubicada en el municipio de Morelia. Las muestras de licor negro se colectaron a partir de la etapa de lavado dentro del procesamiento y preparación de la pulpa para papel. Las muestras de agua residual se colectaron en un frasco de vidrio lavado y esterilizado directamente de un cárcamo proveniente de la industria con salida al río adyacente a la planta, en el área de descarga de agua residual. Tanto la muestra de licor negro como la de agua residual se conservaron en el laboratorio a 4°C previamente a su análisis, lo cual se realizó la misma semana de colecta.

La degradación de compuestos fenólicos presentes en agua residual (AR) y en la solución de licor negro (LN) al 1% (v/v) fue determinada espectrofotométricamente de acuerdo a la longitud de onda específica para cada uno de ellos, fenoles 280 nm, y quinonas 330 nm, para el caso del LN de acuerdo con Marín-Galvín (1988). Los cultivos inoculados de la manera previamente descrita se incubaron en oscuridad a 28 °C en agitación constante a 125 rpm. Como blanco se utilizaron matraces cuyos inóculos fúngicos fueron inactivados

a 50 °C durante 5 minutos. Para evaluar la fracción de fenoles que no era degradada por vía enzimática se llevó a cabo un ensayo de bioadsorción, el cual se realizó bajo las condiciones de medio de cultivo previamente descritas, los matraces fueron inoculados con 6 pellets de micelio provenientes de cultivos líquidos con PDB, tomados del sexto día de incubación e inactivados 121°C y 15 lbs/in² durante 5 minutos. Para ambos ensayos se evaluó el cambio de absorbancia cada 24 h a partir de alícuotas de 1 mL del medio de cultivo fúngico centrifugado de la manera previamente descrita.

La decoloración fue calculada de acuerdo con Zeng *et al.* (2013) cuantificando el decremento en la absorbancia máxima de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100$$

Donde A₀ es la absorbancia inicial y A es la absorbancia final.

Determinación de fenoles totales por el método de Folín-Ciocalteu

La concentración de fenoles totales en extractos fue medida espectrofotométricamente en una reacción colorimétrica de óxido-reducción. El agente oxidante utilizado fue el reactivo de Folín-Ciocalteu. Para la preparación de la curva de calibración se utilizó una solución estándar de ácido tánico 2.5 % (w/v) en acetona 70% (v/v) en la cual se tomaron volúmenes de 0 mL a 1 mL en intervalos de 2 mL completándose el volumen de cada uno con agua destilada estéril. A cada uno de los estándares y muestras previamente preparados se le adicionaron 5 mL de Na₂CO₃ al 2% y se sonicó por 5 minutos. Posteriormente se adicionaron 0.5 mL de reactivo de Folín-Ciocalteu 1N y se dejó reposar por 2 horas. La absorbancia fue medida a 760 nm. Los resultados fueron expresados en mg de ácido tánico por gramo de solución de AR y LN (mg TA/g extracto) (Bärlocher y Garça, 2005).

Ensayos de decoloración con extracto enzimático crudo

Para corroborar que las actividades de enzimáticas reportadas se debían a las enzimas contenidas en el líquido extracelular se realizaron ensayos de decoloración con extracto crudo. Para ello se incubaron por triplicado matraces en medio líquido PDB bajo las

condiciones mencionadas anteriormente. De acuerdo a los picos máximos de actividades reportadas, al noveno día de incubación se tomaron alícuotas del medio extracelular para la realización de los ensayos. Se colocaron en tubos de microcentrífuga con capacidad de 1.5 mL con 900 μ L de Naranja de Metilo (150 mg/L), AR y LN (1% v/v), a los cuales se les agregaron 100 μ L del extracto crudo, se homogeneizó mediante vórtex y posteriormente se incubó con agitación a 28°C y 125 rpm. El seguimiento de la decoloración se realizó cada 2 horas durante 12 horas midiendo el decremento en la absorbancia específica para cada una de las muestras, naranja de metilo a 465 nm, AR y LN a 280 nm.

RESULTADOS

Cinéticas de crecimiento y oxidación en medio sólido

Estas cinéticas se realizaron con la finalidad de identificar la concentración máxima de agua residual bajo la cual el hongo podía crecer sin que se inhibiera su desarrollo, así como su actividad oxidativa en dicho medio, lo cual se observó por decoloración de los medios.

En el caso de los ensayos en placas de agar con agua residual papelera se observó que no hay diferencias significativas en los cultivos cuyas concentraciones de agua residual iban del 10 al 30 % en comparación con el resto de las concentraciones (figura 3). A concentraciones elevadas de agua residual se retrasó la velocidad de crecimiento en la cepa de estudio, sin embargo en todos los casos se llegaba a fase estacionaria de crecimiento al séptimo día de incubación, aún al 100% de concentración.

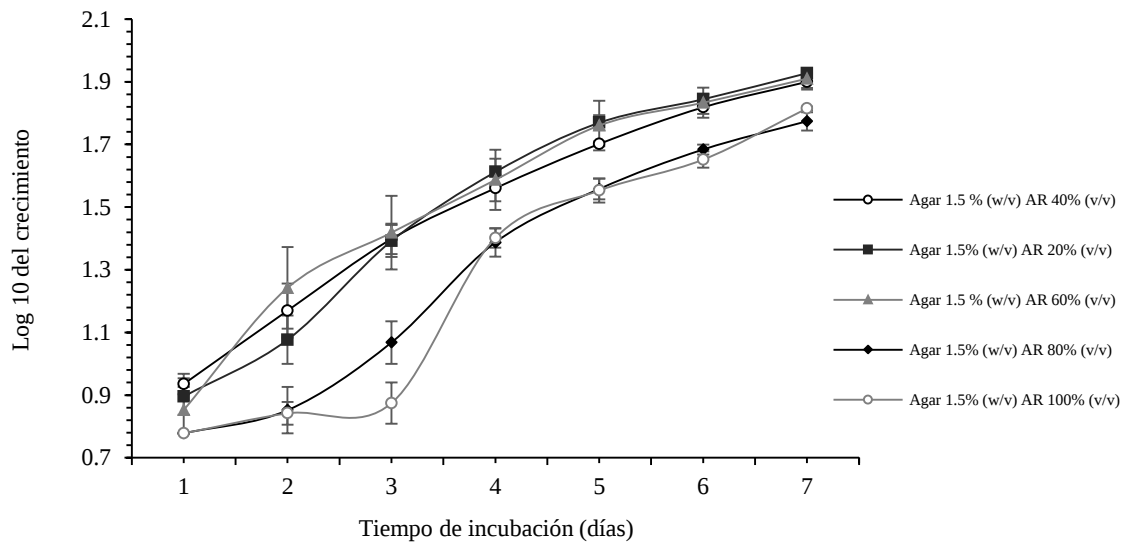


Figura 3. Cinética de crecimiento de la cepa TA-CMU en agar en presencia de distintas concentraciones de agua residual papelerera.

Los ensayos de en placas de medio AEM con agua residual papelerera (figura 4) muestran que no existen diferencias significativas en los cultivos a las diferentes concentraciones (10-100%) en comparación con los medios que contenían agar. Al igual que en la cinética de crecimiento en agar, se observó que a concentraciones elevadas de agua residual se retrasaba la velocidad de crecimiento en la cepa de estudio, sin embargo en todos los casos, a excepción de los medios con 100% de agua residual, llegó a fase estacionaria de crecimiento al séptimo día de incubación

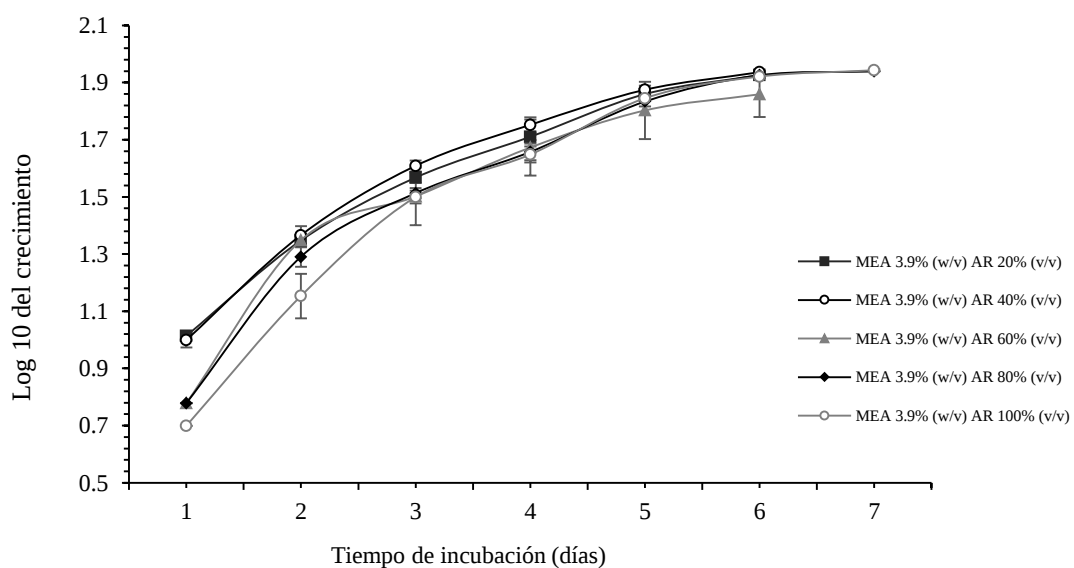


Figura 4. Cinética de crecimiento de la cepa TA-CMU en AEM en presencia de distintas concentraciones de agua residual papelerera.

Se realizaron cinéticas de degradación/oxidación de licor negro en placas con EMA (2% w/v) encontrándose que únicamente aquellos medios que contenían éste residuo a una concentración del 1% no inhibían el desarrollo del micelio (figura 5), razón por la cual el crecimiento en el resto de concentraciones del residuo no se muestran en la gráfica.

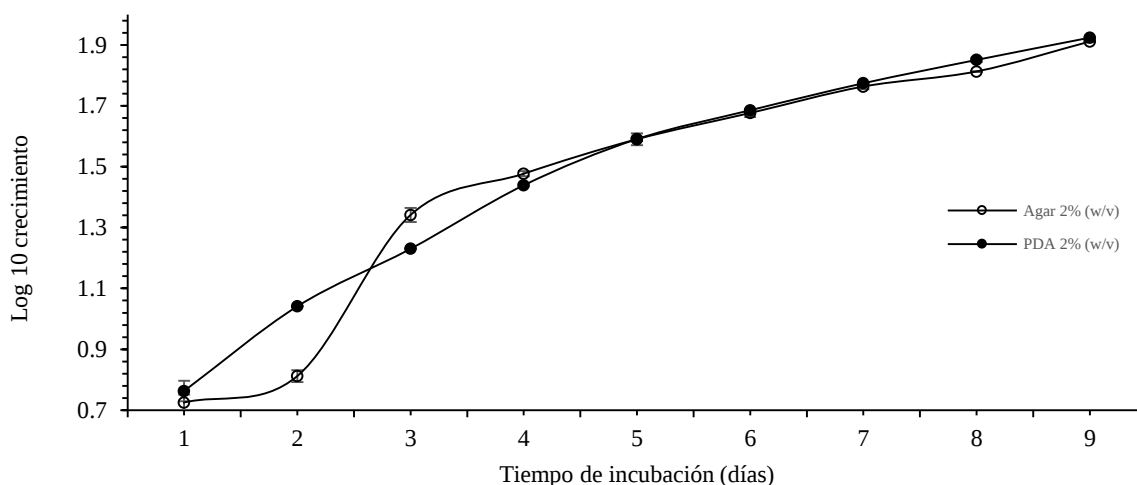


Figura 5. Cinética de crecimiento de la cepa TA-CMU en AEM en presencia de LN a distintas concentraciones.

En el caso de los ensayos en placas de agar y PDA con licor negro se encontró que no hay diferencia significativa en el crecimiento del micelio en ambos medios de cultivo (figura 6).

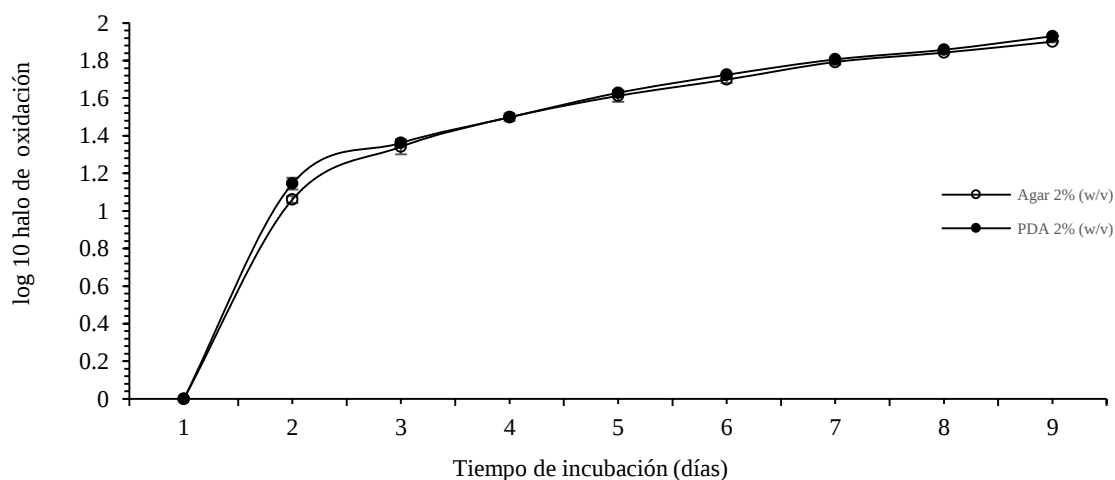


Figura 6. Cinética de oxidación de la cepa TA-CMU en AEM en presencia de LN a distintas concentraciones.

En cuanto a la cinética de oxidación, no se observaron diferencias significativas en el potencial oxidativo para las dos condiciones (medios agar y AEM), sin embargo se encontraron diferencias en cuanto a la morfología colonial (figura 7), ya que en los medios que contenían únicamente agar, la producción de micelio aéreo se mantuvo limitada en comparación con los medios con AEM.

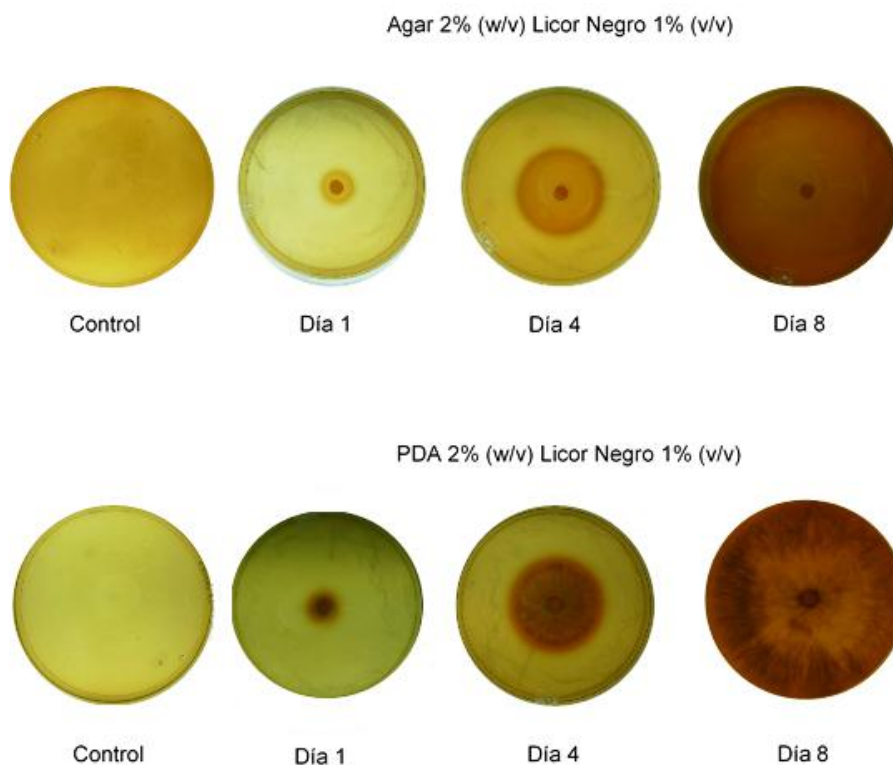


Figura 7. Cinética de oxidación en placa de licor negro 1% (v/v). Se muestra la oxidación en medio sólido de licor negro (1% v/v y glucosa 2% w/v) por parte de la cepa silvestre TA-CMU de *T. versicolor*.

En la figura 8 se muestra la curva de crecimiento de la cepa TA-CMU en agua residual papelerera, en la que se observó un claro efecto inhibitorio en la producción de biomasa respecto a la cinética control (basal). Mientras que el cultivo basal muestra una fase logarítmica desde el inicio de la incubación hasta el día 7, en el que entra en fase estacionaria, el cultivo con AR muestra una fase lag de tres días, seguida de una incipiente fase de crecimiento entre el tercer y cuarto día de incubación, en el que entra en fase estacionaria con escasa producción de biomasa.

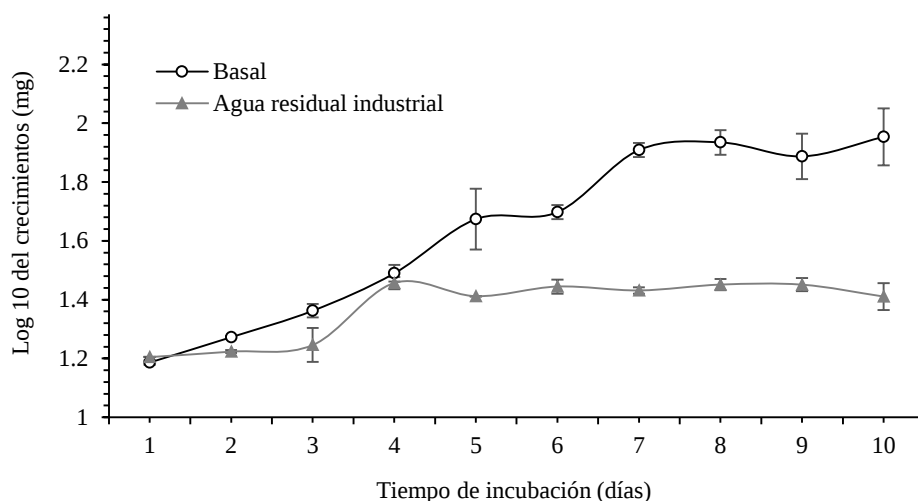


Figura 8. Cinética de crecimiento de la cepa silvestre TA-CMU de *T. versicolor* en medio líquido PDB basal y adicionado con agua residual papelerá (100 % v/v). Los cultivos se incubaron a 28°C y 120 rpm, determinándose el aumento de biomasa gravimétricamente.

Ensayos de actividad enzimática

La actividad enzimática de ligninasas en presencia de licor negro se determinó de la manera anteriormente descrita (figura 9). La actividad enzimática de LiP mostró valores altos desde el primer día de incubación, los cuales mantuvo durante el resto de la cinética, llegando a un máximo de 128.1 U L⁻¹ al segundo día. Respecto a la actividad de MnP, ésta mostró un incremento significativo de actividad hacia el cuarto día de incubación, manteniéndose estable los siguientes días, hasta alcanzar un máximo de 62.3 U L⁻¹ hacia el octavo día. En el último día de la actividad presentaba prácticamente el mismo nivel adquirido desde el cuarto día de incubación. La actividad de lacasa mostró un incremento de actividad desde el cuarto día, llegando a un pico máximo de 404.5 U L⁻¹ al octavo día de incubación, la cual mantuvo hasta el fin del periodo de incubación.

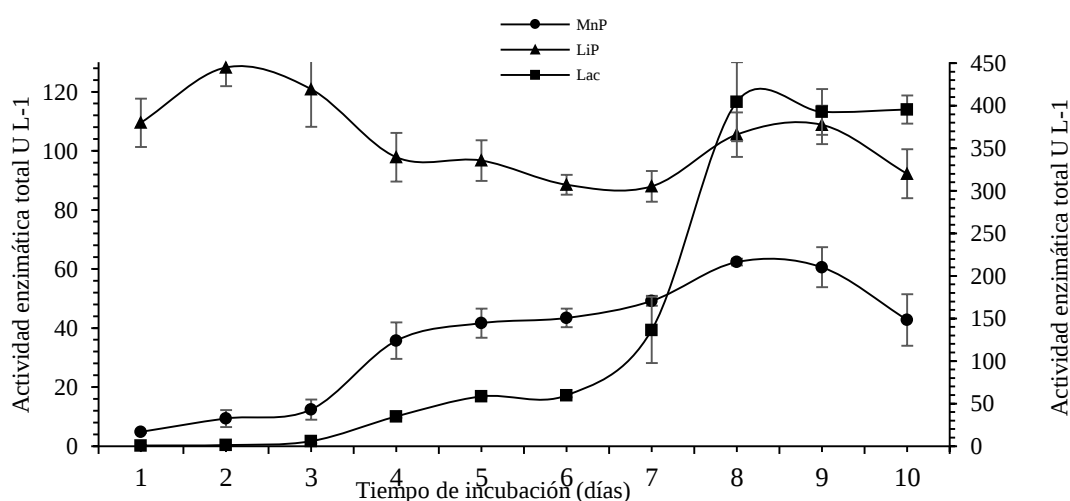


Figura 9. Actividad enzimática de ligninasas de la cepa silvestre TA-CMU de *T. versicolor* en medio líquido suplementado con Licor Negro (1% v/v) y glucosa (2% w/v).

En la figura 10 se puede observar la actividad enzimática de lacasa, LiP y MnP en medio PDB suplementado con agua residual. La curva de la actividad enzimática de lacasa se graficó en el eje secundario. La actividad enzimática de LiP en el cultivo mostró valores incrementados desde el primer día de incubación, llegando a un máximo de 87.9 U L^{-1} al quinto día de incubación, posteriormente disminuyendo a 62.3 U L^{-1} al sexto día y disminuyendo de actividad el resto de la cinética. En el caso de la MnP, ésta mostró un incremento de actividad al tercer día, llegando a un máximo de 23.4 U L^{-1} . La actividad de lacasa extracelular mostró también incremento, con un máximo de 39.7 U L^{-1} al quinto día de incubación.

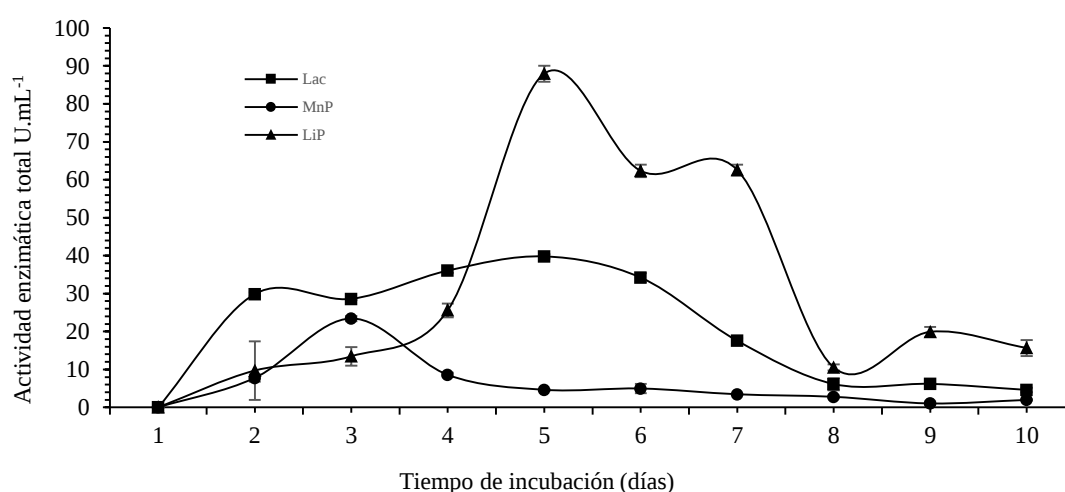


Figura 10. Actividad enzimática de ligninasas de la cepa silvestre TA-CMU de *T. versicolor* en medio líquido con Agua Residual Papelera.

Ensayos de Biodegradación y bioadsorción

Estos ensayos se realizaron con la finalidad de determinar la fracción que era eliminada del medio por vía no enzimática durante el proceso de decoloración tanto del agua residual como del licor negro. Para ello se realizaron ensayos de decoloración por adsorción en pared (bioadsorción) utilizando micelio inactivado, los cuales se compararon con la curva de decoloración por la actividad enzimática de ligninasas (biodegradación).

Se pudo observar que en los medios que contenían agua residual aproximadamente un 21 % de la decoloración se debe a procesos no enzimáticos, ya que el 66.4 % de la decoloración se obtuvo en los medios que contenían el micelio vivo (Figura 11).

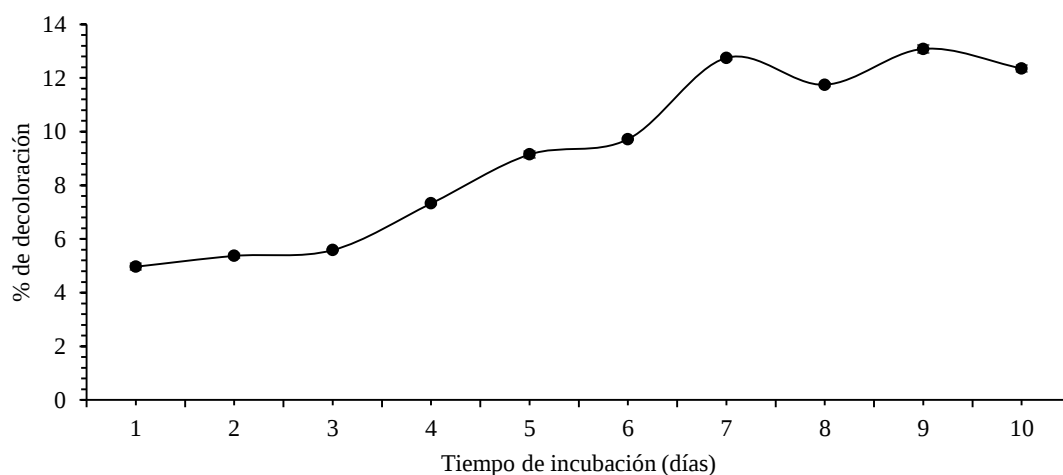


Figura 11. Cinética de decoloración por bioadsorción (micelio inactivado) y biodegradación (micelio vivo) por parte de la cepa TA-CMU de *T. versicolor* en medio líquido con Agua Residual Papelera.

En cuanto a los medios que contenían licor negro, se observa que al cuarto día de incubación hay un descenso en el porcentaje de decoloración, lo que se ve reflejado en el aumento de las absorbancias debido a la actividad de las ligninasas, que no se observa en los medios donde había sido inactivado el micelio (eje vertical secundario) (figura 12).

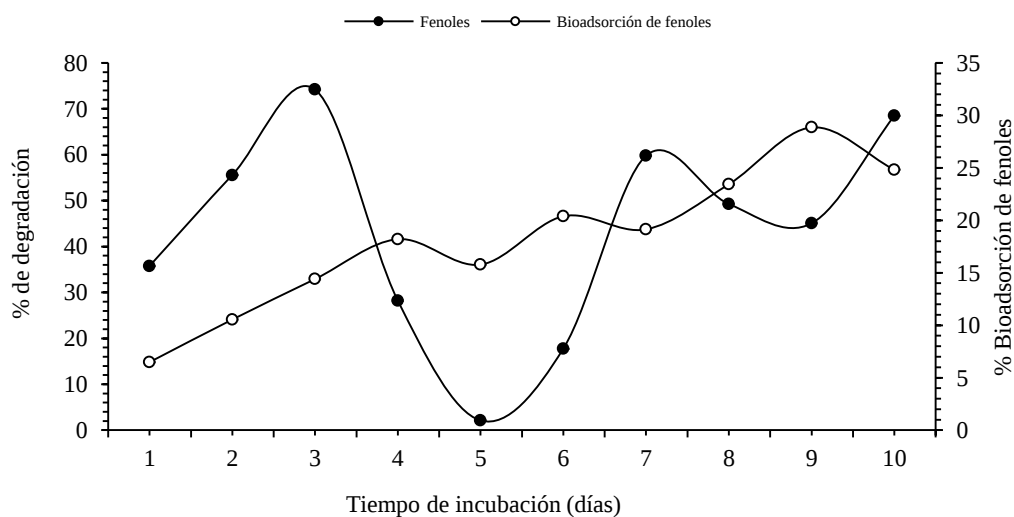


Figura 12. Cinética de decoloración por bioadsorción (micelio inactivado) y biodegradación (micelio vivo) de la cepa TA-CMU de *T. versicolor* en medio líquido con licor negro (1% v/v y glucosa 2% w/v).

Para determinar si la fracción que era decolorada en los medios de cultivo que contenían agua residual papелera y licor negro, correspondía a compuestos fenólicos se determinó cuantitativamente la presencia de fenoles por el Método de Folín-Ciocalteu (figura 13).

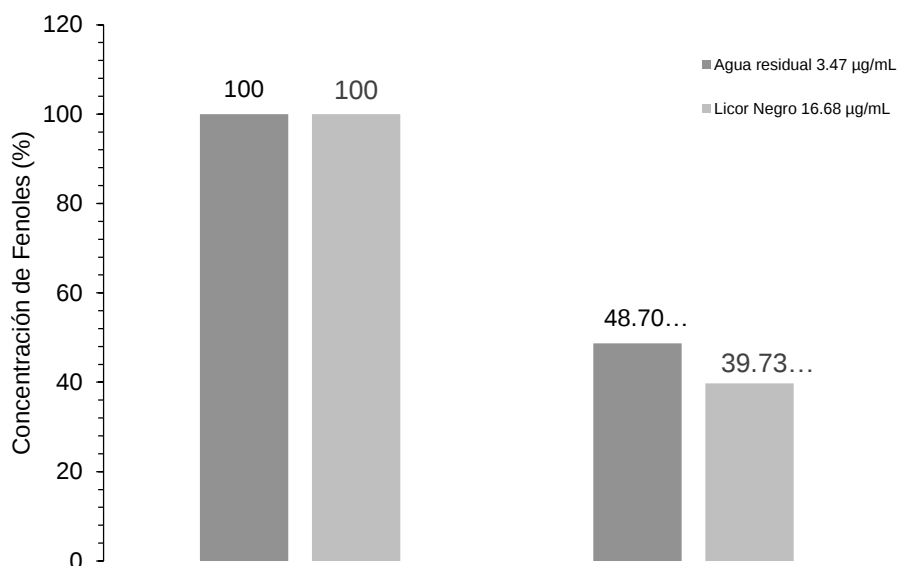


Figura 13. Determinación de fenoles totales provenientes de medios líquidos con licor negro (1% v/v y glucosa 2% w/v) y agua residual papелera con interacción de la cepa TA-CMU de *T. versicolor*.

Se puede observar que en los medios suplementados con agua residual hay mayor degradación de fenoles en comparación con los medios que contenían licor negro.

Ensayos de decoloración con extracto crudo

Con el objetivo de conocer el potencial del extracto enzimático crudo en la decoloración de agua residual papелera y licor negro, se realizaron ensayos de la manera anteriormente descrita.

En la figura 14 se puede observar que el contenido de compuestos fenólicos en ambas muestras es variado, en ese sentido las muestras de licor negro mostraron mayor susceptibilidad a la decoloración que aquellas con agua residual, cuya decoloración fue poco significativa.

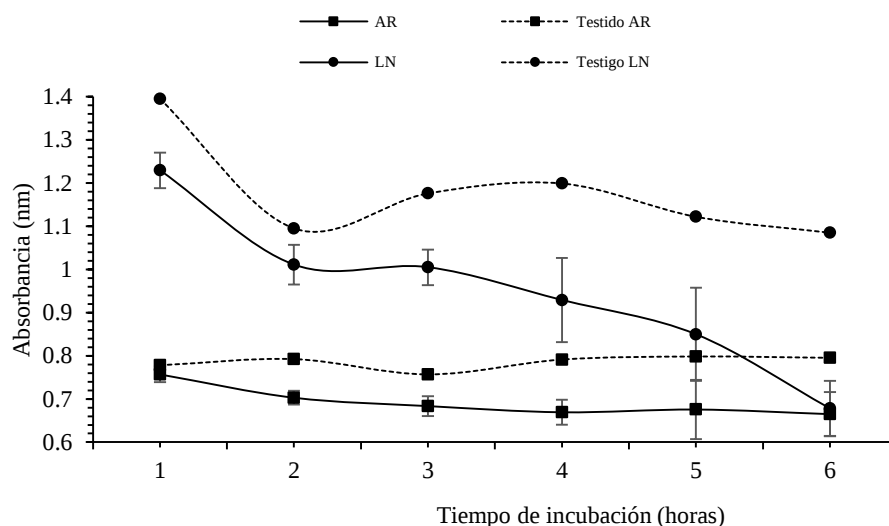


Figura 14. Ensayos de decoloración de licor negro (1% v/v y glucosa 2% w/v) y agua residual papelerera (100% v/v) con extracto enzimático crudo por parte de la cepa TA-CMU de *T. versicolor*.

DISCUSIÓN

Trametes versicolor es un hongo de pudrición blanca con gran potencial ligninolítico. Ésta especie es reconocida por producir elevadas cantidades de lacasa (Jönsson *et al.*, 1997). Además secreta varias peroxidadas tales como MnPs y LiPs, siendo éstas las mejor conocidas (Dodson *et al.*, 1987; Johansson *et al.*, 1993; Paice *et al.*, 1993; Bourbonnais *et al.*, 1995). Éste potencial ha sido demostrado previamente a través de su habilidad para degradar diversos compuestos fenólicos. Por ejemplo, ya se han reportado con anterioridad estudios de decoloración de licor negro a diferentes concentraciones empleando distintas especies del género *Trametes* (Bergbauer *et al.*, 1991; Lara *et al.*, 2003; Elegir *et al.*, 2007). En el presente trabajo se analizó la capacidad oxidativa del aislado silvestre TA-CMU de *T. versicolor* y su complejo de enzimas ligninolíticas para el biotratamiento tanto de licor negro como de agua residual generados por la industria papelerera.

Debido a que se deseaba conocer el efecto del Agua Residual Papelerera y el Licor Negro sobre el crecimiento y desarrollo micelial de la cepa de estudio, ésta creció directamente en dichos sustratos líquidos proveyendo al hongo del mínimo de nutrientes adicionales. Uno de los primeros aspectos a destacar fue el hecho de que la cepa TA-CU de *T. versicolor* fuera capaz de crecer en ambos sustratos sin que fuese modificado el pH, siendo éstos de 8 y 10 respectivamente. Además, como el Licor Negro no tiene cantidad suficiente de fuente de carbono asimilable para permitir el crecimiento del hongo, fue necesario suplementar con glucosa al 2 % (w/v).

En una primera etapa se realizaron ensayos de crecimiento fúngico en placa con agua residual a distintas concentraciones, en los cuales no se observaron diferencias significativas del crecimiento en función del tiempo. En estos ensayos no se detectaron halos de decoloración. Posteriormente se realizaron ensayos de crecimiento en placa en distintas concentraciones de licor negro observándose que al 2% no se inhibía el crecimiento del hongo. Estos resultados son similares a los de Da-Re y colaboradores (2011), ya que en su estudio ellos encuentran que el crecimiento de diferentes cepas fúngicas no se inhibía cuando se les inoculaba en medio sólido MEA con licor negro al 1.4 %, en dicho estudio tampoco se reportaron halos de decoloración. Así mismo el incremento de la decoloración de los medios en placa indica que la cepa aquí analizada es capaz de oxidar los componentes propios del Licor Negro, fenómeno que se sugiere, puede deberse a procesos de despolimerización/polimerización de la lignina que genera cromóforos (Font *et al.*, 2008).

Una vez determinadas las concentraciones óptimas de crecimiento de la cepa en licor negro y agua residual, se llevaron a cabo determinaciones cuantitativas de decoloración y actividad enzimática en medio líquido. La cinética de crecimiento de la cepa TA-CMU en agua residual papelera mostró diferencias significativas en el aumento de biomasa en comparación con el cultivo control sin dicho residuo, manteniéndose muy por debajo de éste muy probablemente debido al efecto tóxico de compuestos químicos del tipo de los clorofenoles y cresoles presentes en mayor concentración en el licor negro (Bollag *et al.*, 1988).

La transformación y degradación de compuestos fenólicos por parte de los hongos de pudrición blanca tiene lugar a través de la acción de una variedad de enzimas que trabajan de manera orquestada. Éstas pueden incluir oxigenasas, hidroxilasas, peroxidasas, tirosinasas y oxidasas. Dentro de ellas, las lacasas extracelulares y las peroxidasas como las LiPs y las MnPs son las más comúnmente involucradas en el proceso de degradación (Santos y Linardi, 2004; Nair *et al.*, 2008). Existen reportes que miden la actividad enzimática de lacasa extracelular de cultivos con licor negro inoculados con cepas de *T. versicolor* (Relo-Barreto *et al.*, 2007; Font *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008; Mesa *et al.*, 2008), aunque a la fecha no se ha reportado la presencia de LiPs y MnPs. Por otra parte, sí se ha reportado la presencia de actividades enzimáticas de las tres principales enzimas del complejo ligninolítico en cultivos con Agua Residual Papelera (Lacina *et al.*, 2003; Gómez-Dorado *et al.*, 2005). Un aspecto importante de señalar es que en el presente trabajo se detectaron las actividades enzimáticas de lacasa extracelular, LiP y MnP en medios de cultivo con Licor Negro a una concentración del 2% (w/v). Respecto a los valores de actividad de lacasa

extracelular (39.7 U L^{-1} para el Licor Negro y 404.5 U L^{-1} para el agua residual papelería) éstas fueron similares a las encontradas en otras cepas de *Trametes versicolor* (Mesa *et al.*, 2008), así como en otros hongos de pudrición blanca, como *Pleurotus ostreatus* (Zhao *et al.*, 2008). En cuanto a las actividades de las peroxidasas, se obtuvieron valores superiores en los medios con Agua Residual Papelería que en aquellos con Licor Negro. Es posible que la alta concentración de lignina, lignina soluble y lignocelulosa, pueda ejercer un efecto inhibitorio sobre la actividad de las peroxidasas como lo reportan Font y col., (2003). De manera adicional, Santos y Linardi (2004) encontraron en estudios de degradación de compuestos fenólicos, que el grado de degradación de fenoles y el tiempo necesario para que se lleve a cabo éste proceso, depende no sólo de la cepa empleada sino también de la concentración inicial de fenol en el medio de cultivo.

De forma simultánea a los ensayos de actividad enzimática, se evaluó el proceso de decoloración tanto del Agua Residual Papelería como del Licor Negro por parte de la cepa TA-CMU. En estos ensayos el porcentaje de decoloración fue superior al 60% para ambos casos. Particularmente en el Licor Negro se observa un incremento en la pigmentación al tercer día de incubación, lo cual se correlaciona con los resultados obtenidos en los ensayos en placa. Hay reportes en la literatura en los que se ha encontrado que una vez que ha iniciado un proceso de decoloración por actividad ligninolítica fúngica en muestras provenientes de efluentes de la industria papelería, éstos pueden recuperar el color, posiblemente debido al alto peso molecular de los grupos cromóforos (Selvam *et al.*, 2002; Muregesam, 2003). Ya se ha descrito además la implicación de las enzimas ligninolíticas en la degradación de clorofenoles por hongos de podredumbre blanca que catalizan la formación de quinonas como paso previo a su detoxificación (Joshi y Gold, 1993; Grey *et al.*, 1998; Leontievsky *et al.*, 2000) siendo las quinonas las moléculas generadas durante el proceso de oxidación de los fenoles (Shradda *et al.*, 2011). Un ejemplo de degradación es el propuesto por Valli y Gold para la degradación de 2,4-diclorofenol por *P. chrysosporium* (Valli y Gold, 1991). En esta ruta, el compuesto es desclorinado oxidativamente tanto por LiP como la MnP mediante una reacción que genera una p-quinona que se recicla posteriormente, a través de reacciones de reducción y metilación, para convertirse en un intermediario que vuelve a ser sustrato de las peroxidasas ligninolíticas, las cuales completarían la desclorinización. Recientes estudios indican que la oxidación del sustrato fenólico por acción de las lacasas da por resultado la formación de un radical ariloxi, una especie activa que se convierte en una quinona en la segunda etapa de la oxidación (Chandra y Chowdhary, 2014). Por otro lado el pH es otro factor importante, debido a que existe una relación directa entre éste y el color del licor, ya

que cuando se acidifica el pH del Licor Negro también disminuye la intensidad del color, pasando de café a amarillo. El color del licor es derivado de grupos provenientes de la degradación parcial de la lignina, incluyendo quinonas, grupos carboxílicos, ácidos carboxílicos, entre otros (Mussatto *et al.*, 2007). Los componentes que le confieren el color al licor no son removidos en rangos de pH entre 12, 56 y 5, 98, y es fuertemente afectado en pH ácido, ya que los componentes cromóforos son removidos con pH entre 6 y 3,2.

Para conocer la posible participación de mecanismos no enzimáticos en la decoloración del agua Residual Papelera y Licor Negro, se llevaron a cabo ensayos de bioadsorción en medio líquido con la cepa TA-CMU. Los resultados muestran que el micelio inactivado es capaz de decolorar por encima del 20% las soluciones originales, de Licor Negro y Agua Residual Papelera durante los primeros cuatro y nueve días de incubación respectivamente. Es factible que los contenidos tan heterogéneos del licor negro y el agua residual papelera puedan influir en los tiempos de decoloración por fijación a la pared celular del micelio fúngico. Previamente se ha reportado el uso de micelio inactivo de *T. versicolor* para la decoloración de licor (Mesa *et al.*, 2008). Wu y colaboradores (2004), reportan hasta un 45% de decoloración de Licor Negro (10% v/v) a los trece días de incubación, mientras que Saritha y colaboradores (2010), reportan el uso de *T. hirsuta* en la decoloración de licor negro, logrando hasta un 60% de decoloración a los diecinueve días de interacción con el micelio.

De forma complementaria se realizó la determinación de fenoles al inicio y término de las cinéticas de decoloración, esto con la finalidad de conocer si el decremento en la coloración que se siguió a lo largo de la cinética estaba relacionado a la presencia de compuestos fenólicos. En éste apartado se pudo determinar que el porcentaje de fenoles remanentes fue menor en el Agua Residual respecto al Licor Negro, datos que se correlacionan con las actividades enzimáticas de ligninasas reportadas.

Finalmente se evaluó la capacidad oxidativa de las enzimas presentes en un extracto enzimático crudo en la decoloración de licor negro y agua residual papelera. En éstos ensayos sólo el Licor Negro fue decolorado de manera significativa durante las primeras horas de incubación. Es importante señalar que no existen reportes en la literatura de ensayos de decoloración de licor negro con extracto enzimático crudo.

CONCLUSIONES

La cepa TA-CMU de *T. versicolor* presenta una gran capacidad para decolorar licor negro y agua residual de la industria papelera. Ambos residuos son decolorados con micelio

inactivado como con micelio vivo, aunque la mayor decoloración se llevaba a cabo por vía enzimática. En ese sentido se encontró correlación con los porcentajes de decoloración respecto al contenido de fenoles. En cuanto a las actividades enzimáticas, la cepa presentó mayor actividad enzimática en el Agua Residual Papelera en comparación con el Licor Negro. Se documenta además por primera vez la actividad de LiP en medios con Licor Negro. Por consiguiente, dicha cepa muestra gran capacidad oxidativa y degradativa de residuos generados durante el proceso de blanqueo del papel, como los fenoles, por lo cual puede ser empleada para el biotratamiento de distintos xenobióticos.

LITERATURA CITADA

- [1] Andreuccetti, M.T., Leite, B.S., Hallak d'Angelo, J.V. (2011). Eucalyptus black liquor-density, viscosity, solids and sodium sulphate contents revisited. *Revista O Papel*, 72(12), 52-57.
- [2] Barreto-Xavier, A.M.R., Mora-Tavares, A.P., Ferreira, R., Amado F. (2007). *Trametes versicolor* growth and laccase induction with by-products of pulp and paper industry. *Electronic Journal of Biotechnology*.
- [3] Bergbauer, M., Eggert, C., Kraepelin, G. (1991). Degradation of chlorinated lignin compounds in a bleach plant effluent by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35, 105–109.
- [4] Bärlocher, F., Graça, M.A.S. Gessner, M.O. (2005). Total Phenolics. *Methods to Study Litter Decomposition: A Practical Guide*, 97 – 100.
- [5] Bollag, J.M., Shuttleworth, K.L., Anderson, D.H. (1988). Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 3086-3091.
- [6] Bourbonnais, R., Paice, M.G. (1990). Oxidation of non-phenolic substrates: an expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters*, 267, 99-102.
- [7] Braun, J.L., Holtman, K.M., Kadla, J.F. (2005). Lignin based carbon fibers: oxidative thermostabilization of kraft lignin. *Carbon*, 43(2), 385-394.
- [8] Chandra, R., Chowdhary, P. (2014). Properties of Bacterial Laccases and Their Application for Bioremediation of Industrial Wastes. *Environmental Science*.
- [9] Da-Re, V., Papinutti, L. (2011). Black Liquor Decolorization by Selected White-Rot Fungi. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165:406–415.

- [10] Dareweesh, H.H.M. (2014). Utilization of Ca-lignosulphonate Prepared from Black Liquor Waste as a Cement Superplasticizer. *Journal of Chemistry and Materials Research*, 1(2), 28-34.
- [11] Dodson, P.J., Evans, C.S., Harvey, P.J., Palmer, J.M. (1987). Production and properties of an extracellular peroxidase from *Coriolus versicolor*, which catalyzes Ca-C β cleavage in a lignin, model compound. *FEMS Microbiology Letters*, 42, 17-22.
- [12] Elegir, G., Bussini, D., Antonsson, S., Lindström, M.E., Zoia, L. (2007). Laccase initiated cross-linking of lignocellulose fibers using an ultra-filtered lignin isolated from kraft black liquor. *Applied Microbiology Biotechnology*, 77, 809-817.
- [13] Font, X., Caminal, G., Gabarrell, X., Romero, S., & Vicent, M. T. (2003). Black liquor detoxification by laccase of *Trametes versicolor* pellets. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 78, 548-554.
- [14] Gómez-Dorado, C., Martínez-Salgado, M., Nieto-Mosquera, D., Pedrosa-Rodríguez, A., Rodríguez-Vázquez, R., Rosas-Acosta, J. (2005). Estudio del efecto de dos inductores y un protector enzimático sobre la actividad de las enzimas Mn-peroxidasa y lacasa producidas por *Trametes versicolor* y su efecto en la decoloración de efluentes de la industria papelera. *UNIVERSITAS SCIENTIARUM Revista de Facultad de Ciencias*, 10(2), 37-45.
- [15] Grey, R., Hofer, C., Schlosser, D. (1998). Degradation of 2-chlorophenol and formation of 2-chloro-1, 4-benzoquinone by mycelia and cell-free crude culture liquids of *Trametes versicolor* in relation to extracellular laccase activity. *Journal of Basic Microbiology*, 38:371-382.
- [16] Helmy, S.M., El-Meligi, M. (2002). Biopulping and Biobleaching by White Rot Fungi. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 61, 376-381.
- [17] Johansson, T., Nyman, P.O. (1993). Isozymes of lignin peroxidase and manganese (II) peroxidase from the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*. I. Isolation of enzyme forms and characterization of physical and catalytic properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 300, 49-56.
- [18] Jönsson, L., Saloheimo, M., Penttilä, M. (1997). Laccase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*: cDNA cloning of lcc1 and expression in *Pichia pastoris*. *Current Genetics*, 32, 425-430.
- [19] Joshi, D.K. Gold, M.H. (1993). Degradation of 2, 4, 5-trichlorophenol by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Environmental Microbiology*, 59:1779-1785.

- [20] Karlsson, E., Gourdan, M., Olausson, L., Vamling, L. (2013). Heat transfer for falling film evaporation of black liquor up to very high Prandtl numbers. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 907-918.
- [21] Kirk, T.K., Schultz, E., Cornnors, W.J., Lorenz, L.F., Zeikus, J.G. (1978). Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochate chrysosporium*. *Archives of Microbiology*, 117: 277-285.
- [22] Lacina, C., Germain, G., Spiros, A.N. (2003). Utilization of fungi for biotreatment of raw wastewaters. *African Journal of Biotechnology*, 2 (12), 620-630.
- [23] Lara, A., Rodríguez-Malaver, J., Rojas, O.J., Otón-Holmquist, González, A.M., Bullón, J., Peñaloza, N, Araujo, E. (2003). Blackliquor lignin biodegradation by *Trametes elegans*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 52, 167 – 173.
- [24] Leontievsky, A.A., Vares, T., Lankinen, P., Shergill, J.K., Pozdnyakova, N.N., Myasoedova, N.M., Kalkkinen, N., Golovleva, L.A., Cammack, R., Thurston, C.F., Hatakka, A. (1997). Blue and yellow laccases of ligninolytic fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 156:9-14.
- [25] Lundell, F., Söderberg, L.D., Alfredsson, P.H. (2011). Fluid MEchanics of Papermaking. *Anual Review of Fluid Mechanics*, 43, 195-217.
- [26] Mesa, L., González L., Gabarrell X. (2008). Estudios preliminares de la decolorización del licor negro procedente del pulpeo Organosolv del bagazo de la caña de azúcar por *Trametes versicolor*. *AFINIDAD LXV*, 534.
- [27] Messner, K., Srebotnik, E., (1994). Biopulping: An overview of developments in an environmentally safe paper-making technology. *FEMS Microbiology Reviews* (13):351-364.
- [28] Murugesan, K. (2003) Bioremediation of paper and pulp mill effluents. *Indian Journal of Experimental Biology*, 41:1239–1248.
- [29] Mussatto, S., Fernandez, M., Roberto, I. (2007). Lignin recovery from brewer's spent grain black liquor. *Carbohydrate polymers Journal* vol. 70, p. 218- 223.
- [30] Nagai, M., Sato, T., Watanabe, H., Saito, K., Kawata, M., Enei, H. (2002). Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinus edodes*, and decolorization of chemically different dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60: 327-335.
- [31] Nair, C.I., Jayachandran, K., Shashidhar, S. (2008). Biodegradation of phenol. *African Journal of Biotechnology*, 7, 4951-4958.

- [32] Paice, M.G., Reid, I.D., Bourbonnais, R., Archibald, F.S., Jurasek, L. (1993). Manganese peroxidase, produced by *Trametes versicolor* during pulp bleaching, demethylates and delignifies kraft pulp. *Applied Environmental Microbiology*, 59, 260-265.
- [33] Paszczyński, A., Huynh, V.B., Crawford, R. (1985). Enzymatic activities of an extracellular, manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiology Letters*.
- [34] Peña-Cárdenas V. (2003). Introducción a la Fabricación de Pulpa y Papel. Cenpapel. Colombia. 182 p.
- [35] Pointing, S.B. (2001). Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology Biotechnology*, 57: 20-33.
- [36] Ralph J. P., Catchside D. E. A. (2002). Biodegradation by white-rot fungi. In H. D.
- [37] Rojas, O.J., Song, J., Argyropoulos, D.S. (2006). Lignin separation from black liquor by tangential ultrafiltration. *Science & Technology*, 88(1), 88-95.
- [38] Saarela, S., García, E., Elnen, I., Fernández, V.C. (2007). The first year of operation of the Bonit Fray Bentos Pulp Mill in Uruguay.
- [39] Santos, V., Linardi, R. (2004). Biodegradation of phenol by a filamentous fungus isolated from industrial effluents, identification and degradation potential. *Process Biochemistry*, 39 1001-1006.
- [40] Saritha, Y.V., Maruthi, A., Mukkanti, K. (2010). Potential fungi for bioremediation of industrial effluents. *Bio Resources*, 5(1), 8-22.
- [41] Selvam, K., Swaminathan, K., Song M.H., Keon-Sang C. (2002). Biological treatment of a pulp and paper industry effluent by *Fomes lividus* and *Trametes versicolor*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 18: 523–526.
- [42] Shraddha., Shekher, R., Sehgal, S., Kamthania, M., and Kumar A. (2011). Laccase: Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications. *Enzyme Research*, 217861, 11.
- [43] Velásquez, J., Barrera, C., Zapata, J. (1999). Reducción de la DQO en licores negros uso de la acidificación controlada. *Industria papelera*, 182-187.
- [44] Yang, W.B., Mu, H.Z., Huang, Y.C. (2003). Treatment of black liquor from papermaking industry by acidification and reuse. *Journal of Environmental Science*, 15(5), 697-700.
- [45] Vélez, J., Klett, A., Thies, M.C. (2014). Recovering Liquid-Lignin Phase from Mill Black Liquor. *Graduate Research and Discovery Symposium*, 103.

- [46] Vishtal, A., Kraslawski, A. (2011). Challenges in industrial applications of technical lignins. *Bioresources*, 6(3), 3547-3568.
- [47] Wu, J., Ya-Zhong, X., Han-Qing Y. (2005). Degradation of lignin in pulp mill wastewaters by white-rot fungi on biofilm. *Bioresource Technology*, 96, 1357–1363.
- [48] Yadav, R.D., Chaudhry, S., Dhiman, S.S. (2010). Biopulping and its potential to reduce effluent loads from bleaching of hardwood kraft pulp. *Bioresources*, 5(1), 159, 171.
- [49] Yamanaka, R., Soares, C. F., Mathews, D. R., Machado, K. M. G. (2008). Ligninolytic enzymes produced by *Trametes villosa* CCB 176 under different culture conditions. *Brazilian Journal of Microbiology* 39: 78 – 84.
- [50] Zhao, L. H., Zhou, Lv, J. T., Zheng, H. C. L., Yang, Y. S., Sun, H. J., Zhang, X. H. (2008). Decolorization of Cotton Pulp Black Liquor by *Pleurotus ostreatus* in a Bubble-column Reactor. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 80:44–48.
- [51] Zeng, X., Cai, Y., Liao, X., Zeng, X., Li, W., Zhang, D. (2011). Decolorization of synthetic dyes by crude laccase from a newly isolated *Trametes trogii* strain cultivated on solid agro-industrial residue. *Journal of Hazardous Materials*, 187: 517-525.

CAPÍTULO 4

6.4 DEGRADACIÓN DE COLORANTES SINTÉTICOS POR LA CEPA SILVESTRE TA-CMU de *Trametes versicolor*

Erick Magaña-Ruiz^a, Ma. Soledad Vázquez-Garcidueñas^b, Gerardo Vázquez-Marrufo^a

^aCentro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. ^bDivisión de estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. E-mail: gvazquezmarrufo@yahoo.com.mx

RESUMEN

La cantidad de sustancias empleadas para impartir color a un textil pueden estar asociadas con compuestos cromóforos de alto peso molecular, los cuales al acumularse en cuerpos de agua pueden generar efectos adversos al medio ambiente. Dentro de las alternativas empleadas para su biotratamiento, los organismos empleados por su alta capacidad oxidativa han sido los hongos de podredumbre blanca, los cuales tienen la capacidad de degradar sustancias fenólicas además de lignina. Este polímero presenta múltiples anillos aromáticos en su estructura química, por lo que es degradado por la acción de oxidasas y peroxidasas, enzimas que al no presentar alta especificidad por el sustrato, pueden tener actividad sobre la estructura de diferentes sustratos fenólicos y azo. Una de las especies de hongos que ha sido estudiada debido a su gran potencial oxidativo de enzimas ligninolíticas es *Trametes versicolor*. En el presente trabajo se evaluó el efecto de las enzimas ligninolíticas de la cepa de estudio para decolorar diversos tintes, encontrándose que en medio líquido, los tintes Fucsina Ácida, Chicago Sky Blue, Azul Ácido, Azul Remazol Brillante fueron decolorados en su totalidad, excepto el Azul Directo 71 (97%) y el Naranja de Metilo (81%), siendo éste último el más recalcitrante. Durante el proceso de decoloración se determinó la actividad enzimática de ligninasas, pudiéndose observar que la primera actividad enzimática en ser detectada fue la de las lacasas extracelulares, con un pico máximo de 140 U L⁻¹. En los ensayos de bioadsorción se puede observar que el porcentaje máximo de decoloración fue del 12% al séptimo día de incubación. Finalmente se evaluó la capacidad oxidativa de las enzimas presentes en un extracto enzimático crudo en la decoloración del Naranja de Metilo encontrando que el tinte es degradado durante las primeras horas de incubación.

Palabras clave: Cromóforos, enzimas ligninolíticas, capacidad oxidativa, decoloración.

ABSTRACT

The amount of substances used for coloring a textile is associated with chromophore compounds and high molecular weight. These molecules tend to accumulate in rivers or lakes, and may have adverse effects on the environment. Among the alternatives used for bioremediation, biological methods have been considered highly effective. In this sense, white-rot fungi have been used, due to its high oxidative capacity because of their ability to degrade phenolic substances in addition to lignin. This polymer has multiple aromatic rings in their chemical structure and can be degraded by the action of oxidases and peroxidases, enzymes that do not exhibit high substrate specificity and may have activity on substrates such as phenolic structures and azo groups. One species of fungi that has been studied due to its high oxidative potential of ligninolytic enzymes is *Trametes versicolor*. In this paper was assessed the effect of ligninolytic enzymes from the strain TA-CMU in the discoloration of several dyes, Acid Fuchsin, Chicago Sky Blue, Blue Acid Blue Bright Remazol were totally discolored, except Direct Blue 71 (97%) and methyl orange (81%), the latter was the most recalcitrant. Ligninases enzyme activity was determined during up the discoloration process, observing that the first enzymatic activity detected was the activity of extracellular laccase, with a peak of 140 U L⁻¹. In the tests of bioadsorption, it can be seen that the maximum percentage of discoloration was 12% on the seventh day of incubation. Finally, oxidative capacity of these enzymes is evaluated in a crude enzyme extract for discoloration of Methyl Orange, finding that the dye is degraded during the first hours of incubation.

Keywords: *Chromophores, ligninolytic enzymes, oxidative capacity, discoloration.*

INTRODUCCIÓN

En la industria textil se emplea una gran variedad de colorantes sintéticos, tales como ácidos, básicos, azo, di azo, bases de antraquinona y colorantes complejo metal (figura 1). Estos colorantes se clasifican de acuerdo con su aplicación y estructura química. Están constituidos por un grupo de átomos responsables del color de tinte, llamado cromóforo. Los cromóforos más importante son los del tipo azo (N = N), carbonil (-C = O), metano (-CH =), NO₂) y grupos quinoides. Los auxocromos más importante son las aminas (NH₃), carboxilos (- COOH), sulfonatos (-SO₃H) e hidroxilos (- OH) (Welelham, 2000).

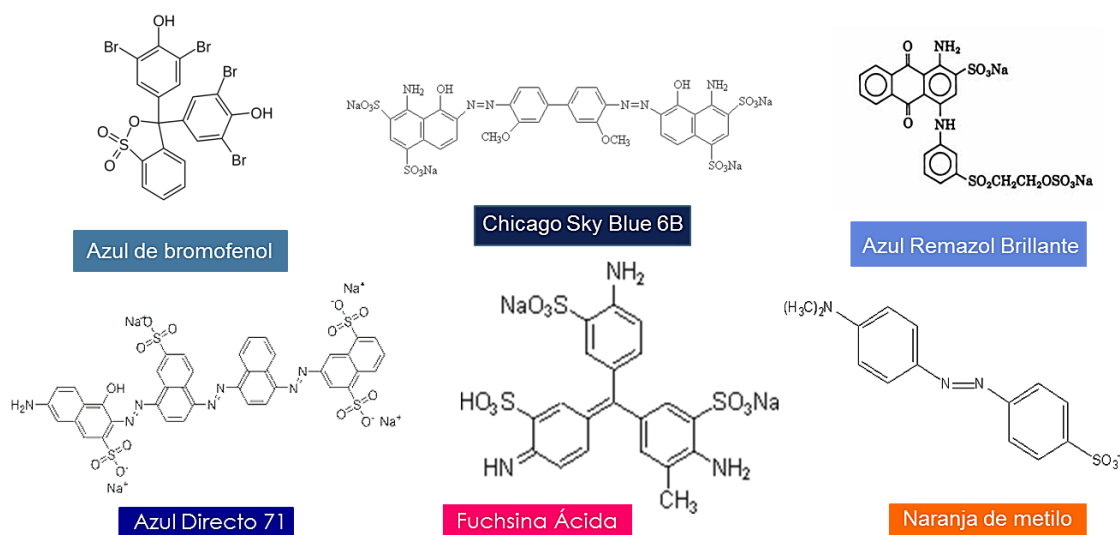


Figura 1. Estructura química de los colorantes más comunes.

Respecto a los colorantes básicos, éstos pueden ser del tipo cianina, hemicianina, diazohemicianina, difenilmetano, triarilmetano, azo, azina, acridinas, oxasinas y antraquinonas. Estos colorantes presentan un alto brillo e intensidad de color y son altamente visibles incluso a muy bajas concentraciones. Los colorantes de antraquinona son resistentes a la degradación debido a la fusión de estructuras aromáticas que consecuentemente los hace permanecer más tiempo en un efluente. Los colorantes del tipo Complejos Metálico son principalmente a base de cromo, el cual es potencialmente carcinogénico (Mishara y Tripathy, 1993). Los colorantes tipo azoicos pertenecen a la clase de colorantes sintéticos más importantes, contribuyendo al 70% del total de los colorantes usados a nivel industrial (Wong y Yu, 1999). Estos son solubles en agua y exhiben la mayor variedad de colores, además, la mayoría son resistentes a los procesos de biodegradación aeróbica convencionales. Además de ello, todos los colorantes utilizados en la industria textil están diseñados para resistir la decoloración por exposición al sudor, la luz, el agua y a muchos productos químicos que incluyen agentes oxidantes, y el ataque microbiano (Forgans *et al.*, 2004).

Debido a los procesos de teñido y lavado de telas se consumen grandes volúmenes de agua que consecuentemente contaminan cuerpos de agua. Las estructuras químicas de los colorantes residuales presentan compuestos aromáticos, benzodifuranos que los hace difícilmente ser biodegradados (Buthelezi *et al.*, 2012). El color de los tintes afecta a la actividad fotosintética en los cuerpos de agua, además en los colorantes tipos azo y nitro, la reducción de sus enlaces es responsable de la formación de aminas aromáticas tóxicas en el efluente (Ali, 2010). Aunque algunos de los colorantes son adsorbidos en lodos aeróbicos,

la aplicación de procesos microbiológicos en plantas de tratamiento no puede eliminarlos fácilmente a partir de aguas residuales (Wang *et al.*, 2011). Además, el colorante reduce la eficiencia del tratamiento en estas plantas (Meehan *et al.*, 2000), lo que puede conducir a un colapso de las mismas.

Los métodos físicos o físico-químicos han sido investigados para dar solución a los problemas mencionados anteriormente, sin embargo tienen las limitaciones de altos costos operacionales, así como degenerar gran cantidad de lodo para su eliminación. Es por ello que el tratamiento biológico de colorantes parece ser una alternativa rentable a los métodos físico-químicos. Algunos autores han examinado diversos microorganismos, con el fin de identificar a los más eficientes para decolorar estos tintes (Heinfling, *et al.*, 1998; Moreira *et al.*, 2000; Robinson *et al.*, 2001; Chagas *et al.*, 2001); otros han mostrado la habilidad de nuevos microorganismos en decolorar varios tintes (Sani *et al.*, 1999; Wesenberg *et al.*, 2002; Hatvantes y Mécs, 2002). Los hongos ligninolíticos han sido empleados en procesos de biorremediación, ya que se ha documentado ampliamente su capacidad para degradar compuestos orgánicos recalcitrantes. Ya se ha estudiado el mecanismo de decoloración fúngico de pigmentos textiles, el cual se puede clasificar en dos grupos principalmente (Swamy *et al.*, 1999; Aretxaga *et al.*, 2001; Jaroz *et al.*, 2002). El primero de ellos se explica en términos de bioadsorción, aquí tanto la biomasa viva como la muerta se pueden utilizar para eliminar los compuestos orgánicos peligrosos. Las células muertas son obviamente preferibles para el tratamiento de aguas residuales, ya que no se ven afectados por los residuos tóxicos y productos químicos y no contaminan el medio ambiente mediante la liberación de toxinas (Aksu 2005). Estos sistemas tampoco requieren un suministro continuo de nutrientes y pueden ser regeneradas y reutilizadas durante muchos ciclos (Sumathi y Manju, 2000; Volesky, 2001; O'Mahony *et al.*, 2002; Maurya *et al.*, 2006; Vijayaraghavan y Yun, 2006; Won *et al.*, 2006). La biomasa muerta y seca se puede almacenar durante más tiempo a temperatura ambiente con poco riesgo de putrefacción. Esto hace que sea más fácil de usar y transportar. En el otro se muestra la degradación o biotransformación a través hongos de pudrición blanca en función de su producción de enzimas lininolíticas, como las lacasas extracelulares, las Lignin Peroxidasas y las Manganese Peroxidasas (Nyanhongo *et al.*, 2002). De estas tres enzimas, la actividad catalítica de las lacasas extracelulares no requiere H_2O_2 para iniciar la reacción de oxidación, por lo tanto, esto hace que sea una opción valiosa para la oxidación de muchos compuestos fenólicos o xenobióticos, por lo que ahora se utiliza ampliamente en la biodegradación de la lignina y la decoloración de tintes. Las lacasas pueden utilizarse para el tratamiento de celulosa u otros efluentes industriales que

contengan cloroligninas o compuestos fenólicos. Las enzimas rinden compuestos fenólicos menos tóxicos a través de reacciones de degradación o polimerización y/o por medio de acoplamiento cruzado de fenoles con fenoles de contaminantes de origen natural.

Una de las cepas de hongos basidiomicetes con alto potencial en tratamiento de efluentes provenientes de la industria textil es *Trametes versicolor*, de la cual existen reportes en la literatura de la degradación de colorantes sintéticos por parte de distintas cepas (Yang, *et al.*, 2009; Selvam *et al.*, 2012;). Es por ello que actualmente continúa la búsqueda de cepas de hongos de pudrición blanca que aporten enzimas ligninolíticas capaces de mineralizar la amplia gama de colorantes industriales, pues en general, la mayor decoloración por parte de estos microorganismos involucra a los colorantes tipos azo.

En este apartado del trabajo se analizó la capacidad de la cepa TA-CMU para decolorar soluciones de tintes comúnmente utilizados en la industria textil y otras industrias.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa de estudio

Se estudió la cepa TA-CMU de *Trametes versicolor* aislada en el municipio de Pátzcuaro del estado de Michoacán y depositada en el Cepario Michoacano Universitario del CMEB-UMSNH.

Medios de cultivo

Se utilizó el medio sólido agar de dextrosa y papa (PDA, DifcoTM, USA) para el mantenimiento de la cepa y la obtención de inóculos para los ensayos de cinética enzimática. El medio se preparó de acuerdo a las instrucciones del proveedor y posteriormente se esterilizó a 121°C y 15 lbs/in² durante 15 minutos.

Para la realización de cinéticas de crecimiento y determinación de actividad enzimática en medio líquido se empleó el medio completo PDB (DifcoTM, USA), para los ensayos de fermentación en sustrato sólido se empleó el medio completo EMA (DifcoTM, USA), los cuales se prepararon de acuerdo a las instrucciones del proveedor y se esterilizó de la manera previamente descrita.

Obtención de inóculos

Se incubó la cepa TA-MU de *Trametes versicolor* en placas de PDA de 6 mm de diámetro a 28°C para la generación de inóculos (Yamanaka *et al.*, 2008). Se permitió el

desarrollo del micelio hasta que cubrió $\frac{3}{4}$ partes de la superficie del medio de cultivo y posteriormente se removieron del límite de la colonia inóculos con un sacabocados de 6 mm de diámetro, los cuales fueron utilizados para los ensayos en medio líquido.

Cultivo en medio líquido

Los cultivos en medio líquidos de la cepa TA-CMU se realizaron en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 25 mL de medio líquido PDB. Dicho medio fue inoculado con tres cilindros de 6 mm de diámetro obtenidos de la manera previamente descrita. Los cultivos así inoculados se incubaron a 28 °C y 120 rpm. El crecimiento se determinó midiendo el peso seco a distintos tiempos de incubación, mientras que para la determinación de las actividades enzimáticas que se describen posteriormente se tomaron alícuotas del medio extracelular en campana de flujo laminar. Tanto las cinéticas de crecimiento como las de actividad se realizaron en tres ensayos independientes por triplicado y el resultado de las mediciones fue promediado, obteniéndose la desviación estándar para cada punto de la curva de crecimiento. Para evaluar si las diferencias en la producción de biomasa en cada punto de la cinética eran significativas se realizó un análisis ANOVA y una prueba a Tukey ($p < 0.05$) empleando el paquete Prism 3.0.

Determinación de la actividad de lacasa extracelular

La determinación de actividad enzimática de lacasa extracelular se realizó cuantificando la formación del catión ABTS⁺ de acuerdo a Nagai *et al.* (2002). La mezcla de reacción se preparó de la siguiente manera: 800 μ L de buffer de fosfatos pH 4 (0.1 M de ácido cítrico, 0.2 M de fosfato de sodio dibásico), 100 μ L de ABTS 1M (2, 2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) y 100 μ L del sobrenadante del medio de cultivo centrifugado; para ello se tomó una alícuota de 300 μ L del medio de cultivo el cual se centrifugó a 1 500 x *g* durante 10 minutos. La mezcla de reacción se incubó a 30°C durante 20 min al término de los cuales se agregaron 100 μ L de TCA (ácido tricloro acético 5% (v/v) para detener la reacción. La actividad enzimática fue cuantificada espectrofotométricamente a 420 nm, utilizando el valor de ϵ del ABTS de 36 M⁻¹cm⁻¹.

Determinación de la actividad de lignin peroxidasa

La actividad enzimática de LiP se determinó cuantificando la oxidación del alcohol veratrílico a veratraldehído de acuerdo a Tien y Kirk (1988). La mezcla de reacción contenía

700 μL de buffer de tartratos 0.3 mM pH 2.5; 50 μL de alcohol veratrílico 10 mM, 50 μL de peróxido de hidrógeno 5 mM como iniciador de la reacción enzimática y 200 μL del sobrenadante del medio de cultivo centrifugado como se describió previamente. La mezcla de reacción se incubó a 25°C durante 2 minutos. La actividad enzimática fue cuantificada espectrofotométricamente a 310 nm, utilizando el valor de ϵ del veratraldehído de $9,3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Determinación de la actividad de manganeso peroxidasa

La actividad enzimática de MnP se determinó cuantificando la formación del complejo tartrato de manganeso de acuerdo a Pascynski *et al.* (1985). La mezcla de reacción contenía 500 μL de buffer de tartrato de sodio 0.1 mM pH 5; 75 μL de MnSO_4 10 mM, 75 μL de 2,6-dimetoxifenol 10 mM, 50 μL de peróxido de hidrógeno 5 mM como iniciador de la reacción enzimática y 300 μL del sobrenadante del medio de cultivo centrifugado como se describió previamente. La mezcla de reacción se incubó a 25°C durante 2 minutos. La actividad enzimática fue cuantificada espectrofotométricamente a 334 nm, utilizando el valor del ϵ del tartrato de manganeso de $18,3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Para el cálculo de la actividad enzimática se empleó la siguiente fórmula:

$$AE = \frac{(Abs.)(VT)}{(\epsilon)(Vm)}$$

Donde, la actividad enzimática (AE) es igual al producto de la absorbancia de la mezcla de reacción (Abs) por el volumen total de la muestra (VT) dividido entre el producto del coeficiente de extinción molar del cromóforo (ϵ) por el volumen del sobrenadante del medio de cultivo adicionado a la mezcla de reacción (Vm).

Ensayos de decoloración en medio líquido

Los ensayos de decoloración se cuantificaron espectrofotométricamente para cada colorante de acuerdo a las siguientes longitudes de onda (λ), Fucsina Ácida 540 nm, Chicago Sky Blue 610 nm, Azul Remazol Brillante 592 nm, Azul Directo 71 585 nm y Naranja de Metilo 465. Se inoculaon matraces de 250 mL con 100 mL del medio líquido PDB con 6 cilindros de 6 mm de diámetro de micelio tomados del límite de una colonia en fase logarítmica de crecimiento. Cada uno de los colorantes empleados se adicionó al medio de

cultivo de acuerdo a Svobodova *et al.* (2008), ajustándose a una concentración final de 150 mg/L y se esterilizó mediante filtración a través de una membrana Millipore® tipo HA tamaño de poro 0.045 micrómetros. Los cultivos con colorante inoculados de la manera previamente descrita se incubaron en oscuridad a 28 °C en agitación constante a 125 rpm. Como blanco se utilizaron matraces inoculados de la manera previamente descrita cuyos inóculos se inactivaron a 50 °C durante 15 minutos. El proceso de degradación de cada colorante se determinó evaluando el cambio de absorbancia cada 24 h a partir de alícuotas de 1 mL del medio de cultivo fúngico centrifugado de la manera previamente descrita. La decoloración fue calculada de acuerdo con Zeng *et al.* (2011) cuantificando el decremento en la absorbancia máxima de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100$$

Donde A_0 es la absorbancia inicial y A es la absorbancia final. Finalmente la biomasa fúngica será removida del medio de cultivo líquido, filtrada y lavada con agua destilada y secada a 80 °C para estimar su peso seco gravimétricamente (Novotny *et al.* 2001).

Ensayos Bioadsorción

Para evaluar la fracción de colorante que no era degradada por vía enzimática se llevó a cabo un ensayo de bioadsorción, el cual se realizó bajo las condiciones de medio de cultivo previamente descritas, los matraces fueron inoculados con 6 cilindros de micelio provenientes de cultivos líquidos con PDB, tomados del sexto día de incubación e inactivados 121°C y 15 lbs/in² durante 5 minutos. En éste ensayo se evaluó el cambio de absorbancia cada 24 h a partir de alícuotas de 1 mL del medio de cultivo fúngico centrifugado de la manera previamente descrita. La decoloración fue calculada de acuerdo con Zeng *et al.* (2013)

Ensayos de decoloración con extracto enzimático crudo

Se incubaron por triplicado matraces con medio líquido PDB incubados con la cepa de estudio bajo las condiciones mencionadas anteriormente. De acuerdo a los picos máximos de actividades ligninolíticas encontrados para la cepa TA-CMU, al noveno día de incubación se tomaron alícuotas del medio extracelular para la realización de los ensayos. Se colocaron

en tubos de microcentrífuga de 1.5 μ L con 900 μ L de Naranja de Metilo (150 mg/L), a los cuales se les agregaron 100 μ L del extracto crudo, se homogeneizo mediante vórtex y posteriormente se incubó con agitación a 28°C y 125 rpm. El seguimiento de la decoloración se realizó cada 2 horas durante 12 horas midiendo el decremento en la absorbancia específica para cada una de las muestras como se especifica en la tabla 1.

RESULTADOS

Ensayos de decoloración

Estos ensayos se realizaron en medio líquido para poder tener datos cuantitativos de decoloración de colorantes sintéticos en placa. En la figura 2 se muestra los distintos colorantes empleados y el porcentaje de degradación de cada uno de ellos.

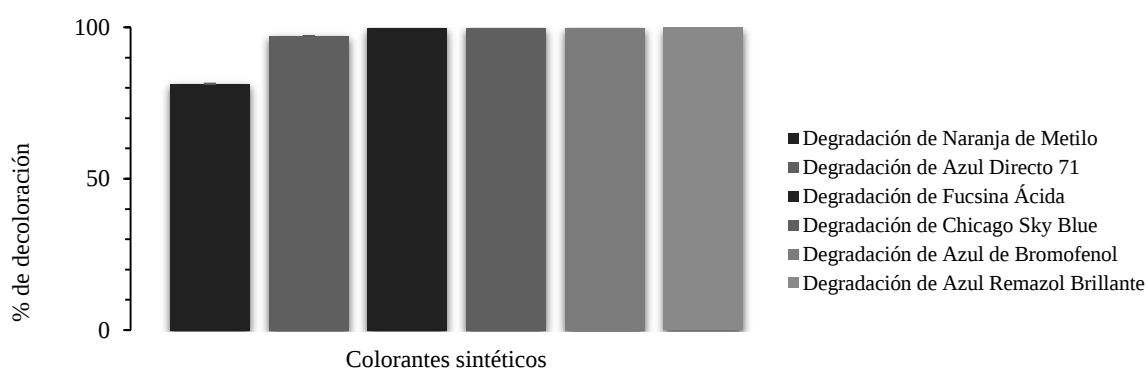


Figura 2. Ensayos de degradación de colorantes sintéticos. La cepa silvestre TA-CMU de *T. versicolor* se incubó en medio líquido basal PDB suplementado con distintos colorantes sintéticos. La cepa se incubó a 28°C y 120 rpm, determinándose la disminución de absorbancia expresada en porcentaje.

Las soluciones de Chicago Sky Blue, Azul Remazol Brillante y Azul de Bromofenol se decoloraron completamente mientras que el Azul Directo 71 casi en su totalidad, siendo el Naranja de Metilo el más recalcitrante a la decoloración, alcanzando un valor máximo de un 81.31% de pérdida de color.

Ensayos de actividad enzimática

La actividad enzimática de ligninasas en presencia de Naranja de Metilo 150 mg/L se determinó de la manera anteriormente descrita (figura 3). La curva de la actividad enzimática de Lacasas se graficó en el eje secundario. La actividad enzimática de LiP mostró un pico máximo de 54 U L⁻¹ al noveno día de incubación. Respecto a la actividad de MnP,

ésta se mantuvo inhibida durante los primeros seis días de la cinética, mostrando un ligero incremento de 11.09 U L^{-1} al séptimo día y llegando a un pico máximo de 17.49 U L^{-1} al décimo día de incubación. La actividad de lacasa extracelular mostró un incremento de actividad al tercer día, llegando a un pico máximo de 113.09 U L^{-1} al quinto día de incubación, actividad que decae a partir del sexto día hasta 11.40 U L^{-1} .

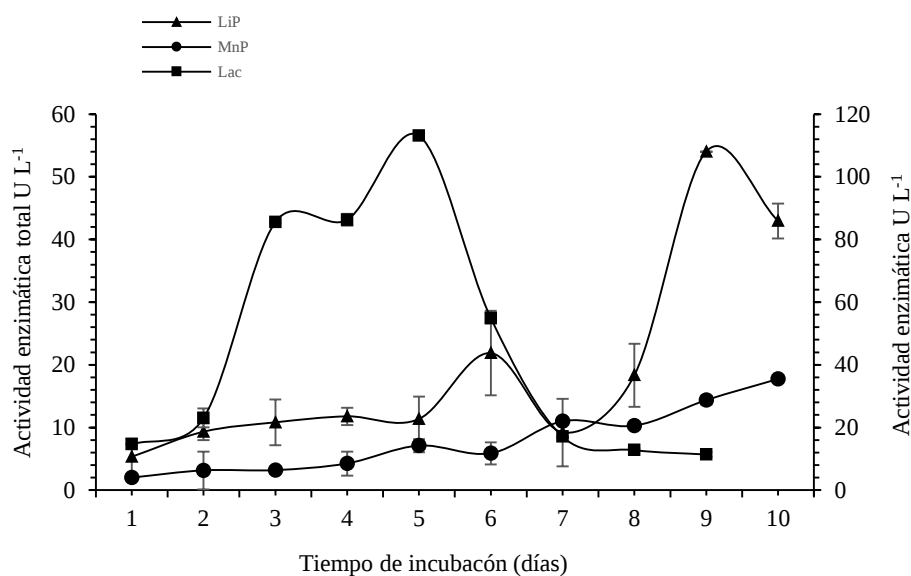


Figura 3. Actividad enzimática de ligninasas de la cepa silvestre TA-CMU de *Trametes versicolor*. Los cultivos se incubaron en medio basal PDB con Naranja de Metilo 150 mg/L a 28°C y 120 rpm.

Ensayos de decoloración por bioadsorción

Estos ensayos se realizaron con la finalidad de determinar la fracción que era degradada por vía no enzimática durante el proceso de decoloración de los medios que contenían Naranja de Metilo utilizando micelio inactivado.

En la figura 4 se puede observar que en los medios que contenían Naranja de Metilo (150 mg/L), aproximadamente un 13 % de la decoloración se debe a procesos no enzimáticos, ya que el 81.35 % de la decoloración se obtuvo en los medios que contenían el micelio vivo (Figura 2).

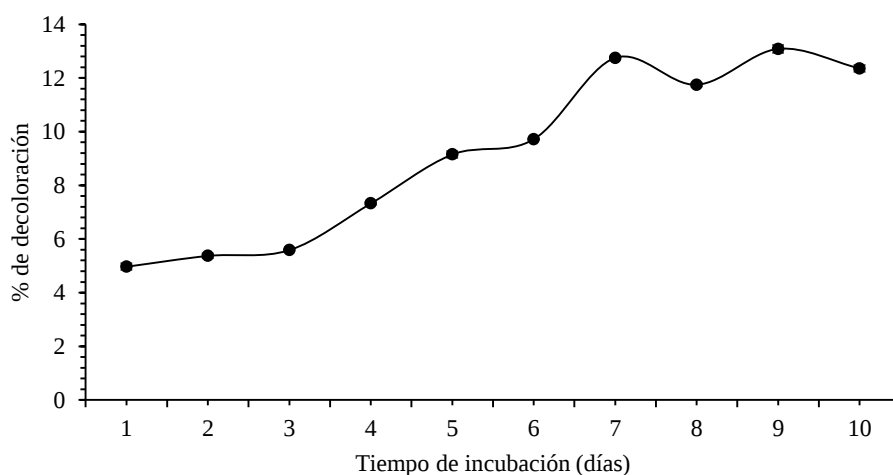


Figura 4. Cinética de decoloración por bioadsorción por parte de la cepa TA-CMU de *Trametes versicolor* en medio líquido con Naranja de Metilo 150 mg/L.

Ensayos de decoloración con extracto crudo

Con el objetivo de conocer el potencial del extracto enzimático crudo en la decoloración del colorante Naranja de Metilo, se realizaron ensayos de decoloración agregando extracto enzimático crudo a una solución de naranja de metilo de acuerdo a la manera anteriormente descrita.

En la figura 5, se puede observar que el colorante fue susceptible a ser decolorado durante las primeras horas de incubación con extracto enzimático, alcanzándose a las 6 horas un valor de 2.848 nm con respecto al color original de la solución (3.183 nm).

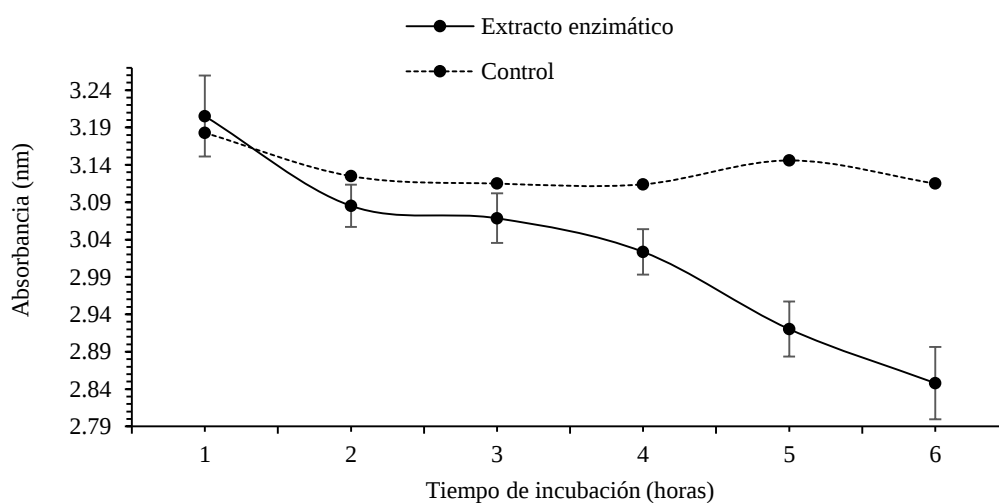


Figura 5. Ensayos de decoloración de Naranja de Metilo (150 mg/L) por parte de la cepa TA-CMU de *T. versicolor*.

DISCUSIÓN

En general los colorantes sintéticos tienen estructuras moleculares aromáticas que los hacen estables y difíciles de degradar. Existen diversos mecanismos que permiten a los organismos eliminarlos, ya sea por vía enzimática, por bioadsorción y degradación o por adsorción sin degradación (Fu y Viragham, 2001). Existen estudios en los que se ha probado el potencial oxidativo de distintas cepas del género *Trametes* sp. para éstos procesos (Yang, *et al.*, 2009; Selvam *et al.*, 2012).

Este estudio sugirió la producción de enzimas extracelulares, sin embargo bajo las condiciones evaluadas únicamente se había detectado la producción cualitativa de ligninasas. Es por ello que en el presente trabajo se evaluó cuantitativamente el porcentaje de decoloración de tintes en medio líquido y de forma simultánea se caracterizó la actividad enzimática de Lacasas Extracelulares, LiPs y MnPs.

Respecto a los ensayos de decoloración en medio líquido, se empleó el medio completo PDB, pudiéndose observar que en general los tintes fueron decolorados en su totalidad, excepto el Azul Directo 71 (97%) y el Naranja de Metilo (81%). Padmavathy y colaboradores (2003), mencionan que la presencia de un cosustrato como la glucosa determina la eficiencia de la decoloración fúngica, pues éste es necesario para apoyar el crecimiento inicial de los microorganismos ya que los colorantes son deficientes fuentes de carbono lo que hace que su degradación sea difícil cuando no hay fuentes de carbono adicionales. Así mismo, Kaasinth y colaboradores (2003), reportan que los cultivos en agitación son más eficientes en la transformación de masa y oxígeno.

Son escasos los reportes en la literatura sobre la decoloración de Naranja de Metilo empleando cepas fúngicas (Zucca *et al.*, 2012). Mayoritariamente se han realizado estudios haciendo uso de cepas bacterianas, principalmente de los géneros *Bacillus* Spp. (Ali y Fereydon, 2005), *Lactobacillus* Spp. (Seesuriyachan *et al.*, 2007), *Pseudomonas* Spp. (Shah *et al.*, 2013), así como mezclas bacterianas (Ghanem, 2012). En estos estudios el porcentaje máximo de decoloración del Naranja de Metilo ha oscilado alrededor del 80%, lo cual es equiparable a los resultados obtenidos.

En cuanto a las actividades enzimáticas, podemos observar que la primera actividad enzimática en ser detectada es la de la lacasa extracelular, con un pico máximo de 140 U L^{-1} , resultado que es similar a lo encontrado por Ambalkar y Mukundan (2013). Por otro lado, también se puede observar que las actividades enzimáticas de las peroxidases aparecen luego de que decae la actividad máxima de las lacasa extracelular. En este sentido, Levin y Fochiassin (2012) reportan que la síntesis de LiP y MnP está asociada a la idiofase, y que

las lacasas extracelulares pueden presentarse particularmente en la trofofase. En ese sentido, Schoemaker y Piontek, (1996), señalan que la LiP es una enzima producto del metabolismo secundario de los hongos de pudrición blanca y que su producción suele requerir la presencia de inductores tales como el alcohol veratrílico (p-dimetoxifenol), el cual a su vez es un metabolito secundario de éstos hongos. Cabe mencionar que en la literatura son escasos los ensayos de actividades enzimáticas de peroxidasas fúngicas en la decoloración de Naranja de Metilo, pues han sido mayormente estudiadas las peroxidasas de rábano en la decoloración de éste tinte (Liu *et al.*, 2006; Ambakar y Mukundan, 2013).

En cuanto al mecanismo de degradación del Naranja de Metilo, Sumathi y Manju, (2001), explican que la decoloración de los tintes azoicos normalmente comienza con una reducción inicial o escisión del enlace azo, lo que da como resultado compuestos incoloros y que es seguido de la degradación completa de aminas aromáticas estrictamente bajo condiciones aeróbicas para finalmente culminar con la mineralización completa de éstos colorantes. Queda por determinar en estudios futuros si este mecanismo está asociado al proceso de decoloración de la cepa TA-CMU..

Para conocer la fracción de decoloración asociada a una vía no vía enzimática se realizaron ensayos de bioadsorción de la manera anteriormente descrita. Previamente se ha reportado la capacidad de la biomasa fúngica en procesos de decoloración de azo-colorantes (Seyis y Subasioglu, 2008; Gopalakrishnan y Sellappa, 2011). En los ensayos realizados con micelio inactivo de la cepa TA-CMU de *T. versicolor* se puede observar que el porcentaje máximo de decoloración fue del 12% al séptimo día de incubación. Por lo cual podemos sugerir que la decoloración de éste colorante está dada principalmente por vía enzimática. Wang y Yu (1998) reportan la adsorción y degradación de colorantes sintéticos utilizando micelio de *T. versicolor*, concluyendo que el proceso de adsorción del colorante ocurre durante las primeras horas de contacto con las hifas y que la regeneración de micelio saturado de colorante se puede lograr mediante la desorción del mismo y la degradación enzimática. Fu y Viraraghavan (2001), explican que la decoloración por células vivas involucra mecanismos complejos, que incluyen enzimas como las oxidasas intracelulares y extracelulares y la bioadsorción.

Finalmente se evaluó la capacidad oxidativa de las enzimas presentes en un extracto enzimático crudo en la decoloración del Naranja de Metilo. En estos ensayos se puede apreciar que la solución del tinte es decolorada hasta un 10.53 % durante las primeras horas de incubación, lo cual respalda la hipótesis de que la principal vía de decoloración por parte de la cepa TA-CMU es a través de sus enzimas ligninolíticas. Es importante señalar además,

que no existen reportes en la literatura de ensayos de decoloración de Naranja de Metilo con extracto enzimático crudo.

CONCLUSIONES

La cepa TA-CMU de *T. versicolor* y su complejo de enzimas ligninolíticas presentan en conjunto gran potencial en la decoloración de tintes sintéticos del tipo azo y antraquinona. En cuanto a la producción de ligninasas, se encontró que ésta se halla en función del tipo de cosustrato donde se desarrolle el hongo. Además de ello, se documenta por primera vez la actividad de ligninasas con la especie *T. versicolor* en medios con Naranja de Metilo. Por otro lado, los ensayos de decoloración con micelio autoclaveado en comparación con aquellos que contenían células vivas muestran que éste proceso de decoloración se debe a un mecanismo que involucra ambos procesos. Por lo anterior, dicha cepa muestra gran capacidad oxidativa y por consiguiente, puede ser empleada para el biotratamiento de distintos colorantes sintéticos derivados de procesos de la industria textil.

LITERATURA CITADA

- [1] Aksu, Z. (2005). Application of Biosorption for the removal of organic pollutants – A Review. *Process Biochemistry*, 40: 997 – 1026.
- [2] Ali, H. (2010). Biodegradation of Synthetic Dyes –A Review. *Water Air Soil Pollut*, 213, 251-273.
- [3] Ali, P.A., Malekzadeh, M. (2005). Decolorization of Methyl Orange (As a Model Azo Dye) by the Newly Discovered *Bacillus* sp. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 24, 3.
- [4] Ambatkar, M., Mukundan, U. (2013). Calcium Salts Enhance Activity and Azo Dye Decolourisation Capacity of Crude Peroxidase from *Armoracia rusticana*. *American Journal of Plant Sciences*, 5, 212-218.
- [5] Aretxaga, A., Romero, S., Sarrà, M., Vicent, T. (2001). Adsorption step in the biological degradation of a textile dye. *Biotechnology Progress*, 17:664–8.
- [6] Bustard, M., McMullan, G., McHale, A.P. (1998). Biosorption of textile dyes by biomass derived from *Kluyveromyces marxianus* IMB3. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 19:427–30.
- [7] Buthelezi, S.P., Olaniran, A.O., Pilloyi, B.T. (2012). Textile Dye Removal from Wastewater Effluents Using Biofloculants Produced by Indigenous Bacterial Isolates. *Molecules*, 17, 14260-14274.

- [8] Chagas, E.P., Durrant, L.R. (2001). Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajorajau*. *Enzyme and Microbial Technology*, 29:473–7.
- [9] Dönmez, G. Bioaccumulation of the reactive textile dyes by *Candida tropicalis* growing in molasses medium. (2002). *Enzyme and Microbial Technology*, 30:363–6.
- [10] Forgacs, E., Cserhádi, T., Oros, G. (2004). Removal of Synthetic dyes from wastewaters: a review. *Environmental International*, 30(7), 953-971.
- [11] Fu, U., Viraraghavan, T. (2001). Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. *Bioresource Technology*, 79:251-262.
- [12] Ghanem, K.M., Al-Fassi1 F.A., Biag, A.K. (2012). Optimization of methyl orange decolorization by mono and mixed bacterial culture techniques using statistical designs. *African Journal of Microbiology Research*, 6(3), 575-585.
- [13] Gopalakrishnan, R., Sellappa, S. (2011). Decolourisation of Methyl Orange and Methyl Red by Live and Dead Biomass of Fungi. *Asian Journal of Experimental Biological Sciences*, 2(4) 2011: 569-574.
- [14] Hatvani, N., Mécs, I. (2002). Effect of the nutrient composition on dye decolorisation and extracellular enzyme production by *Lentinus edodes* on solid medium. *Enzyme and Microbial Technology*, 30:381–6.
- [15] Heinfling, A., Martinez, M.J., Martinez, A.T., Bergbauer, M., Szewzyk, U. (1998). Transformation of industrial dyes by manganese peroxidase from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. *Applied Environmental Microbiology*, 64(8):2788–93.
- [16] Jarosz-Wiilkolazka A, Kochman'nska-Redst, J., Malarczyk, E., Wardas, W., Leonowicz, A. (2002). Fungi and their ability to decolourize azo and antraquinonic dyes. *Enzyme and Microbial Technology*, 30:566–72.
- [17] Kapdan, I.K., Kargi, F., McMullan, G., Marchant, R. (2000). Biological decoloration of textile dyestuff by *Coriolus versicolor* in a packed bed column reactor. *Environmental Technology*, 22:231–6.
- [18] Kasinath, A., Saek, V. (2003). Decoloration of synthetic dyes by *Irpex lacteus* in liquid cultures and packed-bed bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 167-173.
- [19] Kirk, T. K., Schultz, E., Cornnors, W. J., Lorenz, L. F., Zeikus, J. G. (1978). Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochate chrysosporium*. *Archives of Microbiology*, 117: 277-285.

- [20] Libra, J.A., Borchert, M., Banit S. (2002). Competition Strategies for the Decolorization of a Textile-Reactive Dye with the White-Rot Fungi *Trametes versicolor* Under Non-sterile Conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 8(6).
- [21] Levin, L., Forchiassin, F. (2012). Contributions to research on white-rot fungi, lignin-degrading enzymes, and their industrial and environmental applications. Fungi: Types, Environmental Impact and Role in Disease.
- [22] Liu, J.Z., Wang, T.L., Ji, L.N. (2006). Enhanced dye decolorization efficiency by citratronic anhydride-modified horseradish peroxidase. *Journal of Molecular CatalysisB: Enzymatic*, 41, 81-86.
- [23] Maasa, R., Chaudhari, S. Adsorption and biological decolourization of azo dye Reactive Red 2 in semicontinuous anaerobic reactors.
- [24] Maurya, N.S., Mittal, A.K., Cornelp, A, Rother E. (2006). Biosorption of dyes using dead macrofungi. Effect of dye structure ionic strength and pH. *Bioresource Technology*, 97, 512 – 521.
- [25] Meehan, C., Banat, I.M., McMullan, G., Nigam, P, Smyth F, Marchant, R. (2000). Decolorization of Remazol Black-B using a thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* IMB3. *Environment International*, 26, 75–9.
- [26] Moreira, M.T., Mielgo, I., Feijoo, G, Lema, J.M. (2000). Evaluation of different fungi strains in the decolourisation of synthetic dyes. *Biotechnological Letters*, 22:1499–503.
- [27] Nagai, M., Sato, T., Watanabe, H., Saito, K., Kawata, M., Enei, H. (2002). Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinus edodes*, and decolorization of chemically different dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60: 327-335.
- [28] Novotný, Č., Rawal, N., Bhatt, M., Patel, M., Šašek, V., Molitoris H.P. (2001). Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes, *Journal of Biotechnology*, 89:113–122.
- [29] Nyanhongo, G.S., Gomes, J.G., Gübitz GM, Zvauya R, Read J, Steiner, W. (2002). Decolorization of textile dyes by laccase from a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Water Research*, 36:1449–65.
- [30] O'Mahony, T., Guibal, E., Tobin, J.M. (2002). Reductive dye biosorption by *Rhizopus asrhizus* biomass. *Enzyme and Microbial Technology*, 31: 456 – 463.
- [31] Padmavathy, S., Sandhya, S. Swaminathan, K., Subrahmanyam, Y.V., Chakrabarti, T., Kaul, N.S. (2003). Aerobic decoloration of reactive azo dyes in presence of various cosubstrates. *Chemical and Biochemical Engineering*, 17(2), 147-151.

- [32] Paszczyński, A., Huynh, V.B., Crawford, R. (1985). Enzymatic activities of an extracellular, manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiology Letters*.
- [33] Robinson, T., Chandran, B., Nigam, P. (2001). Studies on the production of enzymes by white-rot fungi for the decolourisation of textile dyes. *Enzyme and Microbial Technology*, 29:575–9.
- [34] Rodríguez-Couto, S., Sanromán, M. A. (2005). Coconut flesh: a novel raw material for laccase production by *Trametes hirsuta* under solid-state conditions. Application to Lissamine Green B decolourization. *Journal of Food Engineering*, 71: 208–213.
- [35] Shah, M.P., Patel, K.A., Darji, A.M. (2013). Microbial Degradation and Decolorization of Methyl Orange Dye by an Application of *Pseudomonas* Spp. ETL-1982. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, 2013, 1(1), 26-36.
- [36] Sani, R.K., Banerjee, U.C.H. (1999). Decolorization of triphenylmethane dyes and textile and dye-stuff effluent by *Kurthia* sp. *Enzyme and Microbial Technology*, 24:433–7.
- [37] Schoemaker, H.E., Piontek, K. (1996). On the interaction of lignin peroxidase with lignin. *Pure and Applied Chemistry*, 68(11), 2089-2096.
- [38] Seesuriyachan, P., Takenaka, S., Kuntiya, A., Klayraung, S., Murakami, S., Aoki, K. (2007). Metabolism of azo dyes by *Lactobacillus casei* TISTR 1500 and effects of various factors on decolorization. *Water Research*, 41(5): 985-992.
- [39] Selvam, K., M., Priya M.S., Yamuna M. (2012). Decolourization of Azo Dyes and Dye Industry Effluents by Lignin Degrading Fungus *Trametes versicolor*. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 3(3):666-672.
- [40] Seyis, I., Subasioglu, Y. (2008). Comparison of live and dead biomass of fungi on decolorization of methyl orange. *African Journal of Biotechnology*, 7 (13), 2212-2216.
- [41] Sumathi, S., Manju, B.S. (2000). Uptake of reactive textile dyes by *Aspergillus toetidus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 27: 347 – 355.
- [42] Sumathi, S., Manju, B.S. (2001). Fungal mediated decolorization of media containing procion dyes. *Water Science and Technology*, 43 (2): 285-290.
- [43] Svobodová, K., Majcherczyk, A., Novotný, Č., Kues U. (2008). Implication of mycelium-associated laccase from *Irpex lacteus* in the decolorization of synthetic dyes. *Bioresource Technonogy* 99, 463-471.

- [44] Swamy, J., Ramsay, J.A. (1999). The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes. *Enzyme and Microbial Technology*, 24:130–7.
- [45] Vijayaraghavan, K., Yun, Y.S. (2006). Utilization of fermentation waste (*Corynebacterium glutamicum*) for biosorption of reactive blacks from aqueous solutions. *Journal of Hazardous Materials*, 141: 45 – 52.
- [46] Volesky, B. (2001). Detoxification of metal bearing effluents: Biosorption for the next century. *Hydrometallurgy*, 59: 203 – 216.
- [47] Wang, Y., Yu, J. (1998). Adsorption and degradation of synthetic dyes on the mycelium of *Trametes versicolor*. *Water Science and Technology*, 38, 233-238.
- [48] Wang, Z., Xue, M., Huang, K., Liu, Z. (2011). Textile Dyeing Wastewater Treatment. *Advances in Treating Textile Effluent*, 91-116.
- [49] Welelham, A. (2000). The theory of dyeing (and the secret of life). *Journal of The Society of Dyers and Colourists*, 116: 142 143.
- [50] Wesenberg, D., Buchon, F., Agathos, S.N. (2002). Degradation of dye-containing textile effluent by agaric white-rot fungus *Clitocybula dusenii*. *Biotechnology Letters*, 24:989–93.
- [51] Wong, D. W. (2009). Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157(2):174-209.
- [52] Won, S.W., Kim, H.J., Choi, S.H., Chung, B.W., Kim, K.J., Yun, Y.S. (2006). Performance, kinetics and equilibrium in biosorption of Anionic Dye Reactive Blacks by the waste biomass of *Corynebacterium glutamicum* as a low – cost biosorbent. *Chemical Engineering Journal*, 121: 37 -43.
- [53] Yamanaka, R., Soares, C.F., Mathews, D.R., Machado K.M.G. (2008). Ligninolytic enzymes produced by *Trametes villosa* CCB 176 under different culture conditions. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39: 78 – 84.
- [54] Yang, X.Q., Zhao, X.X., Liu, C.Y.L., Zheng, Y., Qian, S.J. (2009). Decolorization of azo, triphenylmethane and anthraquinone dyes by a newly isolated *Trametes* sp. SQ01 and its laccase. *Process Biochemistry*, 5.
- [55] Zeng, X., Cai, Y., Liao, X., Zeng, X., Li, W., Zhang, D. (2011). Decolorization of synthetic dyes by crude laccase from a newly isolated *Trametes troglia* strain cultivated on solid agro-industrial residue. *Journal of Hazardous Materials*, 187: 517-525.

VII. DISCUSIÓN GENERAL

En el presente trabajo se seleccionó un aislado silvestre de un basidiomicete nativo del estado de Michoacán el cual mostraba potencial oxidativo. Como primer objetivo se planteó establecer las relaciones genéticas de la cepa TA-CMU así como analizar el incremento de actividad enzimática bajo la adición de metales divalentes. En una primera etapa se determinó la especie de la cepa de estudio, la cual había sido previamente clasificada dentro del género *Trametes* (Arredondo-Santoyo, datos no publicados). El patrón de agrupamiento generado ubica a la cepa de interés dentro de un solo clado junto con otras tres especies de *T. versicolor*. El hecho de que en el árbol filogenético se distingan dos clados principales, en uno de los cuales se agrupan a las diferentes cepas de *T. versicolor* puede deberse a la región geográfica de los diferentes aislados. El patrón de agrupamiento generado indica que la cepa TA-CMU es un aislado geográfico de *T. versicolor*. No obstante que el árbol filogenético se generó con una sola región genética, la identificación de la cepa TA-CMU es muy robusta y difícilmente será modificada con la adición de otras secuencias al estudio, como el gen 18S o el factor de elongación. No obstante es necesario tener en consideración que *T. versicolor* es considerado un complejo que puede incluir a otras especies y puede separar a aislados geográficos a futuro (Justo y Hibbert, 2011), la posición de TA-CMU en dicho complejo está fuera de los objetivos del presente trabajo.

Como segundo objetivo se planteó analizar las actividades enzimáticas ligninolíticas extracelulares de la cepa de estudio bajo la presencia de inductores orgánicos e inorgánicos. Dentro de los inductores inorgánicos (CuSO_4 y MnSO_4), el cobre mostrará un incremento de las actividades enzimáticas de lacasas y MnPs pero no de LiPs en comparación con el manganeso. En ese sentido, Haglund (2002) reporta que la capacidad del CuSO_4 y el MnSO_4 de incrementar los niveles de actividad enzimática es significativamente distinta, encontrándose un mayor incremento en presencia de las sales de cobre. Yamanaka y colaboradores (2008) encuentran un mayor efecto inductor de actividad enzimática de ligninasas empleando sales de cobre en comparación a las sales de manganeso. En relación a la actividad de LiP, existen estudios en los que se ha mostrado que en la mayoría de los hongos de pudrición blanca incluyendo algunos del género *Trametes*, se producen bajas cantidades o no producen LiP en lo absoluto (Eriksson *et al.*, 1990; Blanchette *et al.*, 1992; Hatakka, 1994). La mayor actividad enzimática observada entre fenol oxidasas y peroxidasas se detectó en las lacasas extracelulares en las que el incremento fue de hasta seis veces. Levin y Fochiassin (2012) reportan que la actividad ligninolítica está vinculada a la etapa de fisiológico en la que se encuentren los hongos, mencionan además que las lacasas

extracelulares pueden presentarse en la trofófase, aunque su producción se incrementa notablemente durante el crecimiento secundario. Mencionan por otro lado, que la síntesis de LiPs y MnPs está asociada a la idiofase. Además la presencia de sales inorgánicas no influye significativamente en el aumento de biomasa en medios de cultivo líquidos. Vasantini y colaboradores (2005) han establecido una correlación entre la biomasa total producida y las características del medio del cultivo, dentro de las cuales destacan la influencia de fuentes de carbono, nitrógeno, así como el pH y la temperatura.

Respecto a los inductores orgánicos (infusión de rastrojo al 1.5% w/v, y rastrojo molido al 2% v/v), se observó que la actividad enzimática se encuentra relacionada con los requerimientos nutricionales del hongo. En ese sentido la actividad de lacasa extracelular mostró un mayor incremento en presencia de dichos inductores que el observado para las dos peroxidasas analizadas. Por otro lado, la actividad de lacasa extracelular fue mayor en los medios con rastrojo molido que en los que contenían infusión de rastrojo, 535 U.mL^{-1} y 431.9 U.mL^{-1} respectivamente. Se detectó además la presencia de dos picos en la curva de actividad de lacasas extracelulares en los medios suplementados con rastrojo molido, lo cual puede deberse a la presencia de isoformas de lacasas que se expresan en condiciones distintas de cultivo. Ya se han reportado con anterioridad la presencia de dos isoformas de lacasas extracelulares en *T. versicolor* (Bourbonnais *et al.*, 1995; Carvalho *et al.*, 1999; Lorenzo, 2006). Por otra parte, no se detectó actividad extracelular de LiP en la presencia de éstos inductores. Schoemaker y Piontek, (1996), señalan que la LiP es una enzima producto del metabolismo secundario de los hongos de pudrición blanca y que su producción suele requerir la presencia de inductores tales como compuestos aromáticos, entre ellos el alcohol veratrílico (p-dimetoxifenol), el cual a su vez es un metabolito secundario de éstos hongos. Ya se ha documentado que las LiPs no son producidas aparentemente por todos los hongos de pudrición blanca, especialmente en aquellos considerados como degradadores selectivos de lignina (Hatakka, 1994). Gutiérrez y colaboradores (2002), mencionan que las LiPs rara vez se detectan durante la descomposición de sustratos lignocelulósicos por hongos de pudrición blanca. Para esto Hammel y Cullen (2008) mencionan que la actividad catalítica de las LiPs decrece marcadamente conforme aumenta el tamaño de la estructura de la lignina y proponen que el alcohol veratrílico juega un papel importante evitando que la enzima se inactive por permanecer largos periodos oxidada. De acuerdo con este punto de vista, el alcohol veratrílico actuaría como un donador de electrones eficiente para rescatar a la LiP de la inactivación oxidativa por H_2O_2 . Respecto a la actividad enzimática de las MnP reportada en el presente trabajo, ésta aparece durante la idiofase (fase de crecimiento), dentro

de los primeros días de la cinética enzimática tanto en los medios con rastrojo molido como infusión de rastrojo como inductores. En éste contexto, ya se han documentado a las MnPs como las principales enzimas involucradas en la despolimerización de la lignina (Hofrichter, 2002; Urek y Pazarlioglu, 2007). Por su parte, Arantes y colaboradores (2007) señalan que la eficiencia en la degradación de la lignina está dado por la acción sinérgica de las lacasas extracelulares y las MnPs.

Derivado de éstos estudios fue que se planteó evaluar el proceso de delignificación de rastrojo de maíz (*Zea mays*). En estos ensayos se encontró que el proceso de delignificación ocurre durante las primeras dos semanas de contacto con el hongo.

Respecto a la capacidad oxidativa de ligninasas y su uso para el biotratamiento de residuos provenientes de la industria papelera se encontró que las actividades de lacasas extracelulares (39.7 U L^{-1} para el Licor Negro y 404.5 U L^{-1} para el agua residual papelera) fueron similares a las encontradas en otras cepas de *Trametes versicolor* (Mesa *et al.*, 2008), así como en otros hongos de pudrición blanca, como *Pleurotus ostreatus* (Zhao *et al.*, 2008). En cuanto a las actividades de las peroxidasas, se obtuvieron valores superiores en los medios con Agua Residual Papelera que en aquellos con Licor Negro. Esto sugiere que la alta concentración de lignina, lignina soluble y lignocelulosa, pueda ejercer un efecto inhibitorio sobre la actividad de las peroxidasas como lo reportan Font y colaboradores (2003). De manera adicional, Santos y Linardi (2004) encontraron en estudios de degradación de compuestos fenólicos, que el grado de degradación de fenoles y el tiempo necesario para que se lleve a cabo éste proceso, depende no sólo de la cepa empleada sino también de la concentración inicial de fenol en el medio de cultivo. De forma simultánea a los ensayos de actividad enzimática, se cuantifico espectrofotométricamente el decremento en la coloración del Agua Residual Papelera y Licor Negro. En estos ensayos el porcentaje de decoloración fue superior al 60% para ambos casos. Particularmente en el Licor Negro se observa un incremento en la pigmentación al tercer día de incubación, lo cual se correlaciona con los resultados obtenidos en los ensayos en placa. Hay reportes en la literatura en los que se ha encontrado que una vez que ha iniciado un proceso de decoloración por actividad ligninolítica fúngica en muestras provenientes de efluentes de la industria papelera, éstos pueden recuperar el color, posiblemente debido al alto peso molecular de los grupos cromóforos (Selvam *et al.*, 2002; Muregesam, 2003). Ya se ha descrito además la implicación de las enzimas ligninolíticas en la degradación de clorofenoles por hongos de podredumbre blanca que catalizan la formación de quinonas como paso previo a su

detoxificación (Joshi y Gold, 1993; Grey *et al.*, 1998; Leontievsky *et al.*, 2000) siendo las quinonas las moléculas generadas durante el proceso de oxidación de los fenoles (Shradda *et al.*, 2011). Estudios recientes indican que la oxidación del sustrato fenólico por acción de las lacasas da por resultado la formación de un radical ariloxi, una especie activa que se convierte en una quinona en la segunda etapa de la oxidación (Chandra y Chowdhary, 2014). El pH es otro factor importante, debido a que existe una relación directa entre éste y el color del licor también, pues cuando se acidifica el pH del Licor Negro decrece el color en éste, pasando de café a amarillo. El color del licor es derivado de grupos provenientes de la degradación parcial de la lignina, incluyendo quinonas, grupos carboxílicos, ácidos carboxílicos, entre otros (Mussatto *et al.*, 2007). Los componentes que le confieren el color al licor no son removidos en rangos de pH entre 12.56 y 5.98, y el color del licor es fuertemente afectado en pH ácido, sugiriendo que los componentes cromóforos son removidos con pH entre 6 y 3.2. Por otro lado, para conocer la fracción del agua Residual Papelera y Licor Negro que no eran degradados por métodos enzimáticos, se llevaron a cabo ensayos de biosorción en medio líquido. En ellos se puede observar que el micelio inactivado fue capaz de fijar mayor cantidad de moléculas coloridas por encima del 20%, en presencia de Licor Negro y Agua Residual Papelera durante los primeros cuatro y nueve días de incubación respectivamente. Esto sugiere que los contenidos fenólicos tan heterogéneos del licor negro y el agua residual papelera puedan influir en los tiempos de decoloración por fijación a pared. Ya existen reportes del uso de decoloración de licor negro con micelio inactivo de *T. versicolor* (Mesa *et al.*, 2008). Wu y colaboradores (2004), reportan hasta un 45% de decoloración de Licor Negro (10% v/v) a los trece días de incubación, por su parte Saritha y colaboradores (2010), reportan el uso de *T. hirsuta* en la decoloración de éstos compuestos, logrando hasta un 60% de decoloración de licor negro posterior a los diecinueve días de interacción con el micelio. De forma complementaria se realizó la determinación de fenoles al inicio y término de las cinéticas de decoloración, esto con la finalidad de conocer si el decremento en la coloración que se siguió a lo largo de la cinética realmente correspondía a compuestos fenólicos. En éste apartado podemos observar que el porcentaje de fenoles remanentes fue menor en el Agua Residual respecto al Licor Negro, datos que se correlacionan con las actividades enzimáticas de ligninasas reportadas. Finalmente se evaluó la capacidad oxidativa de las enzimas presentes en un extracto enzimático crudo en la decoloración de licor negro y agua residual papelera. En éstos ensayos sólo el Licor Negro fue degradado de manera significativa durante las primeras horas de incubación, alcanzando

un valor de 44.3%. Es importante señalar que no existen reportes en la literatura de ensayos de decoloración de licor negro con extracto enzimático crudo.

Otros residuos generados a nivel industrial que tienen efecto potencialmente tóxico y contaminante son los colorantes sintéticos. Por tal motivo se evaluó el efecto de las enzimas ligninolíticas de la cepa de estudio para decolorar diversos tintes, encontrándose que en medio líquido, los tintes Fucsina Ácida, Chicago Sky Blue, Azul Ácido, Azul Remazol Brillante fueron decolorados en su totalidad, excepto el Azul Directo 71 (97%) y el Naranja de Metilo (81%), siendo éste último el más recalcitrante. En particular, son escasos los reportes en la literatura de la decoloración de Naranja de Metilo empleando cepas fúngicas (Zucca *et al.*, 2012) ya que mayoritariamente se han realizado haciendo uso de cepas bacterianas, principalmente de los géneros *Bacillus* Spp. (Ali y Fereydon, 2005), *Lactobacillus* Spp. (Seesuriyachan *et al.*, 2007), *Pseudomonas* spp. (Shah *et al.*, 2013), así como mezclas bacterianas (Ghanem, 2012). En estos estudios el porcentaje máximo de decoloración del Naranja de Metilo es alrededor del 80%, lo cual es equiparable a los resultados obtenidos en este trabajo. Dada la estructura química de éstos colorantes, estos pueden presentar grupos azo así como estructuras aromáticas, que les confieren alta estabilidad y los hace difícil de degradar por métodos físicos. Sin embargo estas características estructurales los convierten en blanco de la actividad de las enzimas ligninolíticas. Es por ello que durante el proceso de decoloración se determinó la actividad enzimática de ligninasas de la cepa de estudio, pudiéndose observar que la primera actividad enzimática en ser detectada es la de la lacasa, con un pico máximo de 140 U L^{-1} , resultado similar a lo encontrado por Ambalkar y Mukundan (2013). Por otro lado, también se pudo apreciar que las actividades enzimáticas de las peroxidasas aparecen luego de que decae la actividad máxima de la lacasa extracelular. Levin y Fochiassin (2012) reportan que la síntesis de LiP y MnP está asociada a la idiofase y que las lacasas extracelulares pueden particularmente presentarse en la trofofase. En ese sentido, Schoemaker y Piontek, (1996), señalan que la LiP es una enzima producto del metabolismo secundario de los hongos de pudrición blanca. Cabe mencionar que en la literatura son escasos los ensayos de actividades enzimáticas de peroxidasas fúngicas en la decoloración de Naranja de Metilo, pues han sido mayormente estudiadas las peroxidasas de rábano en la decoloración de éste tinte (Liu *et al.*, 2006; Ambakar y Mukundan, 2013).

En cuanto al mecanismo de degradación del Naranja de Metilo, Sumathi y Manju, (2001), explican que la decoloración de los tintes azoicos normalmente comienza con una reducción inicial o escisión del enlace azo, lo que da como resultado compuestos incoloros

y que es seguido de la degradación completa de aminos aromáticos estrictamente bajo condiciones aeróbicas para finalmente culminar con la mineralización completa de éstos colorantes. Para conocer la fracción de colorante que no era removida por vía enzimática se realizaron ensayos de bioadsorción micelio inactivado. Ya se ha reportado la relación de la biomasa fúngica en el proceso de decoloración de azo-colorantes (Seyis y Subasioglu, 2008; Gopalakrishnan y Sellappa, 2011). En los ensayos realizados con micelio inactivo de la cepa TA-CMU de *T. versicolor* se puede observar que el porcentaje máximo de decoloración fue del 12% al séptimo día de incubación. Por lo cual se puede sugerir que la remoción de éste colorante de la solución acuosa está dado principalmente por vía enzimática. Wang y Yu (1998) reportan la adsorción y degradación de colorantes sintéticos utilizando micelio de *T. versicolor*, concluyendo que el proceso de adsorción del colorante ocurre durante las primeras horas de contacto con las hifas y que la regeneración de micelio saturado de colorante se puede lograr mediante la desorción del mismo y la degradación enzimática. Fu y Viraraghavan (2001), explican que la decoloración por células vivas involucra mecanismos complejos, que incluyen enzimas como las oxidasas intracelulares y extracelulares y la bioadsorción. Finalmente se evaluó la capacidad oxidativa de las enzimas presentes en un extracto enzimático crudo en la decoloración del Naranja de Metilo. En estos ensayos se puede apreciar que el tinte es degradado durante las primeras horas de incubación, lo cual respalda la hipótesis de que la principal vía de decoloración por parte de la cepa TA-CMU es a través de sus enzimas ligninolíticas. Es importante señalar además, que no existen reportes en la literatura de ensayos de decoloración de Naranja de Metilo con extracto enzimático crudo.

VIII. CONCLUSIONES GENERALES

1. La hipótesis de éste trabajo se cumple, ya que la cepa TA-CMU presenta las tres principales enzimas del complejo ligninolítico las cuales actúan eficientemente sobre sustratos orgánicos diversos, incluyendo residuos agrícolas y xenobióticos.
2. De acuerdo al análisis filogenético se concluye que la cepa de estudio pertenece a la especie *Trametes versicolor*.
3. La la adición de CuSO_4 (150 μM) mostró el mayor incremento de actividad de lacasa extracelular y MnP pero no de LiP. La adición de estos metales no influyó en la producción de biomasa.
4. De los inductores orgánicos, el rastrojo de maíz sólido (2% w/v) mostró el mayor incremento de actividades enzimáticas de lacasa extracelular y MnP sobre la infusión de rastrojo (1.5% v/v) respecto al control. Debido a lo anterior se sugiere que la cepa TA-CMU puede ser empleada para el tratamiento de distintos residuos agrícolas.
5. La cepa TA-CMU muestra gran capacidad oxidativa y degradativa de residuos generados durante el proceso de blanqueo del papel, como los fenoles, por lo cual puede ser empleada para el biotratamiento de distintos xenobióticos.
6. Las enzimas ligninolíticas en conjunto con el micelio de la cepa TA-CMU lograron la decoloración de tintes sintéticos del tipo azo y antraquinona, por lo que dicha cepa muestra gran capacidad oxidativa y puede ser empleada para el biotratamiento de distintos colorantes sintéticos derivados de procesos de la industria textil

IX. PERSPECTIVAS

1. Es importante conocer la secuencia de los genes de ligninasas. Esto ayudará a conocer si hay presencia de isoformas de las enzimas además de permitir la realización análisis bioinformáticos y de mutagénesis dirigida.
2. La realización de ensayos de qRT-PCR permitirá correlacionar las actividades enzimáticas reportadas con los niveles de transcrito. Esto ayudará a conocer el tipo de regulación genética de las lacasas extracelulares, LiPs y MnPs.
3. La purificación de las lacasas extracelulares y MnPs permitirá su aplicación en procesos biotecnológicos e industriales.
4. La implementación de ensayos de digestibilidad in vitro de rastrojo de maíz (*Zea mays*) en presencia de la cepa de estudio permitirá conocer la factibilidad de ser usado en el biotratamiento de residuos agrícolas para la mejora del contenido nutricional de alimento para ganado.
5. La determinación de fenoles de las muestras provenientes de la industria papelera al inicio y término de la cinética por análisis instrumental aportará un dato más preciso del mecanismo de degradación enzimática, que a su vez será un punto de partida para la aplicabilidad de éstas enzimas en distintos rubros.