



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

**Despolimerización de lignina residual de paja de trigo
por ascomicetos para la producción de biogás**

Tesis

Que para obtener el grado de Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M.C. Eduardo Baltierra Trejo

**Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas
Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales**



Director: Dra. Liliana Márquez Benavides Co-Director: Dr. Juan Manuel Sánchez Yáñez

Morelia, Mich. Marzo de 2017.



Abreviaturas	0
<i>Despolimerización de lignina residual de paja de trigo por ascomicetos para la producción de biogás.....</i>	1
<i>Resumen.....</i>	1
1. Introducción	3
1.1. Potenciales aplicaciones de la lignina residual de paja de trigo	3
1.2. Aprovechamiento de los componentes estructurales de la paja de trigo.....	4
1.3. Hongos ligninolíticos	8
1.4. Enzimas degradadoras de lignina	9
• <i>Lacasa</i>	9
• <i>Lignina peroxidasa</i>	10
• <i>Manganeso peroxidasa</i>	10
1.5. Bioquímica de degradación de la lignina	10
1.6. Ruptura del anillo aromático	12
1.7. Digestión anaerobia metanogénica	13
2. Antecedentes	15
3. Justificación	17
4. Hipótesis	18
5. Objetivos.....	18
5.1. Objetivo general	18
5.2. Objetivos particulares.....	18
6. Planificación experimental	19
7. Diagrama de la planificación experimental.....	20
8. CAPÍTULO I. Inducción de la degradación de la lignina residual de paja de trigo por <i>Aspergillus spp</i> y <i>Penicillium Chrysogenum</i>	22
9. CAPÍTULO II. Generación de monómeros aromáticos por <i>Aspergillus</i> Y <i>Penicillium spp</i> a partir de lignina residual de paja de trigo	24
10. CAPÍTULO III. Generación de ácidos grasos de cadena corta a partir de la degradación de la lignina residual de paja de trigo	26



11. CAPÍTULO IV. Conversión de los productos de la despolimerización de la lignina residual de paja de trigo en biogás	28
11.1. Material y métodos.....	28
Selección y cultivo de los ascomicetos	28
Cultivo de los ascomicetos	28
Activación de los ascomicetos	28
Preparación de inóculo	29
Contenido de lignina y holocelulosas	30
Extracción preliminar de la lignina.....	30
Determinación de celulosas y hemicelulosas	30
Determinación de lignina.....	31
Determinación del porcentaje de despolimerización.....	31
Determinación de la actividad enzimática.....	32
Lacasa	32
Lignina peroxidasa.....	32
Manganeso peroxidasa.....	33
Identificación de productos de despolimerización de la lignina residual de paja de trigo	33
Identificación de aromáticos.....	33
Identificación de ácidos grasos.....	34
Conversión de la lignina despolimerizada en metano.....	34
Análisis estadístico	35
11.2. Resultados y discusión	36
Porcentaje de despolimerización	36
Actividad enzimática	37
Contenido de lignina y holocelulosas	39
Análisis de la despolimerización de distintas concentraciones de LIREPATO	41
Análisis de la producción de aromáticos en distintas concentraciones de LIREPATO	43
Análisis de la producción de ácidos grasos de cadena corta.....	45
Generación de biogás a partir de los productos de despolimerización de la LIREPATO	47
12. Conclusiones	50
13. Literatura Citada	51

Abreviaturas

Lac

Lacasa

LiP

Lignina peroxidasa

LIREPATO

Lignina residual de paja de trigo

MnP

Manganeso peroxidasa



Despolimerización de lignina residual de paja de trigo por ascomicetos para la producción de biogás

Resumen

La paja de trigo es un residuo agrícola del que se generan a nivel mundial 877 millones de toneladas anuales, de las cuales debido a su recalcitrancia y pocas alternativas de manejo únicamente se aprovechan el 15 %. El restante 85 % se elimina por incineración, lo que causa un impacto ambiental negativo por la emisión de gases de efecto invernadero. Se ha propuesto el aprovechamiento biotecnológico de los componentes estructurales de la paja de trigo, como por ejemplo la celulosa y las hemicelulosas en la obtención de bioetanol. Sin embargo, en el caso de la lignina, es un producto residual con pocas alternativas de explotación. El objetivo de esta investigación fue establecer un modelo biotecnológico para el aprovechamiento de la lignina residual de paja de trigo (LIREPATO) en la generación de compuestos de valor y dirigir su biodegradación hasta metano como fuente alternativa de energía. Para ello se seleccionaron cepas de ascomicetos con la mayor actividad enzimática, para degradar la LIREPATO en concentración de hasta 50 g L⁻¹. Por cromatografía de gases se identificaron los aromáticos producto de la despolimerización de la LIREPATO, así como los ácidos grasos que en teoría se producen tras la oxidación y ruptura de los anillos aromáticos. Finalmente se analizó la conversión de los ácidos grasos en metano en botellas de prueba de digestión anaerobia. Se encontró que es posible aprovechar la LIREPATO en la generación de compuestos de valor industrial, como son los aromáticos y los ácidos grasos de cadena corta y dirigir su biodegradación hasta CH₄ como fuente alternativa de energía.

Palabras clave: aromáticos, biogás, degradación, lacasa, ácidos grasos.



Depolymerization of residual lignin from wheat straw by ascomycetes for the production of biogas

Abstract

Wheat straw is an agricultural residue that represents 877 million tons per year worldwide. Due to its recalcitrance and few management alternatives, only 15 % is exploited while 85 % is eliminated by incineration, causing a negative environmental impact due to the emission of greenhouse gases. The biotechnological use of structural components of wheat straw such as cellulose and hemicelluloses in the production of compounds such as bioethanol, has been well studied; however, the lignin-fraction is considered a residual product with few exploitation alternatives. The aim of this research was to establish a biotechnological model: utilization of residual lignin from wheat straw (RLWS) in the generation of valuable compounds and to direct its biodegradation to methane as an alternative source of energy. For this purpose, strains of ascomycetes with high enzymatic activity were selected, and were used to degrade RLWS in concentrations up to 50 g L⁻¹. Gas chromatography identified the aromatic product of the depolymerization of RLWS, as well as the fatty acids that the literature suggested were produced after the oxidation and rupture of the aromatic rings. Finally, the conversion of the fatty acids into methane in test bottles of anaerobic digestion was analyzed. It was found that it is possible to take advantage of RLWS in the generation of compounds of industrial value as aromatic or short chain fatty acids and direct its biodegradation to CH₄ as an alternative source of energy.

Keywords: aromatic, biogas, degradation, laccase, fatty acids



1. Introducción

El *Triticum aestivum* L. (trigo) es el cultivo más extendido a nivel mundial, sembrado en 115 países con una producción de 675 millones de toneladas anuales (Kim y Dale, 2004) (Tabla 1). Como subproducto se estima se generan 877 millones de toneladas de paja (FAO, 2012; Talebnia *et al.*, 2010), cuya disposición común es la incineración “*in situ*”, con un impacto ambiental negativo por la emisión de partículas en suspensión (PM₁₀) y gases de efecto invernadero: CO, CO₂, NO₂, SO₂, O₃ (Li *et al.*, 2008; Quintero-Núñez y Moncada-Aguilar, 2008). En México, las quemas agrícolas es una problemática en los estados de Sonora, Guanajuato, Baja California, Jalisco, Michoacán y Tlaxcala, donde se ha relacionado con el aumento en la incidencia de enfermedades respiratorias, como son alergias, asma y enfisema pulmonar (Quintero-Núñez y Moncada-Aguilar, 2008).

Tabla 1. Producción de residuos agrícolas.

Cultivo	Producción mundial		Producción nacional	
	Cultivo (10 ⁶ Ton/año)	Residuo (10 ⁶ Ton/año)	Cultivo (10 ⁶ Ton/año)	Residuo (10 ⁶ Ton/año)
Maíz	875	1,680	22.1	42.4
Trigo	675	877	2.3	2.9
Arroz	718	862	0.2	0.2
Caña azúcar	1,774	532	50.9	15.3
Soya	253	278	0.2	0.3
Cebada	132	185	1.0	1.4
Sorgo	58	64	7.0	7.7
Avena	21	29	0.1	0.1
Total	4,507	4,509	84	70

(FAO, 2012; Talebnia *et al.*, 2010)

1.1. Potenciales aplicaciones de la lignina residual de paja de trigo

La utilización de la paja de trigo en la ganadería es limitada, debido a su bajo valor nutritivo y a su lenta velocidad de degradación en rumen (Tabla 2). El contenido proteico de la paja de trigo es menor al 3.4% y el total de nutrientes digeribles del 43%, lo que es menor al requerimiento de animales de engorde el cual es de 8 y del 55% respectivamente, por lo que este alimento debe enriquecerse con otros suplementos nutricionales.



Por otro lado, su incorporación al suelo, como en la labranza de conservación, no es recomendable debido a su alta relación carbono/nitrógeno (C/N) que es de 150:1, mientras que el adecuado para un suelo agrícola de 30:1 (González y Fernández, 2011).

Tabla 2. Valores nutrimentales de pajas agrícolas.

Paja	Proteína(%)	Calcio (%)	Fósforo (%)	Total de nutrientes digeribles (%)
Trigo	3.4	0.18	0.11	43
Cebada	4.9	0.13	0.08	44
Avena	4.5	0.26	0.10	48
Lino	5.4	0.26	0.08	43
Garbanzo	6.5	--	--	45
Chícharo	6.4	0.60	0.19	45
Lenteja	8.5	0.65	0.20	45
Alfalfa	14	1.30	0.19	61
Arroz	3.6	0.22	0.08	41
Soya	5.2	0.19	0.09	43
Mazorca maíz	9.0	0.03	0.31	88
Soya grano	49.9	0.40	0.71	84

(González y Fernández, 2011)

1.2. Aprovechamiento de los componentes estructurales de la paja de trigo

Los principales componentes estructurales de la paja de trigo son los polímeros de la pared celular vegetal, la celulosa (35%), las hemicelulosas (26%) y la lignina (17%) (Xu *et al.*, 2006) (Tabla 3). En el caso de la paja de trigo se han hecho investigaciones sobre el aprovechamiento biotecnológico de la celulosa y las hemicelulosas extraídas por métodos fisicoquímicos en la generación de bioetanol y biohidrógeno (Dashtban *et al.*, 2010); sin embargo, la lignina es un producto residual con pocas alternativas de manejo, debido a su recalcitrancia (Chávez-Sifontes y Domine, 2013).



Tabla 3. Contenido de lignina, celulosa y hemicelulosas en residuos agrícolas y maderables.

Cultivo	Lignina (%)	Celulosa (%)	Hemicelulosas (%)
Álamo	27.7	48.9	17.3
Eucalipto	26.91	48.07	16.76
Pino	25.9	41.7	23.1
Bagazo caña	23.09	39.01	27.08
Mazorca maíz	18.7	38.5	32.8
Rastrojo maíz	18.59	37.69	22.6
Pasto varilla	17.56	30.97	25.55
Paja trigo	16.85	35.8	26.8
Paja sorgo	16.09	44.6	25.3
Paja arroz	15.38	35.62	11.96
Paja frijol	9.35	30.64	23.14

(FAO, 2012; Talebnia *et al.*, 2010)

La función de la lignina (Figura 1) en las plantas es resistencia al estrés mecánico y ataque de microorganismos fitopatógenos (Rodríguez *et al.*, 1997). Es un polímero heterogéneo constituido principalmente por tres tipos de unidades de aromáticos derivadas del alcohol *p*-hidroxicinámico (Figura 2), unidas por enlaces aril-éter (β -O-4), aril-aril y carbono-carbono (C-C) (Dekker *et al.*, 2002; Martinez *et al.*, 2005). Debido a la estructura química compleja y a la estabilidad de los anillos aromáticos, es difícil su degradación biológica.

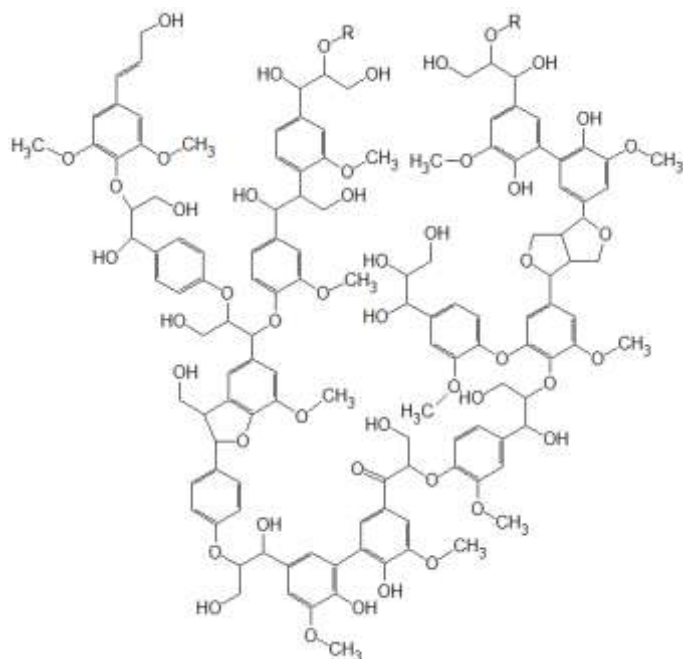


Figura. 1 Modelo de la estructura química de la lignina (Buranov y Mazza, 2008)

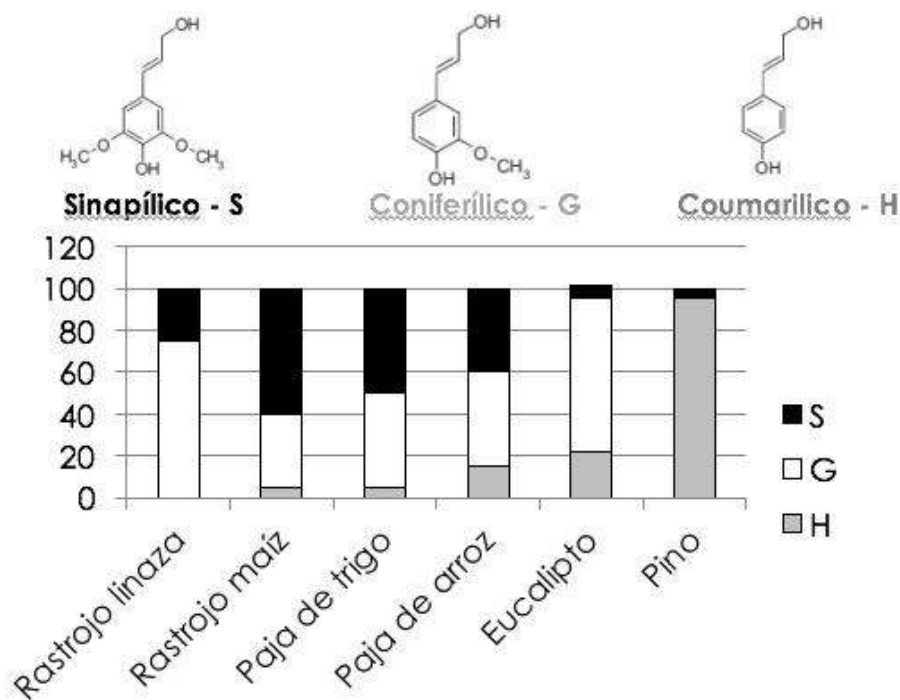


Figura 2. Composición de los 3 tipos de unidades de la lignina en residuos agrícolas y maderables (Buranov y Mazza, 2008).



Si se consigue la despolimerización de la lignina residual de paja de trigo (LIREPATO) sería una fuente potencial de materia prima para la obtención de compuestos de valor industrial o fuentes alternativas de energía. La despolimerización de la LIREPATO es factible por métodos físico-químicos con la desventaja de que son costosos y contaminantes (Figura 3). Una alternativa novedosa ambientalmente segura son los basidiomicetos y los ascomicetos que producen enzimas extracelulares con capacidad de despolimerizar la LIREPATO, para su aprovechamiento (Dekker *et al.*, 2002).

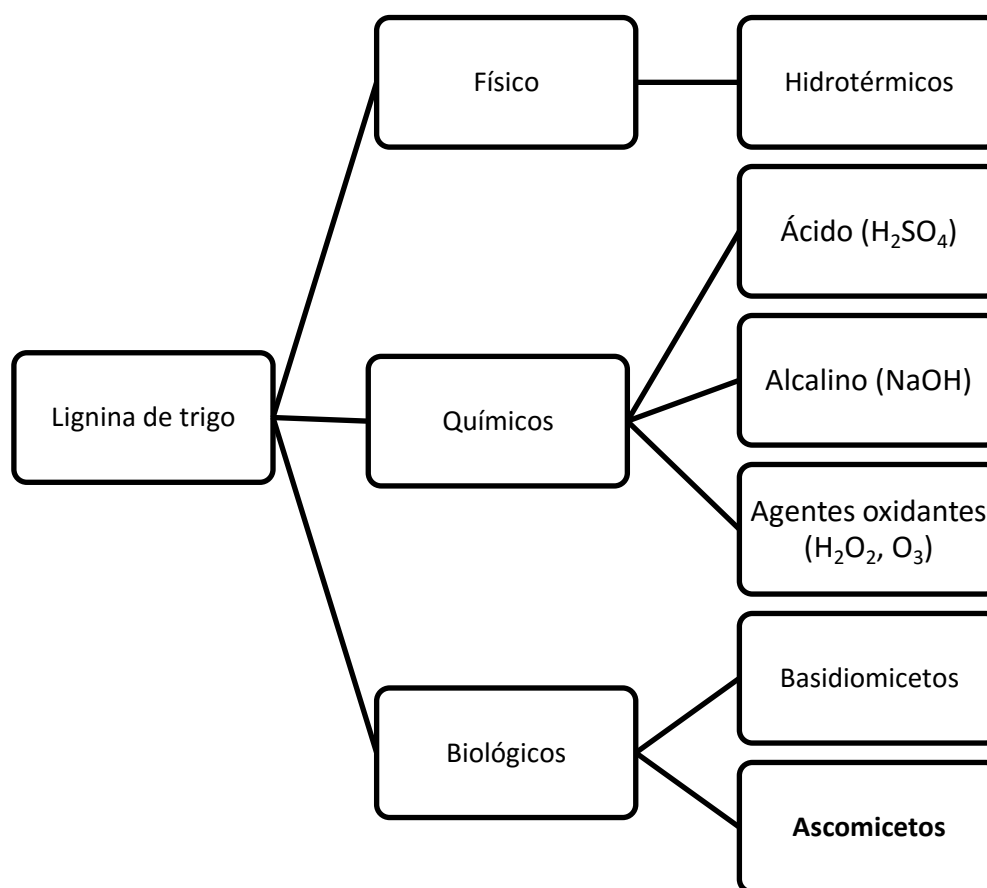


Figura 3. Alternativas para el tratamiento de despolimerización de la lignina de pajas agrícolas



1.3. Hongos ligninolíticos

Los ascomicetos son hongos mitospóricos que habitan ambientes terrestres y acuáticos, existen formas de vida libre, en simbiosis formando líquenes con algas o cianobacterias, parásitos de animales y plantas, se calcula que existen 64.000 especies (Madigan *et al.*, 2010). Se ha investigado la capacidad que tienen algunos géneros de este grupo en la despolimerización de lignina y las enzimas involucradas en este proceso.

El uso de hongos para la degradación de lignina de pajas agrícolas, ha sido investigado ampliamente en basidiomicetos, en específico de la podredumbre blanca (Chang *et al.*, 2012). Entre los géneros más analizados están *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* y *Pleurotus ostreatus* (Sánchez, 2009). Si bien los basidiomicetos son efectivos en la despolimerización de la lignina requieren un medio de cultivo complejo (formas de carbono y nitrógeno orgánico, así como factor de crecimiento) y poseen tiempo de generación lento.

Una alternativa poco investigada es el empleo de ascomicetos, que tienen una capacidad similar o superior a la de basidiomicetos, con la ventaja de que tienen necesidades nutricionales mínimas y un tiempo de generación menor (Chang *et al.*, 2012; Ferraz y Durán, 1995; Zeng *et al.*, 2006). Al respecto Durán *et al.* (1987) demostraron que el ascomiceto *Chrysonilia sitophila* degrada madera con igual potencial que el basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium*; Nilsson y Daniel (1989) reportaron una mayor capacidad de despolimerización de la lignina en el ascomiceto *Daldania concentrica* comparada con el basidiomiceto *T. versicolor*. Sinigani *et al.* (2005) estudiaron a basidiomicetos *Armillaria sp.*, *Polyporus sp.*, y *P. chrysosporium*, así como ascomicetos terrestres *Aspergillus terreus* y *Trichoderma reesei*, en la despolimerización de lignina de paja de trigo, cebada, arroz y chícharo. Reportaron que estos ascomicetos tuvieron similar capacidad de despolimerización que los basidiomicetos; Chang *et al.* (2012) estudiaron al basidiomiceto *P. chrysosporium* y el ascomiceto fitoparásito *Fusarium moniliforme* en la despolimerización de paja de arroz, y encontraron mayor capacidad de degradación con el ascomiceto.



1.4. Enzimas degradadoras de lignina

Paralelamente se han descrito las enzimas involucradas en la despolimerización, en basidiomicetos se ha encontrado que participan la lacasa (Lac), la lignino peroxidasa (LiP), y la manganeso peroxidasa (MnP) y más reciente la versátil peroxidasa (Martinez *et al.*, 1996), mientras que en ascomicetos se ha descrito principalmente la Lac y pocos reportes de la LiP y la MnP (Dekker *et al.*, 2002). Estas enzimas actúan liberando radicales libres que catalizan la oxidación de las redes estructurales de la lignina (Figura 4).

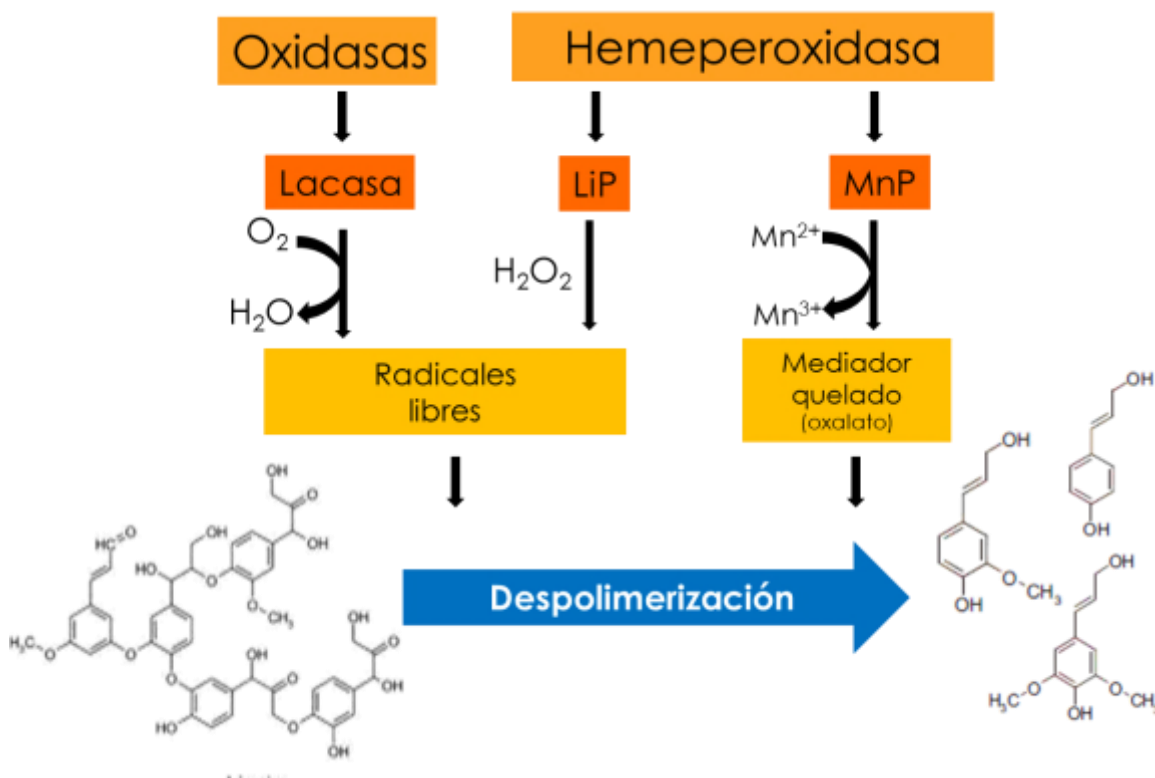


Figura 4. Mecanismo de acción de las enzimas ligninolíticas (Dashtban *et al.*, 2010).

- *Lacasa*

La Lac o p-difenol:dioxígeno oxidoreductosa es una enzima dependiente de Cu que cataliza la oxidación de fenólicos, como lignina, ortofenol, parafenol, aminofenol, polifenol, poliamina, aril-diamina con reducción de O_2 a H_2O (Halaburgi *et al.*, 2011; Younes y Sayadi, 2011), esta enzima existe en basidiomicetos, ascomicetos, plantas superiores, insectos y algunos géneros bacterianos heterotróficos aerobios (Chakroun *et al.*, 2010).



- *Lignina peroxidasa*

La LiP es una enzima con un grupo prostético fierro (Fe) con una alta capacidad de oxidación, que cataliza la ruptura de enlaces C-C y C-O, lo que fragmenta las redes estructurales de lignina, con su actividad se forman radicales peróxido (H_2O_2) que a su vez participan en la oxidación y demetilación de fenol, así como en la ruptura del anillo aromático. La LiP se ha detectado en basidiomicetos y ascomicetos (Gubernatorova y Dolgonosov, 2010). Se ha reportado que las LiP de los ascomicetos *Daldinia concéntrica* y *Crysonilia sitophila* son tan eficientes en degradar lignina como la de los basidiomicetos *Trametes versicolor* y *Phanerochaete chrysosporium* (Ferraz y Durán, 1995; Rodríguez *et al.*, 1997).

- *Manganeso peroxidasa*

La MnP es una glicoproteína dependiente de H_2O_2 y de la oxidación de Mn^{2+} a Mn^{3+} , el cual se libera de la enzima al unirse al oxalato que actúa como un mediador de reacciones de óxido-reducción de monoaromáticos y en la generación de radicales libres (Bonugli-Santos *et al.*, 2012; Dashtban *et al.*, 2010), sin embargo, ha sido poco estudiada en ascomicetos (Gubernatorova & Dolgonosov, 2010).

1.5. Bioquímica de degradación de la lignina

El mecanismo de despolimerización de la lignina se ha descrito principalmente en basidiomicetos, se divide en los siguientes pasos (Ferraz y Durán, 1995):

1. Fragmentación de las redes de lignina. Por ruptura de enlaces $C_\alpha-C_\beta$ y $\beta-O-4$ aril con la formación de monómeros aromáticos, que difieren en sus grupos funcionales sustituyentes (Figura 5).
2. Oxidación de los grupos funcionales en los aromáticos. Esto ocurre por demetilación con formación de grupos hidroxilo, así como la oxidación de los grupos metil y oximetil en grupos carboxilo. Los aromáticos se oxidan gradualmente hasta tres formas menos complejas: el cetecol, ácido protocatecuico y el gentisato.



S	G	H
I) Derivados del cinamato		
ácido ferúlico		ácido <i>p</i> -hidroxicinámico (ácido <i>p</i> -coumarico)
II) Benzoaldehídos		
Siringaldehído	Vainillina	Veratraldehído
III) Benzoalcoholes		
alcohol vainílico	alcohol veratrílico 3, 4 dimetoxibenzil alcohol	
IV) Benzoatos para-fenólicos		
ácido siringico	ácido vainílico	ácido veratrílico Ácido 3.4-dimetoxibenzoico
V) Benzoatos sustuidos		
ácido benzoico	ácido 2,6-dimetoxi benzoico	gentisato
VI) Sustituidos con grupos hidroxil y oximetil		
2,6-dimetoxifeno	Guayacol	Catecol

Figura 5. Diversidad de aromáticos producto de la despolimerización de la lignina, agrupados por sustituyentes en los tipos S, G y H (siringol, guayacol e hidroxifenol) (Dekker *et al.*, 2002).



1.6. Ruptura del anillo aromático

La ruptura de los anillos aromáticos en la degradación biológica ocurre en tres fases: a) demetilación o hidroxilación de los radicales en el anillo aromático; b) oxidación y apertura del anillo aromático, c) descarboxilación y partición del ácido oxálico (HOOC-COOH) con la formación de dos ácidos grasos de cadena corta: el ácido acético y el succinato. La hidroxilación consiste en la incorporación de dos grupos hidroxilo en el anillo aromático, que generan a un intermediario dihidroxilado susceptible a la acción de dioxigenasas específicas que provocarán la apertura del anillo (Harayama, 1992). Este derivado dihidroxilado será canalizados por tres rutas: la del catecol, del ácido protocatecuico o del gentisato en función de la posición en la que se efectúe la apertura del anillo (Van Der Meer *et al.*, 1992).

En la ruptura del anillo aromático por la ruta del catecol o en la del ácido protocatecuico se identifica al ácido 3-cetoadípico como intermediario común, previo a la formación de dos ácidos grasos que se metabolizan como acetil-CoA y succinil-CoA (Rochkind *et al.*, 1986). En la Figura 6 se detallan los intermediarios metabólicos de estas rutas. En la literatura no se describen otras posibles rutas de ruptura de aromáticos ni de formación de ácidos grasos de cadena corta.

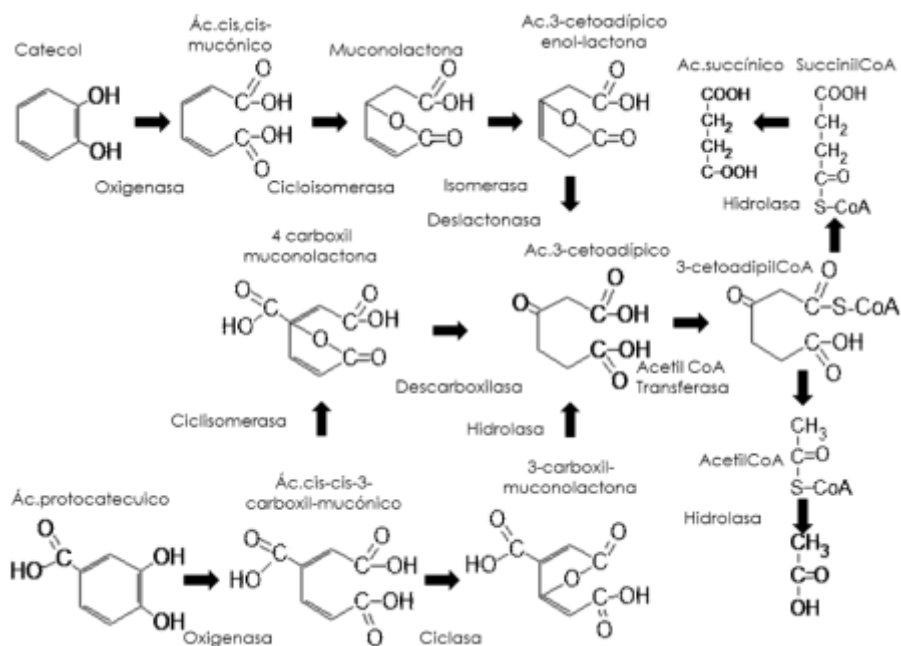


Figura 6. Ruta metabólica de la ruptura de aromáticos (Rochkind *et al.*, 1986).



1.7. Digestión anaerobia metanogénica

Los productos de despolimerización de la LIREPATO están constituidos por aromáticos recalcitrantes, incluso algunos tóxicos para la vida microbiana. Sin embargo, en teoría tras la ruptura del anillo aromático, son susceptibles de degradarse en la metanogénesis, mediante la ruta del ácido 3-cetoadípico con la metanogénesis.

La degradación anaerobia metanogénica de la materia orgánica ocurre por la acción de distintos grupos bacterianos en tres etapas: 1. Hidrólisis y fermentación, 2. Acetogénesis y 3. Metanogénesis (McInerney *et al.*, 1981).

En la primer etapa los polímeros como la celulosa, la pectina y proteínas son transformados por hidrólisis y fermentación en ácidos carboxílicos, alcoholes, H_2 y CO_2 . Los géneros bacterianos pertenecientes a esta etapa son anaerobias facultativas (Madigan *et al.*, 2010).

En la acetogénesis participan tres grupos de microorganismos: las bacterias acetogénicas productoras obligadas de hidrógeno convierten los productos de la hidrólisis en CH_3-COOH , H_2 y CO_2 ; las bacterias homoacetogénicas que generan acetato a partir de H_2 , CO_2 , glucosa y fructuosa; el tercer grupo son las bacterias reductoras de sulfato, que reducen los sulfatos H_2S .

La metanogénesis es realizada por las arqueobacterias, que son anaerobias estrictas y existen géneros mesofílicos y termofílicos; se dividen en dos grupos: las hidrogenofílicas no acetilclásticas, que generan CH_4 a partir de la reducción de CO_2 con H_2 y las metanogénicas acetilclásticas que producen CH_4 a partir del grupo metilo del ácido acético generado en la acetogénesis (Figura 7), hasta el 73% del CH_4 producido por los digestores anaerobios proviene de estos géneros bacterianos (Smith y Mah, 1966). En condiciones estables la mezcla de gases en un biodigestor está compuesta por un 25-45 % de CO_2 y 50-75 % de CH_4 , y trazas de otros gases (Tabla 4) (De Graaf y Fendler, 2010).

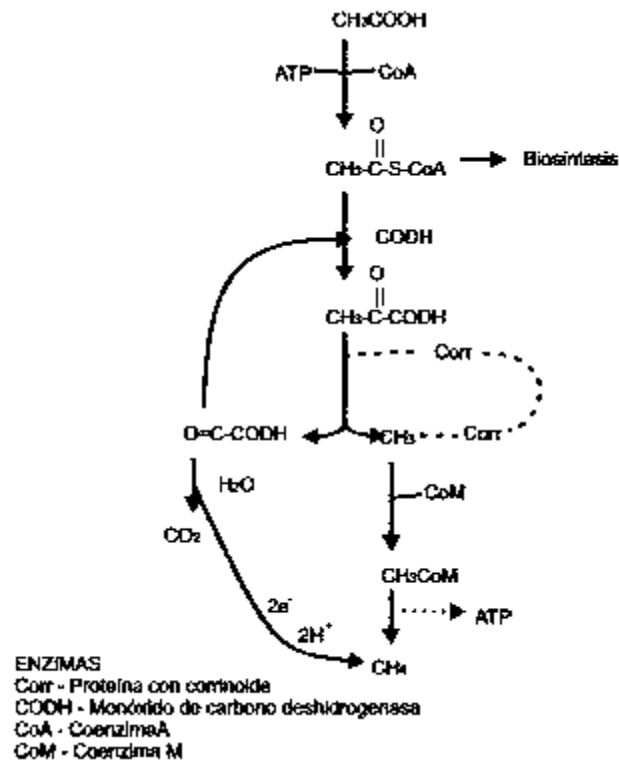


Figura 7. Vía de la metanogénesis a partir del ácido acético (Madigan *et al.*, 2010).

Tabla 4. Composición de gases en el biogás durante la metanoénesis.

Componente	Símbolo	Porcentaje
Metano	CH ₄	50–75
Dióxido de carbono	CO ₂	25–45
Hidrógeno	H ₂	1–2
Amonio	NH ₃	<1
Vapor de agua	H ₂ O	2–7
Oxígeno	O ₂	<2
Sulfuro de hidrógeno	H ₂ S	<1

(De Graaf y Fendler, 2010)

Las variables que deben manejarse para el funcionamiento adecuado del biodigestor son temperatura, pH, tiempo de retención y evitar la presencia de sustancias tóxicas e inhibidores de la metanogénesis, como los derivados de lignina con grupos aldehído o sustituyentes apolares del tipo fenol (Chen *et al.*, 2008; Manyi-Loh *et al.*, 2013). Los ácidos grasos favorecen la metanogénesis como intermediarios de las rutas metabólicas, pero en concentraciones elevadas la inhiben al bajar el pH del medio (El-Mashad *et al.*, 2004).



2. Antecedentes

Existen algunas investigaciones en la literatura, que reportan que no es posible aprovechar la lignina biotecnológicamente como una fuente alternativa de energía (Montgomery y Bochmann, 2014). Esto debido a que se considera que los aromáticos se degradan únicamente por procesos oxidativos con la generación de CO₂, mientras que los procesos fermentativos y anaerobios en la obtención de etanol, hidrógeno o metano se consideran no factibles en el sentido metabólico.

Mientras que se ha descrito que la capacidad de degradar lignina no está restringida a los basidiomicetos, aunque es más numerosa la investigación enfocada a este grupo comparada con los ascomicetos. Sin embargo se ha reportado que estos hongos mitospóricos realizan la degradación de la lignina en un tiempo menor y con necesidades nutrimentales menores en función de la fuente de carbono, nitrógeno y factor de crecimiento (Chang *et al.*, 2012; Zeng *et al.*, 2006).

Existen reportes en la literatura sobre la producción de biogás a partir de residuos agrícolas, mediante pretratamientos térmicos y químicos. Como Kaparaju *et al.* (2009), que sometió paja de trigo a pretratamiento hidrotérmico con una producción de biogás de 380 L kg⁻¹; y Chandra *et al.* (2012) que con pretratamiento con NaOH 3 % y calor generaron 316 L kg⁻¹, con un incremento del 226 % comparado con el residuo sin pretratamiento. Sin embargo en estos reportes no se consideró que la generación de biogás podría provenir de la degradación de la celulosa y hemicelulosas de las pajas agrícolas.

Algunos autores han encontrado que es posible producir biogás a partir de compuestos aromáticos como Clark y Fina (1952), en la degradación de catecol y ácido protocatecuico, así como Barakat *et al.* (2012) en la degradación de vainillina y siringilaldehído con una producción de CH₄ de 453 mL g⁻¹ y 105 mL g⁻¹ respectivamente. Sin embargo la generación de ácidos grasos de cadena corta como intermediarios es un proceso no dilucidado, ya que solo se ha propuesto la ruta del ácido 3-cetoadípico, por lo que se desconoce si se generan otros tipos de compuestos distintos al ácido acético.

Existen reportes en la literatura como el de Nigam (2001) que generó ácido acético a partir de la degradación biológica de paja de trigo con *Pichia stipitis*, pero derivado de



la degradación de las hemicelulosas. Martins *et al.* (2015), reportaron la síntesis de ácido acético y succínico a partir de la degradación de ácido benzoico, un aromático con similitud estructural a los existentes en la lignina, con *Aspergillus nidulans*. En la revisión bibliográfica no se encontraron reportes en los que se haya dirigido la despolimerización biológica de un residuo agrícola parcialmente purificado como la LIREPATO a ácidos grasos, para acelerar su degradación o producir biogás como fuente de energía alternativa.



3. Justificación

Por cada hectárea de cultivo de trigo se producen 7.3 toneladas de paja, pero debido a su recalcitrancia y pobre valor nutricional sólo se aprovecha el 15% y la mayoría se incinera “*in situ*”, con un impacto ambiental negativo por la emisión de 233 kg de CO₂ por hectárea. Sin embargo, es un material aprovechable si se consigue la despolimerización de la LIREPATO, la cual se estima produciría 296 kg de biogás T⁻¹, un equivalente de 1.17 barriles de petróleo (García *et al.*, 2013)

La despolimerización de la LIREPATO por procesos químicos es costosa y contaminante. La alternativa es el uso de organismos que de forma natural la degradan, al respecto se ha investigado principalmente a los basidiomicetes terrestres, pero su requerimiento nutricional es complejo y su crecimiento lento. Algunas investigaciones señalan que los ascomicetos son más fáciles de cultivar y que tienen un tiempo de generación menor (Chang *et al.*, 2012). Sin embargo para aprovechar los productos de despolimerización de LIREPATO los ascomicetos deben realizar su degradación hasta ácidos grasos, lo cual no se reporta en literatura, debido a que la investigación se ha centrado principalmente en la obtención de aromáticos.

La utilización de un proceso híbrido que una la despolimerización de lignina hasta ácidos grasos con la metanogénesis anaerobia, podría hacer aprovechable como fuente alternativa de energía la paja de trigo, un subproducto agrícola barato y abundante.



4. Hipótesis

Es posible aprovechar la lignina residual de la paja de trigo (LIREPATO) en la generación de compuestos de valor industrial como aromáticos o ácidos grasos de cadena corta y dirigir su conversión hasta CH_4 como fuente alternativa de energía.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Establecer un modelo biotecnológico para el aprovechamiento de la LIREPATO en la generación de compuestos de valor y dirigir su biodegradación hasta CH_4 como fuente alternativa de energía.

5.2. Objetivos particulares

- Seleccionar cepas de ascomicetos con elevada capacidad de despolimerización de LIREPATO y la inducción de la actividad enzimática.
- Analizar la producción de aromáticos a partir de la despolimerización de distintas concentraciones de LIREPATO.
- Caracterizar la producción de ácidos grasos de cadena corta derivados de la biodegradación de aromáticos de la LIREPATO.
- Establecer si la producción de ácidos grasos de cadena corta por la despolimerización de LIREPATO por ascomicetos tiene potencial para la generación de CH_4 en un biodigestor anaerobio.



6. Planificación experimental

Fase I: Preparación y caracterización de materiales

1. Extracción de la LIREPATO
2. Caracterización fisicoquímica de la LIREPATO
3. Cultivo de ascomicetos

Fase II: Despolimerización de lignina en aromáticos

Actividades

1. Selección de ascomicetos con el máximo potencial de despolimerización.
2. Establecer la concentración máxima de LIREPATO que puede ser despolimerizada por ascomicetos.
3. Determinar la actividad enzimática Lac, LiP y MnP.

Fase II: Despolimerización de lignina en aromáticos y ácidos grasos

1. Identificación y cuantificación de los aromáticos
2. Análisis de la cinética de despolimerización de la LIREPATO en aromáticos
3. Identificación y cuantificación de los ácidos grasos de cadena corta
4. Análisis de la cinética de oxidación de aromáticos en ácidos grasos de cadena corta.

Fase III: Conversión de productos de despolimerización en biogás

Actividades

1. Montaje y seguimiento de botellas de prueba de actividad metanogénica.
2. Conversión de productos de despolimerización en biogás.
3. Análisis de la conversión de ácidos grasos en biogás.



7. Diagrama de la planificación experimental

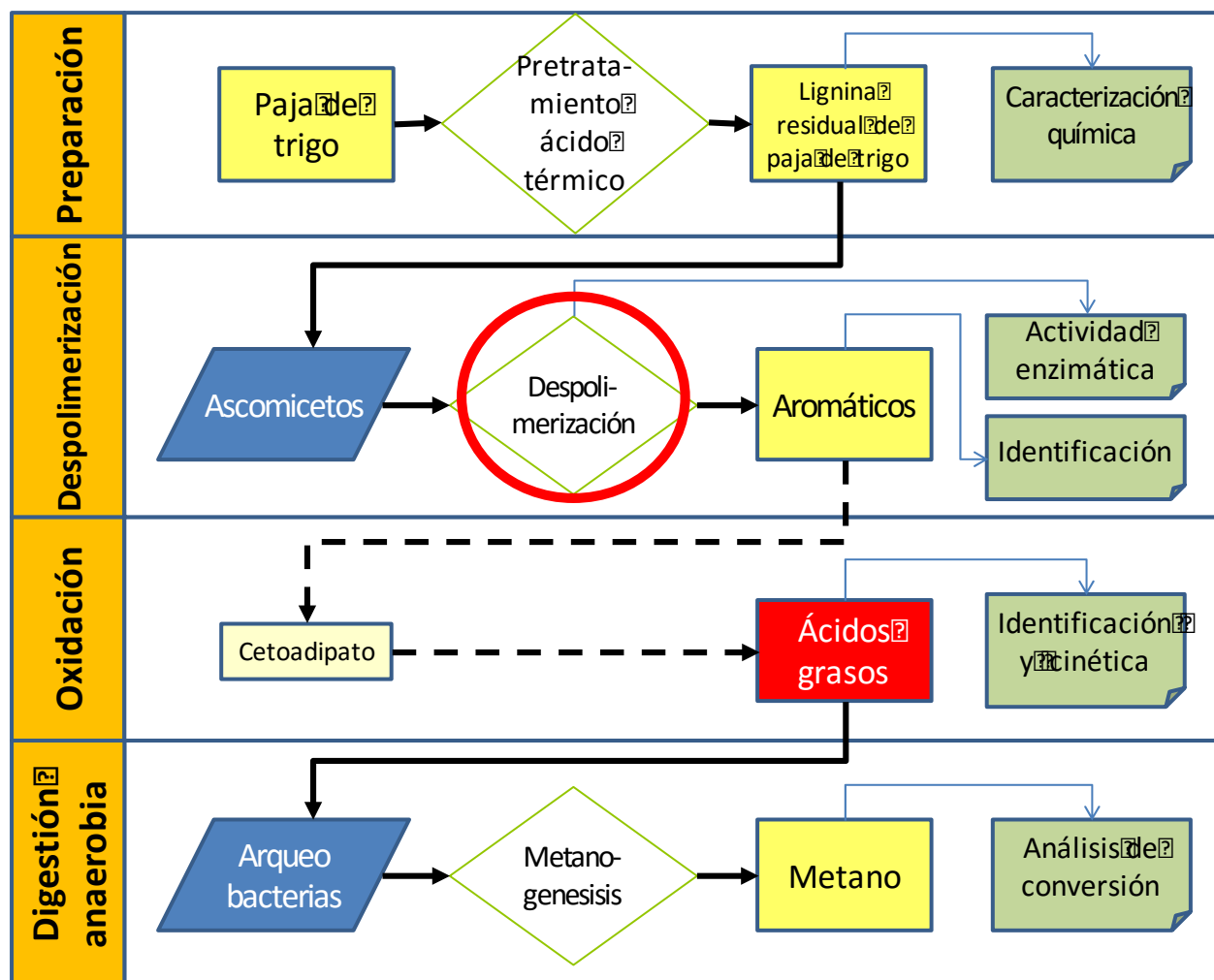


Figura 8. Diagrama de la planificación del diseño experimental.



CAPÍTULO I

INDUCCIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE LA LIGNINA RESIDUAL DE PAJA DE TRIGO POR *Aspergillus spp.* Y *Penicillium chrysogenum*



8. CAPÍTULO I. Inducción de la degradación de la lignina residual de paja de trigo por *Aspergillus* spp y *Penicillium Chrysogenum*

Los hallazgos referentes a este capítulo fueron publicados en dos artículos:

- 2016; Inducción de la degradación de lignina de paja de trigo en aromáticos por *Aspergillus* spp. y *Penicillium chrysogenum*. ISSN: 2072-9294, **Eduardo Baltierra-Trejo**, Eliseo Silva-Espino, Liliana Márquez-Benavides, Juan Manuel Sánchez-Yáñez, Journal of the Selva Andina Research Society, Vol.7(1), Pag.10-19.

En esta investigación se presenta un análisis del proceso de inducción de la actividad enzimática y una comparación con estudios similares realizados en basidiomicetos con los ascomicetos *Aspergillus* spp. y *Penicillium chrysogenum*, los que de acuerdo a los resultados presentaron porcentajes de despolimerización de la lignina residual de paja de trigo similares a la de las basidiomicetos, pero en tiempos más cortos y en medios de cultivo más simples, sin la adición de una fuente de carbono adicional.

- 2015; Inconsistencies and ambiguities in calculating enzyme activity: The case of laccase. ISSN: 0167- 7012, 1872-8359, **Eduardo Baltierra-Trejo**, Liliana Márquez-Benavides, Juan Manuel Sánchez-Yáñez, Journal of Microbiological Methods, Vol.119, Pag.126-131.

En este manuscrito, analizamos críticamente los informes sobre la actividad lacasa en la literatura, encontrando una gama completa de inconsistencias en el cálculo de esta actividad enzimática. La lacasa está implicada en la despolimerización de lignina por ascomicetos y basidiomicetos, varios autores describen las enzimas lacasa altamente activas en diferentes hongos. Sin embargo, la actividad reportada varía ampliamente de decenas a cientos de miles de unidades. Se demostró que esta variabilidad no se debe a las propiedades biológicas de un hongo dado, características de los medios o condiciones experimentales, sino que es posiblemente consecuencia de inconsistencias en el cálculo de la actividad enzimática. Tales discrepancias derivan de ecuaciones imprecisas y unidades mal utilizadas. De acuerdo con nuestros hallazgos, actualmente es muy difícil comparar los informes de degradación enzimática de la lignina por lo que este artículo contribuye a estandarizar la determinación de la actividad de la lacasa.



Inducción de la degradación de lignina de paja de trigo en aromáticos por *Aspergillus* spp. y *Penicillium chrysogenum*

Wheat straw lignin degradation induction to aromatics by *Aspergillus* spp. and *Penicillium chrysogenum*

Baltierra-Trejo Eduardo^{1,2}, Silva-Espino Eliseo¹, Márquez-Benavides Liliana¹, Sánchez-Yáñez Juan Manuel^{2*}

Datos del Artículo

¹Manejo de Residuos Sólidos y Medio Ambiente, Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
Av. San Juanito Itzicuaro S/N. Col. San Juanito Itzicuaro Morelia, Mich., 58302 México. Tel. +52(443)334-04-75 ext. 116.

²Microbiología Ambiental, Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas (IIQB) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Edif. B-3 Ciudad Universitaria, Av. Francisco J. Mujica S/N Col. Felicitas del Río, Morelia Mich., 58040 México. Tel. +52 (443) 3223500 ext. 4240.

*Dirección de contacto:

Laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas (IIQB) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Edif. B-3 Ciudad Universitaria, Av. Francisco J. Mujica S/N Col. Felicitas del Río, Morelia Mich., 58040 México. Tel. +52 (443) 3223500 ext. 4240.

Juan Manuel Sánchez-Yáñez
E-mail address :syanez@umich.mx

Palabras clave:

Residuo – agrícola,
lacasa,
aromático.

J. Selva Andina Res. Soc.
2016; 7(1):10-19.

Historial del artículo.

Recibido junio, 2015.
Devuelto enero 2016
Aceptado enero, 2016.
Disponible en línea, febrero, 2016.

Editado por:
Selva Andina
Research Society

Resumen

La paja de trigo es un desecho agrícola recalcitrante, su eliminación por incineración contamina el ambiente. Se ha investigado el aprovechamiento de sus componentes estructurales: celulosa, hemicelulosa a excepción de la lignina por ser la porción recalcitrante. La lignina residual de paja de trigo (LIREPATO) tiene valor potencial biotecnológico si es degradada en aromáticos. Como alternativa, los hongos mitospóricos ligninolíticos poco se han investigado, a pesar de que degradan la LIREPATO en medio de cultivo mineral en un tiempo relativamente corto comparado con lo reportado con los basidiomicetos. El objetivo de esta investigación fue analizar en *Aspergillus* spp y *Penicillium* spp en la degradación de LIREPATO como única fuente de carbono en la generación de aromáticos. La degradación de la LIREPATO en aromáticos se realizó lacasa, lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa. Los aromáticos generados se identificaron por cromatografía de gases. Los resultados señalan que *Penicillium chrysogenum* degradó la LIREPATO con hasta un 34.8% en 28 días de incubación. La actividad lacasa fue la mayor con 111 U L⁻¹ en 7 días, menor tiempo a lo reportado en basidiomicetos y sin la adición una fuente de carbono adicional para inducirlo. *Aspergillus* spp y *Penicillium* spp generaron guayacol, vainillina, ácidos hidroxibenzoico, vainillínico, siríngico, y ferúlico con producción máxima por semana de 3.5, 3.3, 3.2, 3.3, 10.1 y 21.9 mg mL⁻¹ respectivamente

© 2016. Journal of the Selva Andina Research Society. Bolivia. Todos los derechos reservados.

Abstract

Wheat straw is a recalcitrant agricultural waste; incineration of this material represents an important environmental impact. Different reports have been made regarding the use of the structural components of wheat straw, i.e. cellulose, hemicellulose and lignin; however, lignin has been less exploited because it is largely considered the recalcitrant part. Residual wheat straw lignin (REWSLI) has a potential biotechnological value if depolymerization is attained to produce aromatics. Ligninolytic mitosporic fungus represent an alternative where very little research has been done, even though they are capable of depolymerize REWSLI in simple nutritional conditions in relatively short periods, when compared to basidiomycetes. The aim of this research was to study the depolymerization activity of *Aspergillus* spp and *Penicillium* spp on semipurified REWSLI as the sole carbon source to produce aromatics. The depolymerization capacity was determined by the activity of the laccase, lignin peroxidase and manganese peroxidase enzymes. The generated aromatics derived from the REWSLI depolymerization were

Key words:

Phenolic,
Laccase,
Enzyme,
waste-agricultural.

identified by gas chromatography. Obtained results revealed that *Penicillium chrysogenum* depolymerized the lignin material by 34.8% during the 28-day experimentation period. Laccase activity showed the largest activity with 111 U L⁻¹ in a seven-day period, this enzyme induction was detected in a smaller period than that required by basidiomycetes to induce it. Moreover, the enzymatic activity was produced without the addition of an extra carbon source as metabolic inductor. *Aspergillus* spp and *Penicillium* spp generated guaiacol, vanillin, and hydroxybenzoic, vanillic, syringic and ferulic acid with a maximum weekly production of 3.5, 3.3, 3.2, 3.3, 10.1 and 21.9 mg mL⁻¹, respectively.

© 2016. Journal of the Selva Andina Research Society. Bolivia. All rights reserved.

Introducción

El *Triticum aestivum* (trigo) es el cultivo más extendido a nivel mundial, sembrado en 115 países con una producción de 675 x 10⁹ kg año⁻¹ (Kim & Dale 2004, FAO 2012). Como resultado se genera como subproducto un estimado de 877 x 10⁹ kg de paja residual (Talebna et al. 2010), cuya disposición final es comúnmente la incineración “*in situ*”, con un impacto ambiental negativo, por la emisión de partículas en suspensión (PM₁₀) y gases CO, CO₂, NO₂, SO₂, O₃ (Li et al. 2008, Quintero-Núñez & Moncada-Aguilar 2008). La paja de trigo está constituida por remanentes estructurales de la pared celular vegetal: celulosa (39%), hemicelulosa (38.7%) lignina (17%) (Xu et al. 2006). La celulosa, hemicelulosa son polímeros de azúcares aprovechados en la producción de bioetanol (Dashtban et al. 2010), biohidrógeno (Quéméneur et al. 2012) y alimento para rumiantes (Tuyen et al. 2012), sin embargo la lignina es un componente recalcitrante y residual para la explotación de la paja de trigo.

La lignina es un polímero heterogéneo constituido por 3 unidades de aromáticos derivados del alcohol *p*-hidroxicinámico: el coniferílico, el sinapílico y el *p*-coumarílico, precursores a su vez del guayacol, el siringol y el hidroxifenol, unidas por enlaces aril-eter (β-O-4), aril-aril y carbono-carbono (C_α-C_β)

principalmente (Dekker et al. 2002, Martínez et al. 2005).

No existen reportes en la literatura para la explotación biotecnológica de la lignina residual de paja de trigo (LIREPATO), sin embargo es aprovechable si se degrada en aromáticos de valor biotecnológico. Una alternativa para la degradación de la LIREPATO son los métodos químicos, con la desventaja de que son costosos y contaminantes. Una opción ambientalmente segura, reportada en la literatura en otros residuos lignocelulósicos, son los basidiomicetos, que si bien son efectivos en la degradación de lignina, su tiempo de generación es relativamente lento (semanas). Una alternativa menos explorada son *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. ejemplo de hongos mitospóricos ligninolíticos (HML) cuya investigación preliminar reportó que tienen una capacidad similar a los basidiomicetos, pero con tiempo de generación menor (días) (Safari-Sinegani et al. 2005, Zeng et al. 2006, Chang et al. 2012).

Aspergillus spp y *Penicillium* spp. inducen tres enzimas para la degradación de la lignina: la lacasa (Lac), la lignina peroxidasa (LiP) y la manganosa peroxidasa (MnP) (Dashtban et al. 2010). Estas participan en la ruptura de las uniones C_α-C_β y β-O-4 con la formación de monómeros aromáticos, seguido por la oxidación de los grupos funcionales y

finalmente de la ruptura de los anillos aromáticos (Ferraz & Durán 1995). Los aromáticos de la LI-REPATO son útiles para usarse como fuente de materia prima para la obtención de combustibles como bioetanol y biogás (Sánchez 2009) o en aromáticos de interés para la industria alimenticia y farmacéutica como la vainillina, guayacol, tirosina, ácido ferúlico, gallico, hidroxibenzoico, siríngico, vainillínico, etc., (Buranov & Mazza, 2008, Widsten & Kandelbauer 2008). Con base a lo anterior el objetivo de esta investigación fue analizar en *Aspergillus* spp y *Penicillium chrysogenum* en la degradación de la LIREPATO como única fuente de carbono en la generación de aromáticos.

Materiales y métodos

Selección y activación de Aspergillus y Penicillium.

De la colección del Laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la UMSNH se analizaron las cepas de *Penicillium chrysogenum* AT3 y AT4, así como *Aspergillus fumigatus* AT11 y *A. tubigensis* AT12. Para semipurificar la LIREPATO e hidrolizar una fracción de la celulosa y las hemicelulosas se sometió la paja de trigo a tratamiento ácido-térmico. Para ello se molió y tamizó en malla de 0.0841 mm, se le adicionó por aspersión ácido acético ($\text{CH}_3\text{-COOH}$) al 10% (v/v)/30 min en proporción 1:2 (p/v), se neutralizó con hidróxido de sodio (NaOH) al 10% (p/v), se sometió a 120 °C por 60 min, se lavó con agua destilada y se secó a 70 °C por 24 h. Los HML se activaron en medio agar-LIREPATO cuya composición fue (g L^{-1}): LIREPATO 10, peptona de caseína 5, extracto de levadura 1.3, K_2HPO_4 0.17, KH_2PO_4 2.61, MgSO_4 1.5, NaCl 0.9, CuSO_4 0.05, se adicionó azul de bromotimol 10 ppm, 2.5 mL de solución detergente al 10% (p/v), agar 18 g L^{-1} y 1

mL L^{-1} de solución de oligoelementos que se preparó con (g L^{-1}): H_3BO_3 2.86, $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.22, $\text{MnCl}_2\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.81, KMnO_4 0.09. Finalmente se ajustó el pH del agar LIREPATO a 5.5 y se esterilizó a 121 °C durante 20 min. Los HML se incubaron a 30 °C por 5 días (Sánchez-Yáñez 2007).

Cinética de la degradación de LIREPATO por Aspergillus spp. y Penicillium spp. Para la cinética, del agar-LIREPATO se tomó el micelio de cada HML después de 5 días de incubación, para separar el micelio se añadió 15 mL de solución salina-detergente estéril (12 mL NaCl 0.85% y 3.0 mL detergente 0.01%), luego se removió con asa y se recuperó la suspensión con pipeta estéril. Posteriormente se inocularon 12.5 mL de micelio de cada HML en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 250 mL de caldo LIREPATO cuya composición (g L^{-1}) fue: LIREPATO 10, peptona de caseína 5, extracto de levadura 1.3, K_2HPO_4 0.17, KH_2PO_4 2.61, MgSO_4 1.5, NaCl 0.9, CuSO_4 0.05, se adicionó azul de bromotimol 10 ppm, 2.5 mL de solución detergente al 10% (p/v), y 1 mL L^{-1} de solución de oligoelementos (g L^{-1}): H_3BO_3 2.86, $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.22, $\text{MnCl}_2\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.81, KMnO_4 0.09, se ajustó el pH a 5.5 y se esterilizó a 121 °C durante 20 min (Sánchez-Yáñez, 2007). Estos matraces se incubaron en aerobiosis en un agitador rotatorio por 28 días a 30 °C y 150 rpm. Se tomaron muestras a los 7, 14, 21, 28 días para medir la actividad Lac, LiP, MnP, se incluyó un control con LIREPATO sin inocular con los HML.

Determinación del porcentaje de degradación de la LIREPATO por *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. El porcentaje de degradación de LIREPATO por *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. se determinó a los 28 días de incubación del caldo LIREPATO, para ello se separó el remanente o fase sólida por filtración con vacío, se lavó con agua destilada y se

secó a 70 °C por 24 h, se calculó el porcentaje de degradación de LIREPATO por pérdida de masa a peso constante.

Determinación de la actividad enzimática de la degradación de la LIREPATO por Aspergillus y Penicillium. El caldo LIREPATO degradado por las cepas de *Aspergillus* y *Penicillium* se centrifugó a 8000 rpm a 4 °C por 15 min para eliminar el micelio. La actividad Lac se midió en espectrofotómetro (Hach DR 2500) mediante la oxidación del ácido 2.2'-acino-bis-(3-etil benzotiazolin-6-sulfónico) (A BTS) a 420 nm, 25 °C, con un coeficiente de extinción molar de $420=36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, se preparó una mezcla de reacción con 2.4 mL de buffer acetato de sodio 25 mM, pH 3.0, 300 µL de ABTS 10 mM y 300 µL de la muestra (Palmieri *et al.* 1997, Ibrahim *et al.* 2011). La LiP se midió en espectrofotómetro (UV-Vis Thermo Scientific Evolution 60S) mediante la oxidación de alcohol veratrílico a veratrilaldehído a 310 nm, 25 °C y coeficiente de extinción molar de $310=9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, se preparó la mezcla de la reacción con 2.5 mL de buffer tartrato de sodio 100 mM, pH 3.0, 1 mL de alcohol veratrílico 10 mM, 400 µL de la muestra centrifugada y 100 µL de H₂O₂ 10 mM. La MnP se midió por la formación de tartrato Mn⁺³ a 240 nm, 25 °C y un coeficiente de extinción molar del $240=6500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, se preparó la mezcla de reacción con 3.4 mL de buffer malonato de sodio 50 mM, pH 4.5, 0.1 mL de MnSO₄ 15 mM, 400 µL de la muestra centrifugada y 100 µL H₂O₂ 10 mM (Gao *et al.* 2011).

Determinación de aromáticos de la degradación de la LIREPATO por Aspergillus spp. y Penicillium spp. A partir de caldo LIREPATO donde crecieron los HML se tomaron 5 mL que se centrifugaron a 8000 rpm/15 min, el sobrenadante se ajustó a pH 2

con HCl concentrado (37% p/p), se agregó NaCl a saturación y 5 mL de acetato de etilo concentrado para la extracción de los aromáticos. Entonces se inyectó 1 µl de muestra en el cromatógrafo de gases (Varian CP-3800), equipado con una columna capilar de fenil-metilpolisiloxano de 30 m x 0.53 mm, el gas acarreador N₂ se mantuvo con un flujo de 35 mL/min; la temperatura del horno, inyector y detector FID fueron de 90, 270 y 300 °C, respectivamente. Se usó como patrón una mezcla estándar de los ácidos hidroxibenzoico, vainillínico, ferúlico y sírínico, así como de vainillina y guayacol en concentración de 1 mg/mL disueltos en acetato de etilo (Wu *et al.* 1987, Valenciana *et al.* 2009).

El diseño experimental fue completamente aleatorio y empleo 5 tratamientos: cuatro hongos más un control sin inocular, con tres replicas por tratamiento. Los datos experimentales se analizaron por Tukey con un nivel de significancia del 5% con el software de estadística JMP 11.0 Statistical Analysis System SAS®.

Resultados

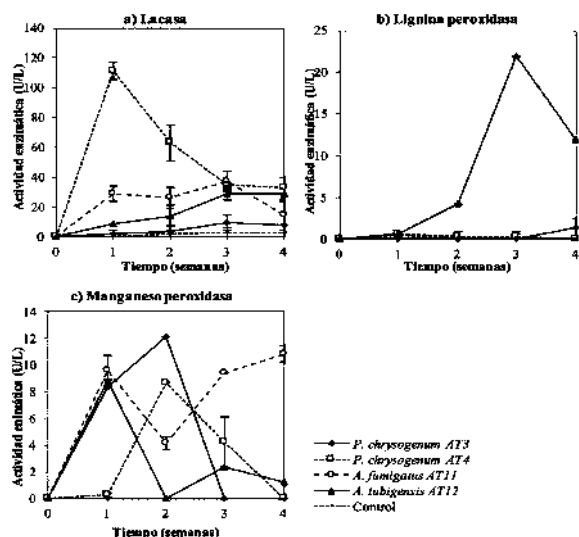
Porcentaje de degradación de la LIREPATO por Aspergillus y Penicillium. La cepa de *P. chrysogenum* AT4 en concentración de 10 g L⁻¹ de LIREPATO mostró el mayor por ciento de degradación con un rendimiento de 34.8% a 28 días de incubación, en tanto *A. fumigatus* AT11 en la misma condición alcanzó un 29.1%, ambos porcentajes de degradación fueron estadísticamente diferentes con una significancia del 5%, comparados con los valores de *P. chrysogenum* AT3 y *A. tubigensis* AT12 (Tabla 1).

Tabla 1. Porcentaje de degradación de lignina residual de paja de trigo por cepas de *Aspergillus* y *Penicillium*

Ascomiceto	Degradación (%)	Análisis estadístico
<i>Penicillium chrysogenum</i> AT4	34.8 ± 2.26	a
<i>Aspergillus fumigatus</i> AT11	29.1 ± 0.74	ab
<i>Penicillium chrysogenum</i> AT3	23.3 ± 0.92	b
<i>Aspergillus tubigensis</i> AT12	16.1 ± 1.36	c
Control	0.0 ± 0.00	d

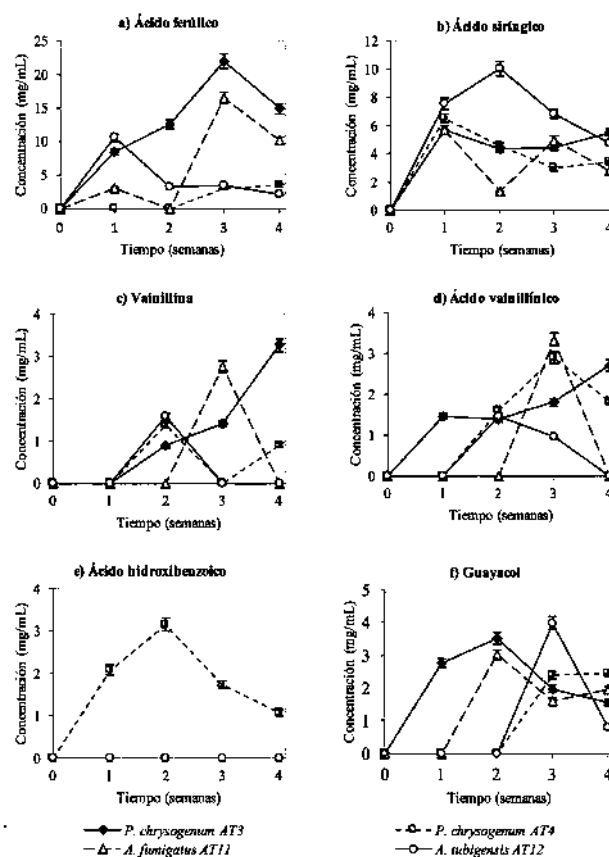
Las letras indican diferencia estadísticamente significativa para la actividad enzimática para cada semana de medición con un nivel de significancia $\alpha=0.05$.

Actividad enzimática de *Aspergillus* y *Penicillium* en la degradación de LIREPATO. La cepa de *P. chrysogenum* AT4 indujo la Lac desde la primera semana con una máxima de actividad de 111 U L⁻¹, valor estadísticamente superior a las cepas de *Aspergillus* con un nivel de significancia del 5 %.

Figura 1 Cinética de la actividad enzimática de *Aspergillus* spp y *Penicillium* spp en la degradación de lignina residual de paja de trigo (LIREPATO). Las líneas verticales corresponden a la desviación estándar de tres mediciones. Nivel significancia $\alpha=0.05$.

En tanto que sólo *A. tubigensis* AT12 generó la LiP entre la semana 2 a la 4 con un valor máximo de 21.9 U L⁻¹ a los 21 días de incubación. Entre tanto las cepas de *Aspergillus* spp. como *Penicillium* spp.

sintetizaron la MnP con un tiempo de inducción de una semana; mientras que *A. fumigatus* AT11 alcanzó una máxima actividad de 10.9 U L⁻¹ con un tiempo de generación de la enzima entre la segunda y tercera semana de incubación (Figura 1).

Figura 2 Cinética de la síntesis de aromáticos por *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. en la degradación de LIREPATO. No se detectaron aromáticos en los matraces control sin inocular. Nivel significancia $\alpha=0.05$.

Síntesis de aromáticos por *Aspergillus* y *Penicillium* a partir de LIREPATO. Las cepas de *Aspergillus* y *Penicillium* degradaron la LIREPATO para la síntesis de aromáticos, de los cuales se identificaron 6 monómeros: *P. chrysogenum* AT3 generó hasta 21.9 mg/mL de ácido ferúlico en la semana 3, fue el aromático que se produjo en mayor concentración. *A. tubigensis* AT12 generó 10.1 mg/mL de ácido

siríngico en la semana 2, *A. fumigatus* AT11 3.3 mg/mL de ácido vainillínico en la semana 3, mientras que *P. chrysogenum* AT3 hasta 3.3 mg/mL de vainillina en la semana 4. *P. chrysogenum* AT4 fue el único que produjo ácido hidroxibenzoico con 3.2 mg/mL de en la semana 2 mientras que *P. chrysogenum* AT3 hasta 3.5 mg/mL de guayacol en la semana 3 (Figura 2).

Discusión

En relación al por ciento de degradación de la LIREPATO por las cepas *Aspergillus* y *Penicillium* se registró un valor similar a lo reportado en basidiomicetos, en una concentración relativamente alta de LIREPATO de 10 g L⁻¹ en un periodo de tiempo relativamente corto de 28 días, lo que les constituye como una alternativa interesante para explotación de residuos agrícolas ricos en lignina. Por ejemplo *P. chrysogenum* AT4 degradó el 34.8% de la LIREPATO, en contraste con lo reportado en *Phlebia brevispora* y *Ceriporiopsis subvermispora* con 20 g L⁻¹ de paja de trigo y 25 mL de extracto de malta 0.05% alcanzaron un 30.5 y 23% degradación respectivamente en 30 días (Arora & Sharma 2009, Arora *et al.* 2011), así como con *Phanerochaete chrysosporium* que con 20 g L⁻¹ de paja de trigo y 25 mL de extracto de malta 0.05% registró un por ciento de degradación del 30% en 21 días (Singh *et al.* 2011), Sin embargo el mismo basidiomiceto con 2 g L⁻¹ de paja de trigo, 0.1 % de polisorbato alcanzó un 25% en 7 días (Zeng *et al.* 2011) mientras que *Trametes versicolor* con 2 g L⁻¹ de paja de trigo más 40 de glucosa, 2.8 mL L⁻¹ de aceite de soya, se registró un 46% en 21 días de cultivo (Salvachúa *et al.* 2011). Aunque las pajas utilizadas en estos experimentos no sometieron a tratamiento previo para eliminar celulosas y hemicelulosas.

Tanto *Aspergillus* como *Penicillium* tuvieron tiempos de generación relativamente corto comparados con los basidiomicetos reportados en la literatura, ya que mostraron una rápida inducción de la actividad enzimática para la degradación de la LIREPATO; en promedio de 7 días, un tiempo menor, a los 14 días reportados en otras investigaciones relacionadas con basidiomicetos (Salvachúa *et al.* 2011, Zeng *et al.* 2011) (Tabla 2).

El menor periodo de tiempo de inducción de la actividad enzimática se detectó a la semana de crecimiento en *P. chrysogenum* AT4 con un valor de la actividad Lac de 111 U L⁻¹ en 7 días, cantidad relativamente alta comparada con *Phanerochaete fascicularia* que con 85 g L⁻¹ de paja de trigo, 10 de glucosa y 5 de extracto de levadura, alcanzó 80 U L⁻¹ en 12 días de incubación (Arora *et al.* 2002), similar a la cepa Euc-1 que con 15 g L⁻¹ de paja de trigo más 0.05 g L⁻¹ de glucosa; registró la máxima actividad Lac de 100 U L⁻¹ en 46 días de incubación (Dias *et al.* 2010), similar a lo reportado en *Phlebia rufa* y *Ganoderma applanatum* que con 15 g L⁻¹ de paja de trigo más 0.05 g L⁻¹ de glucosa mostró 140, 350 U L⁻¹ respectivamente a los 7 días de incubación (Dinis *et al.* 2009). En estas investigaciones el medio de cultivo empleado para la degradación de las pajas se enriqueció con glucosa, factor nutricional considerado necesario para inducir la actividad enzimática en los basidiomicetos, sin embargo esta investigación se demostró que no indispensable enriquecer el medio de cultivo con fuente de carbono adicional a la LIREPATO para su degradación y formación de aromáticos.

Tabla 2 Comparativo de reportes de actividad enzimática en hongos degradadores de lignina

Basidiomiceto (género especie)	Actividad máxima (U/L)/ Tiempo (días)	Fuente de lignina (g/L)	Fuente C adicional (g/l)	Fuente N (g/l)	Factor creci- miento (g/l)	Cobre (Cu) (g/l)	Degradación (%)	Referencia
<i>Phellinus robustus</i>	3.3 U g⁻¹ 7 días	2 paja de trigo	Glucosa (40) Almidón (26.3)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (9)	NE	NE	36% en 21 días	Salvachúa <i>et al.</i> (2011)
cepa Euc-T1	100 U l⁻¹ 46 días	15 paja de trigo	Glucosa (0.05)	NE	NE	NE	80%, 46 días	Dias <i>et al.</i> (2010)
<i>Trametes versicolor</i>	140 U l⁻¹ 30 días	5 paja de trigo	NE	NE	NE	NE	ND	Rodrigues <i>et al.</i> (2007)
<i>Ganoderma applanatum</i>	350 U l⁻¹ 7 días	15 paja de trigo	Glucosa (0.05)	NE	NE	NE	ND	Dinis <i>et al.</i> (2009)
<i>Phlebia fascicularia</i>	8500 U l⁻¹ 12 días	8 paja de trigo	Glucosa (10)	Peptona (5)	Extracto de levadura (5)	NE	ND	Arora <i>et al.</i> (2002)
<i>Penicillium. chrysogenum</i>	111 U l⁻¹ 7 días	10 lignina semipuri- ficada de paja de trigo	0	Peptona (5)	Extracto de levadura (5)	CuSO ₄ 0.05	34.8% en 28 días	Esta investigación

ND: No determinado, NE: No especificado.

La cepa de *A. tubigensis* AT12 indujo la LiP; enzima ausente en la mayoría de los géneros de HML (Dashtban *et al.* 2010), por lo que su detección en esta cepa, es de interés en la investigación para optimización de la degradación de la LIREPATO. En las cepas de *Aspergillus* y *Penicillium* la actividad MnP no fue importante comparada con la reportada para basidiomicetos (Fujian *et al.* 2001, Dinis *et al.* 2009), lo anterior sugiere que al menos en las cepas de la presente investigación; la MnP podría no ser necesaria para la degradación de la LIREPATO en aromáticos. En contraste, la elevada actividad Lac de las cepas de *Aspergillus* y *Penicillium* comparada con lo reportada para los basidiomicetos, sugiere que esta enzima podría ser fundamental para la degradación de la LIREPATO en aromáticos (Dashtban *et al.* 2010), y que la LiP y la MnP tienen un papel secundario en este proceso, lo que es necesario dilucidar con precisión.

Las cepas de *Aspergillus* y *Penicillium* con actividad Lac alta, mostraron la mayor generación de aromáticos, puesto que se detectó que *A. tubigensis*

AT12 generó la mayor concentración de ácido si-ríngico. En contraste se sugiere que la actividad LiP y MnP podría estar relacionada con la síntesis de una amplia variedad de estos compuestos.

De acuerdo con los resultados señalados, fue evidente que las cepas de *Aspergillus* y *Penicillium* para la degradación de la LIREPATO en aromáticos tuvieron necesidades nutricionales mínimas, comparadas con lo reportado en los basidiomicetos. Por principio las cepas de la presente investigación degradaron una concentración relativamente alta de LIREPATO de 10 g L⁻¹; una ventaja para su explotación como materia prima de bajo costo, para la producción de aromáticos en un medio de cultivo simple sin enriquecer con glucosa como fuente de carbono adicional, en contraste con los basidiomicetos que según la literatura si la requieren. Mientras que el periodo de inducción de la lacasa de estas cepas fue menor al reportado para los basidiomicetos para la degradación de la lignina.

Aunque existen diversas investigaciones sobre el uso de los componentes carbonados de los residuos

agrícolas, la lignina por su recalcitrancia es un compuesto remanente de su degradación, en consecuencia en la literatura existen escasas propuestas para su explotación en biotecnología. Por tanto los resultados obtenidos en esta investigación apoyan la aplicación de cepas de *Aspergillus* y *Penicillium* para la degradación de la LIREPATO en aromáticos de valor biotecnológico, como una alternativa competitiva al empleo convencional de los basidiomicetos.

Conflictos de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de interés.

Agradecimientos

Al Proyecto 150001 SENER-CONACYT, al CONACYT por la BECA 239180 para el primer autor, a los proyectos 2.7 y 5.15 (2016) de la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH, Morelia, Mich, México.

Literatura citada

- Arora DS, Sharma RK. Comparative ligninolytic potential of *Phlebia* species and their role in improvement of in vitro digestibility of wheat straw. *J Anim Feed Sci.* 2009; 18(2009): 151-161.
- Arora DS, Sharma RK, Chandra P. Biodelignification of wheat straw and its effect on in vitro digestibility and antioxidant properties. *Int Biodeter Biodegr.* 2011; 65(2): 352-358.
- Arora DS, Chander M, Gill PK. Involvement of lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase in degradation and selective ligninolysis of wheat straw. *Int Biodeter Biodegr.* 2002; 50(2): 115-120.
- Buranov AU, Mazza G. Lignin in straw of herbaceous crops. *Ind Crop Prod.* 2008; 28(3): 237-259.
- Chang A, Fan J, Wen X. Screening of fungi capable of highly selective degradation of lignin in rice straw. *Int Biodeter Biodegr.* 2012; 72: 26-30.
- Dashtban M, Schraft H, Syed TA, Qin W. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *Int J Biochem Mol Biol.* 2010; 1(1): 36-50.
- Dekker RFH, Barbosa AM, Sargent K. The effect of lignin-related compounds on the growth and production of laccases by the ascomycete, *Botryosphaeria* sp. *Enzyme Microb Technol.* 2002; 30(3): 374-380.
- Dias AA, Freitas GS, Marques GSM, Sampaio A, Fraga IS, Rodrigues MAM, et al. Enzymatic saccharification of biologically pre-treated wheat straw with white-rot fungi. *Bioresour Technol.* 2010; 101(15): 6045-6050.
- Dinis MJ, Bezerra RMF, Nunes F, Dias AA, Guedes CV, Ferreira LMM, et al. Modification of wheat straw lignin by solid state fermentation with white-rot fungi. *Bioresour Technol.* 2009; 100(20): 4829-4835.
- FAO. FAOSTAT [Database Internet]. Food and Agriculture Organization of the United Nations [2012]. Disponible en: <http://faostat.fao.org>.
- Ferraz A, Durán N. Lignin degradation during softwood decaying by the ascomycete *Chrysosporium sitophilum*. *Biodegradation.* 1995; 6(4): 265-274.
- Fujian X, Hongzhang C, Zuohu L. Solid-state production of lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) by *Phanerochaete chrysosporium* using steam-exploded straw as

- substrate. *Bioresour Technol.* 2001; 80(2): 149-151.
- Gao H, Wang Y, Zhang W, Wang W, Mu Z. Isolation, identification and application in lignin degradation of an ascomycete GHJ4. *Afr J Biotechnol.* 2011; 10(20): 4166-4174.
- Ibrahim V, Mendoza L, Mamo G, Hatti-Kaul R. Blue laccase from *Galerina* sp.: properties and potential for Kraft lignin demethylation. *Process Biochem.* 2011; 46(1): 379-384.
- Kim S, Dale B. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass Bioenerg.* 2003; 26(4): 361-375.
- Li LJ, Wang Y, Zhang Q, Li JX, Yang XG, Jin J. Wheat straw burning and its associated impacts on Beijing air quality. *Sci China Ser D.* 2008; 51(3): 403-414.
- Martínez ÁT, Speranza M, Ruíz-Dueñas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillén F, et al. Biodegradation of lignocellulosics: microbiological, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int Microbiol.* 2005; 8: 195-204.
- Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Scaloni A, Capasso A, Sannia G. A Novel White Laccase from *Pleurotus ostreatus*. *J Biol Chem.* 1997; 272(50): 31301-31307.
- Quéméneur M, Bittel M, Trably E, Dumas C, Fourage L, Ravot G, et al. Effect of enzyme addition on fermentative hydrogen production from wheat straw. *Int J Hydrogen Energ.* 2012; 37(14): 10639-10647.
- Quintero-Núñez M, Moncada-Aguilar A. Contaminación y control de las quemas agrícolas en Imperial, California, y Mexicali, Baja California. *Reg Soc.* 2008; 20(43): 3-24.
- Rodrigues MAM, Pinto P, Bezerra RMF, Dias AA, Guedes CVM, Cardoso VMG, et al. Effect of enzyme extracts isolated from white-rot fungi on chemical composition and *in vitro* digestibility of wheat straw. *Anim Feed Sci Technol.* 2007; 141(3-4): 326-338.
- Safari-Sinegani A, Emtiazi G, Hajrasuliha S, Shariatmadari H. Biodegradation of some agricultural residues by fungi in agitated submerged cultures. *Afr J Biotechnol.* 2005; 4(10): 1058-1061.
- Salvachúa D, Prieto A, López-Abelairas M, Lu-Chau T, Martínez Á, Martínez M. Fungal pretreatment: An alternative in second-generation ethanol from wheat straw. *Bioresour Technol.* 2011; 102(16): 7500-7506.
- Sánchez-Yáñez JM. Breve Tratado de Microbiología Agrícola Teoría y Práctica. Morelia, Michoacán México: Corporativo de Desarrollo Sustentable, Centro de Investigación y Desarrollo de Michoacán, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Secretaria de Desarrollo Rural en Michoacán; 2007. p. 130-133.
- Sánchez C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol Adv.* 2009; 27(2): 185-194.
- Singh D, Zeng J, Laskar DD, Deobald L, Hiscox WC, Chen S. Investigation of wheat straw biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biomass Bioenerg.* 2011; 35(3): 1030-1040.
- Talebniya F, Karakashev D, Angelidaki I. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresour Technol.* 2010; 101(13): 4744-4753.
- Tuyen VD, Cone JW, Baars JJB, Sonnenberg ASM, Hendriks WH. Fungal strain and incubation period affect chemical composition and nutrient availability of wheat straw for rumen fermentation. *Bioresour Technol.* 2012; 111: 336-342.
- Valenciaga D, Herrera RS, Simoes EOd, Chongo B, Torres V. Composición monomérica de la lignina de *Pennisetum purpureum* vc. Cuba CT-115

-
- y su variación con la edad de rebrote. *Rev Cubana Cienc Agr.* 2009; 43(3): 315-319.
- Widsten P, Kandelbauer A. Laccase applications in the forest products industry: A review. *Enzyme Microb Tech.* 2008; 42(4):293-307.
- Wu FJ, Moreno J, Vela GR. Growth of *Azotobacter vinelandii* on soil nutrients. *Appl Environ Microbiol.* 1987; 53(3): 489-494.
- Xu F, Sun J-X, Sun RC, Fowler P, Baird MS. Comparative study of organosolv lignins from wheat straw. *Ind Crop Prod.* 2006; 23(2): 180-193.
- Zeng G, Yu H, Huang H, Huang D, Chen Y, Huang G, et al. Laccase activities of a soil fungus *Penicillium simplicissimum* in relation to lignin degradation. *World J Microbiol Biotechnol.* 2006; 22(4): 317-324.
- Zeng J, Singh D, Chen S. Biological pretreatment of wheat straw by *Phanerochaete chrysosporium* supplemented with inorganic salts. *Bioresour Technol.* 2011; 102(3): 3206-3214.
-



Inconsistencies and ambiguities in calculating enzyme activity: The case of laccase



Eduardo Baltierra-Trejo^{a,b}, Liliana Márquez-Benavides^{a,c}, Juan Manuel Sánchez-Yáñez^{b,*}

^a Solid Waste Research Group IIAF-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 58302 Morelia-México

^b Environmental Microbiology Research Group IIQB-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 58040 Morelia-México

^c Mexican Society of Science and Technology Applied to Solid Waste, Av. Cuauhtémoc 403, Col. Roma Norte, Delegación Cuauhtémoc, D.F., 06700 México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 September 2015

Received in revised form 8 October 2015

Accepted 8 October 2015

Available online 13 October 2015

Keywords:

Enzyme activity

Ascomycete

Basidiomycete

Ligninolytic

Laccase

ABSTRACT

Laccase is a key enzyme in the degradation of lignin by fungi. Reports indicate that the activity of this enzyme ranges from 3.5 to 484,000 U L⁻¹. Our aim was to analyze how laccase activity is calculated in the literature, and to determine statistically whether variations in activity are due to biological properties or to inconsistencies in calculation. We found a general lack of consensus on the definition of enzyme activity, and enzymes are sometimes characterized in terms of reaction rate and specific activity. Moreover, enzyme activity is calculated using at least seven different equations. Therefore, it is critical to standardize the calculation of laccase activity in order to compare results directly.

© 2015 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

To describe enzyme activity, a unit (U) was proposed in 1964 by the Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry. This proposal sought to standardize the characterization of enzymes, since the activity of the same enzyme had been traditionally reported in different units depending on the assay used. For example, phosphatase activity was reported in King-Armstrong, Bodansky, or Kind-King units, among others. In addition, the Commission also recommended that assay conditions be specified, including reaction time, temperature, pH, substrate concentration, cofactor, and ion concentration, and that enzyme activity be reported in U L⁻¹ or μU mL⁻¹ (Kamath, 1972; Lynch et al., 1987). However, U was not adopted by the International System of Units. In 1978, the Enzyme Commission proposed to replace U with katal (kat), a motion approved in 1999 (NC-IUB, 1979).

Laccase and other peroxidases underlie the ability of Basidiomycetes and Ascomycetes to degrade lignin and aromatic xenobiotics. These enzymes are also used to synthesize metabolites such as guaiacol and vanillin at industrial scales (Dekker et al., 2002; Halaburgi et al., 2011;

Younes and Sayadi, 2011). A survey of specialist literature indicates that laccase activities in various fungi vary extremely, and range from 3.5 to 484,000 U L⁻¹. However, it is likely that this wide range is not due to the properties of the enzymes, but to inconsistencies in defining and calculating enzyme activity. In this paper, we critically analyze how laccase activity is reported, and seek to identify the source of the variability.

2. Materials and methods

The specialist literature was surveyed using the scientific databases Science Direct, PubMed, and Redalyc, as was information freely accessible on the internet. From these surveys, we compiled the units in which laccase activities are reported, and critically evaluated the equations used to calculate such activities.

We then sought to identify the source of the variability in laccase activity. First, we established the probable maximum measurable value of laccase activity. Then, studies in which the reported enzyme activity was above this maximum value were excluded from further analysis, as were studies in which did not comply with the international protocols established to define and calculate enzyme activity. The selected variables for comparison were type of fungi, aromatic source, carbon source, nitrogen source, use of growth factor and enzyme activator (CuSO₄). Finally, the variables in the selected studies were analyzed by the χ^2 test in the JMP® statistical program, with significance set at 0.05.

* Corresponding author at: Institute of Chemistry-Biological Research of the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Edif. B-3 Ciudad Universitaria, Av. Francisco J. Mujica S/N, Morelia Mich., 58040 México.

E-mail address: syanez@umich.mx (J.M. Sánchez-Yáñez).

Table 1
Units used to report enzyme activity.

	International Union of Biochemistry		International System of Units (SI)	
	Units	Abbreviation	Units	Abbreviation
Name	Before 1978: international unit of enzyme activity After 1978: unit of enzyme activity		Enzyme activity unit of the International System of Units	
Reaction rate	$\mu\text{mol min}^{-1}$	U	mol s^{-1}	katal
Enzyme activity	$\mu\text{mol min}^{-1} \text{L}^{-1}$	U L^{-1}	$\text{mol s}^{-1} \text{L}^{-1}$	katal L^{-1}
Specific enzyme activity	$\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$	U mg^{-1}	$\text{mol s}^{-1} \text{kg}^{-1}$	katal kg^{-1}
Equivalence	1 U = 16.66 nkat		1 kat = 60×10^6 U	

3. Theory and calculations

3.1. Units of enzyme activity

Enzyme activity is a measure of the ability of an enzyme to convert a substrate into product (Devlin et al., 2008). The term is synonymous with *catalytic activity* or *enzymatic activity* (NC-IUB, 1979). According to the International Union of Biochemistry, *enzyme activity* (Enzyme Unit or U) is the amount of enzyme required to convert 1 μmol substrate per minute at 30°C (NC-IUB, 1979). U is not to be confused with the International Unit (IU), which is a measure of the effect of a particular substance on a standard solution with which that substance reacts, and is typically reported for biological according to standards set by the International Conference for the Unification of Formulae. For example, 1 IU insulin is equivalent to 1/22 mg pure insulin. Even more, some authors as Kamath (1972) consider U and IU to be interchangeable. In the International System of Units, enzyme activity is defined in terms of katal, the amount of enzyme that converts 1 mol substrate per second (Lehninger, 2002). However, the magnitude of this unit is too large in practice (1 U = 0.00000016666 kat), which accounts for the continued popularity of U and, sometimes, of nanokatal (nkat, 1 U = 16.66 nkat).

In the literature, some authors refer to U as the *reaction rate*, and use the term *enzyme activity* for the amount of enzyme that converts 1 μmol substrate per minute per unit volume, expressed as U L^{-1} or U mL^{-1} (Lehninger, 2002; Rendina and Fabre, 1974). *Specific enzyme activity* is also frequently reported, which is the mol of substrate converted per unit mass of enzyme per unit time, and is widely used to characterize purified enzymes. *Specific enzyme activity* is *enzyme activity* divided by the mass of enzyme used (Devlin et al., 2008; Manole et al., 2008), and is expressed in katal kg^{-1} , U mg^{-1} , or $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ (Holme and Peck, 1996; Stewart and Ebel, 2000). The similarity and potential confusion among terms complicate the interpretation and comparison of units. For example, the old term *international unit of enzyme activity* defined by the International Union of Biochemistry might be confused with *enzyme activity unit of the International System of Units*. Table 1 summarizes the units used to report enzyme activity.

3.2. Equations used to calculate enzyme activity

An additional source of inconsistency is the use of different equations to calculate *enzyme activity*. In general, most enzyme assays are quantified by spectrophotometry, and subsequent calculations are based on the Lambert–Beer Law. The law states that absorbance of light is directly proportional to the thickness of the media through which it is being transmitted, as well as to the concentration of a chromophore in the media (Eq. (1)):

$$A = \varepsilon \cdot C \cdot d \quad (1)$$

where

- A Absorbance (dimensionless).
- ε molar extinction coefficient ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$).
- C Enzyme concentration (M).
- d optical trajectory (cm).

The dynamic range in most spectrophotometers is 0 to 2.0, but is optimal between 0.097 and 0.699, and A values above 0.699 require sample dilution. Enzyme concentration C is expressed in molar (M) or mol L^{-1} , but $\mu\text{mol L}^{-1}$ is also commonly used. Usually standards are not available to generate calibration curves, molar extinction coefficients ε are used (Holme and Peck, 1996). ε is a constant that represents the ability of a substance to absorb electromagnetic radiation at a certain wavelength, and is expressed in $\text{M}^{-1} \text{m}^{-1}$ or $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$. The distance d traveled by the light beam is the cuvette thickness, usually 1.0 cm. Solving C in Eq. (1) yields Eq. (2):

$$C = \frac{A}{\varepsilon \cdot d} \quad (2)$$

The substrate is consumed during the reaction according to the proportion between the total assay volume V_t and the volume of the enzyme used V_s . Thus, Lambert-Beer Law must be modified according to Eq. (3) to incorporate substrate consumption, which is captured by

Table 2
Equations used in the literature to calculate enzyme activity.

Equation	Formula	Inconsistency	Reference
7	$\text{U mL}^{-1} = \frac{(\Delta A)}{t(\varepsilon)(d)}$	V_t and V_s are absent	Armbrecht (2011); Manole et al. (2008); Stewart and Ebel (2000); Torres-López (2001)
8	$\text{U L}^{-1} = \frac{(\Delta A)(V_t)(d)(10^3)}{t(\varepsilon)(V_s)}$	d in the numerator; incorrect correction factor 10^3	Granda-Sivisapa and Hernández-Ruiz (2009); Kaplan et al. (1998)
9	$\text{U L}^{-1} = \frac{(\Delta A)(V_t)(Fd)}{t(\varepsilon)(V_s)}$	d is not considered; ε in $\mu\text{mol mL}^{-1}$	Chaparro-Sosa and Rosas-Wanumen (2006); Rodríguez et al. (2006)
10	$\text{U L}^{-1} = \frac{(\Delta A)(V_t)(10^3)}{t(\varepsilon)(d)(V_s)}$	incorrect correction factor 10^3	Muñoz-Cuevas (2010)
11	$\text{U L}^{-1} = \frac{(\Delta A)(V_t)(10^6)}{(\Delta t)(\varepsilon)(d)}$	V_s is absent	BioFreaks-BioChemestry (2010)
12	$\text{U mg}^{-1} = \frac{(\Delta A)(V_t)}{t(\varepsilon)(d)(m_{\text{enzyme}})}$	Specific enzyme activity is used in lieu of enzyme activity	Engvall (1980)
13	$\text{U mg}^{-1} = \frac{(\Delta A)(V_t)(10^6)}{t(\varepsilon)(m_{\text{enzyme}})}$	Specific enzyme activity is used in lieu of enzyme activity	Samcová et al. (2014)

Table 3
Laccase activity calculated using different equations.

Equation	Enzyme activity (U L ⁻¹)	Reference
$U L^{-1} = \frac{(\Delta A)(V_t)(D_f)(10^6)}{(t)(\varepsilon)(d)(V_s)}$	46.296	This paper, Holme and Peck (1996); Lynch et al. (1987)
$U mL^{-1} = \frac{(\Delta A)}{t(\varepsilon)(d)}$	4.629	Armbricht (2011); Stewart and Ebel (2000); Torres-López (2001)
$U L^{-1} = \frac{(\Delta A)(V_t)(d)(10^3)}{(t)(\varepsilon)(V_s)}$	0.046	Granda-Sivisapa and Hernández-Ruiz (2009); Kaplan et al. (1998)
$U L^{-1} = \frac{(\Delta A)(V_t)(10^3)}{(t)(\varepsilon)(d)(V_s)}$	0.046	Muñoz-Cuevas (2010)
$U L^{-1} = \frac{(\Delta A)(V_t)(10^6)}{(d)(\varepsilon)(t)}$	13.888	BioFreaks-BioChemistry (2010)

$\varepsilon = 36,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} = 36,000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $t = 3 \text{ min}$, $d = 1 \text{ cm}$, $V_t = 3 \text{ mL}$, $V_s = 300 \mu\text{L}$, $\Delta A = 0.50$.

Table 4
Maximum theoretical values for laccase activity.

D_f	Laccase activity (U L ⁻¹)
1	752.5
10	7,525
100	75,250
1000	752,500

the change in absorbance ΔA :

$$C = \frac{\Delta A}{\varepsilon * d} * \frac{V_t}{V_s} \quad (3)$$

Further, the enzymatic reaction proceeds until the enzyme consumes the substrate, and time t is incorporated into Eq. (4):

$$C = \frac{\Delta A}{\varepsilon * d} * \frac{V_t}{V_s} * \frac{1}{t} \quad (4)$$

Reporting enzymatic units per unit volume is not strictly defined in units of enzyme activity, so it is simply reported in U L⁻¹, according to Eq. (5) (Holme and Peck, 1996; Lynch et al., 1987):

$$U L^{-1} = \frac{(\Delta A)(V_t)}{(t)(\varepsilon)(d)(V_s)} \quad (5)$$

A dilution factor D_f may be incorporated if the enzyme needs to be diluted to slow down the reaction, or to ensure that the reaction is not rate-limited by the substrate. In addition, some authors include the correction factor 10^6 to convert mol L⁻¹ into $\mu\text{mol L}^{-1}$, as in Eq. (6):

$$U L^{-1} = \frac{(\Delta A)(V_t)(D_f)(10^6)}{(t)(\varepsilon)(d)(V_s)} \quad (6)$$

where

U	Enzyme activity ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{ L}^{-1}$).
ΔA	Final absorbance - initial absorbance.
V_t	Total volume of the reaction (mL).
t	Reaction time (min).
ε	Molar extinction coefficient ($\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ or $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).
d	Optical path (1 cm).
V_s	Sample volume (mL).
D_f	Dilution factor.
10^6	correction factor ($\mu\text{mol L}^{-1}$)

Table 5
Laccase activity in ligninolytic fungi.

Fungi	Activity	Aromatic source	C source	N source	Growth factor	Enzyme activator	Reference
<i>Mauginiella</i> sp.	1600 U L⁻¹ katal = mol/s	ABTS	Dextrose	Peptone	Malt extract Yeast extract	CuSO ₄	Palonen et al. (2003)
<i>Trichoderma atroviride</i>	661 U L⁻¹ U = 1 $\mu\text{mol min}^{-1}$	NS	Glucose	PeptoneAmmonium tartrate	Malt extract	CuSO ₄	Chakroun et al. (2010)
<i>Earliella</i> sp.	157 U L⁻¹ *U = 1 mol min ⁻¹	Wheat bran	Cellulose	Peptone	Malt extract Yeast extract	CuSO ₄	Chaparro et al. (2009)
<i>Aspergillus</i> sp.	3.5 U L⁻¹ U = 1 $\mu\text{mol min}^{-1}$	Lignin	Glucose	(NH ₄) ₂ SO ₄	NS	NS	Yang et al. (2011)
<i>Xylaria hypoxylon</i>	1200 U L⁻¹ U = 1 $\mu\text{mol min}^{-1}$	Wood lignin	Soybean oil	NS	NS	NS	Liers et al. (2006)
<i>Paraconiothyrium</i>	*484,000 U L⁻¹ U = 1 $\mu\text{mol min}^{-1}$	Wood lignin	Starch	NS	Yeast extract	NS	Gao et al. (2011)
<i>P. robustus</i>	*3.3 U g⁻¹ U = 1 $\mu\text{mol min}^{-1}$	Wheat lignin	Glucose Soybean oil	(NH ₄) ₂ SO ₄	NS	NS	Salvachúa et al. (2011)
Euc-T1	100 U L⁻¹ U = NS	Wheat lignin	Glucose	NS	NS	NS	Dias et al. (2010)
<i>Trametes versicolor</i>	140 U L⁻¹ U = NS	Wheat lignin	NS	NS	NS	NS	Rodrigues et al. (2007)
<i>Ganoderma applanatum</i>	350 U L⁻¹ U = NS	Wheat lignin	Glucose	NS	NS	NS	Dinis et al. (2009)
<i>Trametes versicolor</i>	500 U L⁻¹ U = NS	Wheat lignin	NS	NS	NS	NS	Kolb et al. (2011)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	600 U L⁻¹ U = 1 $\mu\text{mol min}^{-1}$	Wheat lignin	Saccharose	Ammonium tartrate	Malt extract Yeast extract	CuSO ₄	Parenti et al. (2013)
<i>Trametes versicolor</i>	1322 U L⁻¹ U = NS	Wheat lignin	Fructose	Ammonium tartrate	NS	CuSO ₄	Zhang et al. (2008)
<i>Aspergillus heteromorphus</i>	4900 U L⁻¹ *U = 1 mmol min ⁻¹	Wheat lignin	Glucose	NS	Yeast extract	NS	Singh et al. (2010)
<i>Phlebia fascicularia</i>	8500 U L⁻¹ U = NS	Wheat lignin	Glucose	Peptone	Yeast extract	NS	Arora et al. (2002)
<i>Paecilomyces inflatus</i>	*20,000 U L⁻¹ U = 1 $\mu\text{mol min}^{-1}$	Wheat lignin	Glucose	Peptone (NH ₄) ₃ PO ₄	Yeast extract	NS	Kluczek-Turpeinen et al. (2007)

A, absorbance; ε , molar extinction coefficient; T, temperature; t, reaction time; V_t , reaction volume; V_s , sample volume; UD, undetermined; NS, not specified. * Inconsistencies.

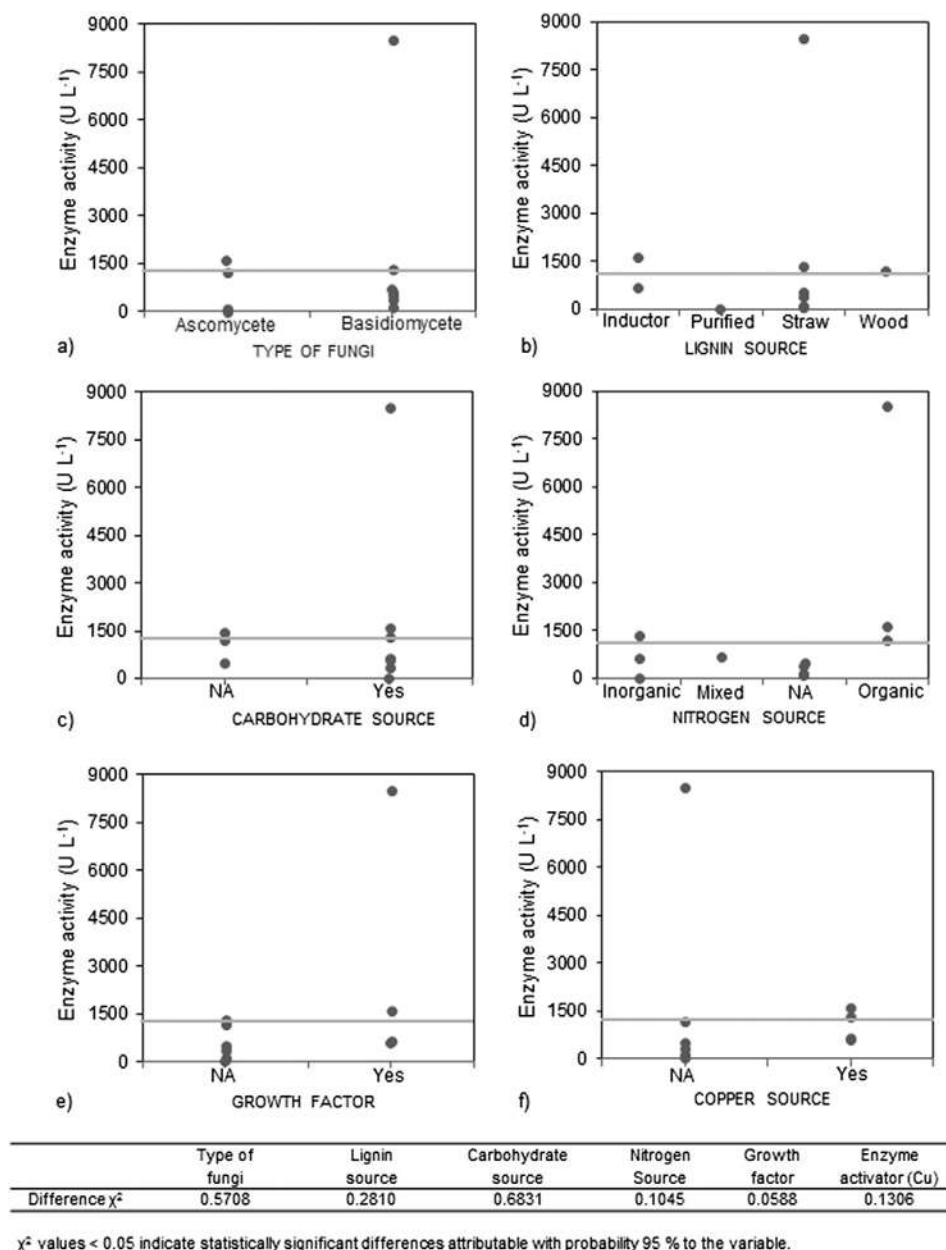


Fig. 1. Laccase activity as a function of a) Type of fungi, b) lignin source, c) additional carbon source, d) nitrogen source, and supplementation with e) growth factor and f) copper, an enzyme activator. NA: Non added.

There are few authoritative references describing the application of Eq. (6), presumably because such a calculation is basic enzymology, not research. The most reliable references consist of enzymology manuscripts (Engvall, 1980; Kaplan et al., 1998; Muñoz-Cuevas, 2010; Stewart and Ebel, 2000), although they tend to be confusing, and are void of practical examples. Hence, it would seem that the most popular references are unreferenced documents freely available online. Unfortunately, these references are usually not peer-reviewed, and contain numerous inconsistencies. As a result, several equations have been used in the literature to calculate enzyme activity (Table 2). We believe that this is a significant source of the variability in reported laccase activity.

4. Results and discussion

4.1. Comparison of equations used to calculate enzyme activity

Unsurprisingly, different equations produce different results. For example, if laccase activity were measured by absorbance at 420 nm

over 3 min at 30°C (Childs and Bardsley, 1975; Ibrahim et al., 2011; Palmieri et al., 1997) in a reaction consisting of 2.4 mL 25 mM sodium acetate pH 3.0, 300 μ L 10 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), and 300 μ L enzyme, a spectrophotometer reading of 0.50 would yield enzyme activities listed in Table 3.

4.2. Maximum laccase activity

The probable maximum laccase activity may be estimated according to Eq. (6). We consider that the highest and lowest absorbance values that can be measured reliably are 0.699 and 0.097, respectively. Hence, ΔA has theoretical maximum value 0.602. Standard spectrophotometer cuvettes are 1.5, 2.5, or 4.5 mL, thus the maximum value of V_t is 4.5, with standard width 1.0 cm and minimum sample volume 0.1 mL. Reaction times range from 1 to 5 min, while ϵ is 36,000 $M^{-1} cm^{-1}$. The dilution factor greatly impacts results, so three serial dilutions are assumed, with corresponding D_f 10, 100, and 1000. Plugging these values estimates the probable maximum values for laccase activity

(Table 4). Accordingly, if samples are usually measurable without dilution or at 1:10 dilution, enzyme activities on orders of magnitude larger than thousands should be rare.

4.3. Analysis of reported laccase activities

In fungi, the ability to depolymerize lignin correlates with high laccase activity (Table 5). However, reported activities vary extremely from 3.5 U L^{-1} (Yang et al., 2011) to $484,000 \text{ U L}^{-1}$ (Kluczek-Turpeinen et al., 2007), each of which was considered by authors to be high. Even though this variability may be due to experimental conditions, we believe, as noted in Section 4.2, that values above 7525 U L^{-1} are unlikely. Unfortunately, these reports do not explicitly state the formula used to calculate enzyme activity.

Furthermore, laccase activity is sometimes reported in U L^{-1} or mL^{-1} . While such values are readily compared by unit conversion, activity is also expressed in some instances as U gr^{-1} , as in Salvachúa et al. (2011). On the other hand, Chaparro et al. (2009) and Singh et al. (2010) reported U in mol min^{-1} , a unit that is difficult to compare with others. Finally, the SI unit katal is rarely used. Palonen et al. (2003) were some of the few who reported enzyme activity in nanokatals. Clearly, the proposed unit of the International System has not been widely adopted by the scientific community since its introduction in 1999.

The 1964 recommendation of the International Union of Biochemistry to specify assay conditions has not been widely adopted as well. Only Arora et al. (2002) and Parenti et al. (2013) provide basic experimental details such as temperature, pH, substrate concentration, and reaction time. A final source of error we found was the conversion of the units of the molar extinction coefficient. For example, $36,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ is equivalent to $36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, but the value $36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ was used in Chaparro et al. (2009).

Studies were then compared statistically to evaluate whether the differences in laccase activity are due to the source fungus and its taxonomic classification, or due to conditions in which the fungus was grown. For this analysis, we included only those studies, in which enzyme activity was reported in U L^{-1} or equivalent units, was calculated using molar extinction coefficients in $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ or $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, and was found to be between 0 and 7525 U L^{-1} , where U is $1 \mu\text{mol min}^{-1}$.

χ^2 test ($\alpha = 0.05$) revealed that the variability in laccase activity cannot be explained by differences in culture conditions such as aromatic source and supplementation with carbohydrate, growth factor, and copper, nor by the use of ascomycetes or basidiomycetes fungi (Fig. 1). The analysis implies that calculations and assay conditions are significant sources of variability in enzyme activity, as is the use of either the SI unit or the International Unit proposed by the International Union of Biochemistry. Consequently, published enzyme activities are not directly comparable, and values should be considered with caution in the absence of detailed calculations.

In light of results, we recommend first and foremost that enzyme activity should be calculated according to one standard formula in all instances. Further, we propose that enzyme activity should be consistently reported in U L^{-1} , and not in katal, which is rarely used. Further, we recommend that scientific reports define U to clarify whether $1 \text{ U} = 1 \mu\text{mol min}^{-1}$, include the value and units of parameters required to calculate enzyme activity, and indicate the equation or the citation used for calculations.

5. Conclusions

Current scientific reports do not disclose the equation used for laccase activity, so it is very difficult to assess inconsistencies in published reports or to know how to compare results. Reproducibility in laccase activity experiments is compromised when the parameters

used to calculate said activity are unknown. Laccase activity variability was not attributable to the biological activity or type of fungus used.

We identified inconsistencies and errors in the calculation of laccase activity in published reports. Therefore, it is necessary to standardize both the units and the formula used to calculate enzyme activity.

One solution within the specialized literature could be the requirement to include laboratory conditions as well as the thoroughness in the enzyme activity calculation, both as requisites for publications. Also, the pertinence of katal should be discussed within the scientific community.

Acknowledgements

This study was generously funded by Project 150001 SENER-CONACyT, Project 2.7 (2015) CIC-UMSNH, and CONACyT (postgraduate grant 239180). We also acknowledge the insightful comments of the reviewers.

References

- Ambrecht, M., 2011. Enzyme Kinetic Measurements with Eppendorf BioSpectrometer® Kinetic Using the Example of a Hexokinase and Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. first ed. Eppendorf AG, Hamburg. pp. 1–8.
- Arora, D.S., Chander, M., Gill, P.K., 2002. Involvement of lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase in degradation and selective ligninolysis of wheat straw. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 50, 115–120. [http://dx.doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00064-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00064-1).
- BioFreaks-BioChemistry, 2010. Measurement of lactase dehydrogenase activity. Access Date: 04/2015, url: <http://bio-ggs.blogspot.mx/2010/01/3rd-year-practicals-measurement-of.html>.
- Chakraborty, H., Mechichi, T., Martinez, M.J., Dhoubi, A., Sayadi, S., 2010. Purification and characterization of a novel laccase from the ascomycete *Trichoderma atroviride*: Application on bioremediation of phenolic compounds. *Process Biochem.* 45, 507–513. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2009.11.009>.
- Chaparro, D.F., Rosas, D.C., Varela, A., 2009. Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática de hongos descomponedores de madera (Quindío, Colombia). *Rev. Iberoam. Microl.* 26, 238–243. <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2009.03.005>.
- Chaparro-Sosa, D., Rosas-Wanumen, D., 2006. Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática de hongos descomponedores de madera en la reserva natural La Montaña del Ocaso, Quimbaya - Quindío (Grade thesis) Microbiología IndustrialFacultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana, Cali. pp. 27–28.
- Childs, R.E., Bardsley, W.G., 1975. The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen. *Biochem. J.* 145, 93–103.
- Dekker, R.F.H., Barbosa, A.M., Sargent, K., 2002. The effect of lignin-related compounds on the growth and production of laccases by the ascomycete *Botryosphaeria* sp. *Enzym. Microb. Technol.* 30, 374–380. <http://dx.doi.org/10.2436/20.1501.01.25>.
- Devlin, T.M., Stryer, L., Berg, J., Tymoczko, J., 2008. Bioquímica: Libro de Texto con Aplicaciones Clínicas. fifth ed. Reverté, Barcelona. p. 421.
- Dias, A.A., Freitas, G.S., Marques, G.S., Sampaio, A., Fraga, I.S., Rodrigues, M.A., Evtuguin, D.V., Bezerra, R.M., 2010. Enzymatic saccharification of biologically pre-treated wheat straw with white-rot fungi. *Bioresour. Technol.* 101, 6045–6050. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.110>.
- Dinis, M.J., Bezerra, R.M., Nunes, F., Dias, A.A., Guedes, C.V., Ferreira, L.M., Cone, J.W., Marques, G.S., Barros, A.R., Rodrigues, M.A., 2009. Modification of wheat straw lignin by solid state fermentation with white-rot fungi. *Bioresour. Technol.* 100, 4829–4835. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.04.036>.
- Engvall, E., 1980. Enzyme immunoassay ELISA and EMIT. *Methods Enzymol.* 70, 419–439.
- Gao, H., Wang, Y., Zhang, W., Wang, W., Mu, Z., 2011. Isolation, identification and application in lignin degradation of an ascomycete GHJ4. *Afr. J. Biotechnol.* 10, 4166–4174. <http://dx.doi.org/10.5897/ajb10.2250>.
- Granda-Sivisapa, F., Hernández-Ruiz, A., 2009. Obtención de azúcares fermentables por degradación fúngica de cáscara de banano (*Cavendish valery*) (PhD thesis), Escuela de Bioquímica y Farmacia 22. Universidad Técnica Particular de Loja, Guayaquil, pp. 35–36 (<http://dspace.utpl.edu.ec/handle/123456789/541>).
- Halaburgi, V.M., Sharma, S., Sinha, M., Singh, T.P., Karegoudar, T.B., 2011. Purification and characterization of a thermostable laccase from the ascomycetes *Cladosporium cladosporioides* and its applications. *Process Biochem.* 46, 1146–1152. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2011.02.002>.
- Holme, D.J., Peck, H., 1996. Resolución de Problemas de Bioquímica Analítica. first ed. Acirbia, Zaragoza. pp. 114–126,160.
- Ibrahim, V., Mendoza, L., Mamo, G., Hatti-Kaul, R., 2011. Blue laccase from *Galerina* sp.: properties and potential for kraft lignin demethylation. *Process Biochem.* 46, 379–384.
- Kamath, S.H., 1972. Clinical biochemistry for medical technologists. fifth ed. Little Brown and Company, London. pp. 105–107 (240–243).
- Kaplan, L.A., Pesce, A.J., Patrone, U., Wasserman, A.V., Natelson, S., 1998. Química clínica. Técnicas de laboratorio, fisiopatología, métodos de análisis, teoría, análisis y correlación. first ed. Médica Panamericana, Buenos Aires. pp. 1118–1120.
- Kluczek-Turpeinen, B., Majjala, P., Hofrichter, M., Hatakka, A., 2007. Degradation and enzymatic activities of three *Paeicliomyces inflatus* strains grown on diverse

- lignocellulosic substrates. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 59, 283–291. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.09.007>.
- Kolb, M., Sieber, V., Amann, M., Faulstich, M., Schieder, D., 2011. Removal of monomer delignification products by laccase from *Trametes versicolor*. *Bioresour. Technol.* 104, 298–304. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.080>.
- Lehninger, A.L., 2002. *Principios en Bioquímica*. second ed. Editorial Omega, Barcelona, p. 215.
- Liers, C., Ullrich, R., Steffen, K.T., Hatakka, A., Hofrichter, M., 2006. Mineralization of ¹⁴C-labelled synthetic lignin and extracellular enzyme activities of the wood-colonizing ascomycetes *Xylaria hypoxylon* and *Xylaria polymorpha*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69, 573–579. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-005-0010-1>.
- Lynch, M., Raphael, S., Mellor, L., Spare, P., Inwood, M., 1987. *Métodos de laboratorio*. third ed. Interamericana, México D.F., pp. 331–332.
- Manole, A., Herea, D., Chiriác, H., Melnig, V., 2008. Laccase activity determination. *Scientific annals of "alexandru ioan cuza Din iași university"*. *Biomater. Biophys. Med. Phys. Ecol.* 1, 1–8.
- Muñoz-Cuevas, Á., 2010. El Mundo de la Biología. Determinación analítica de la actividad enzimática (Access Date: 04/2015, url:<http://mundo-biologia.blogspot.mx/2010/10/3-determinacion-analitica-de-la.html>).
- NC-IUB, 1979. Nomenclature committee of the international union of biochemistry. *Units of enzyme activity, Recommendations*. *Eur. J. Biochem.* 97, 319–320.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Scaloni, A., Capasso, A., Sanna, G., 1997. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *J. Biol. Chem.* 272, 31301–31307. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.272.50.31301>.
- Palonen, H., Saloheimo, M., Viikari, L., Kruus, K., 2003. Purification, characterization and sequence analysis of a laccase from the ascomycete *Mauginiella* sp. *Enzym. Microb. Technol.* 33, 854–862. [http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00247-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00247-3).
- Parenti, A., Muguera, E., Iroz, A.R., Omarini, A., Conde, E., Alfaro, M., Castanera, R., Santoyo, F., Ramírez, L., Pisabarro, A.G., 2013. Induction of laccase activity in the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* using water polluted with wheat straw extracts. *Bioresour. Technol.* 133, 142–149. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.072>.
- Rendina, G., Fabre, R., 1974. *Técnicas de bioquímica aplicada*. first ed. Interamericana, México D.F., pp. 81–82.
- Rodrigues, M.A., Pinto, P., Bezerra, R.M., Dias, A.A., Guedes, C.V., Cardoso, V.M., Cone, J.W., Ferreira, L.M., Colaço, J., Sequeira, C.A., 2007. Effect of enzyme extracts isolated from white-rot fungi on chemical composition and in vitro digestibility of wheat straw. *Anim. Feed Sci. Technol.* 141, 326–338. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeeds.2007.06.015>.
- Rodríguez, Y., Fernández, A., Peteira, B., Fernández, F., Álvarez, E.S., 2006. Inducción de enzimas de defensa en dos variedades de arroz (*Oryza sativa*) por el hongo micorrízico arbuscular *G. mosseae*. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 8, 35–49.
- Salvachúa, D., Prieto, A., López-Abelairas, M., Lu-Chau, T., Martínez, Á.T., Martínez, M.J., 2011. Fungal pretreatment: An alternative in second-generation ethanol from wheat straw. *Bioresour. Technol.* 102, 7500–7506. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.05.027>.
- Samcová, E., Institute of Biochemistry Cell and Molecular Biology, Faculty of Medicine Charles University in Prague, 2014. Spectrophotometry. (Access Date: 04/2015, url: http://old.lf3.cuni.cz/chemie/english/materials_B/photometry.pdf).
- Singh, A., Bajar, S., Bishnoi, N.R., J.o.H.M., Singh, N., 2010. Laccase production by *Aspergillus heteromorphus* using distillery spent wash and lignocellulosic biomass. *J. Hazard. Mater.* 176, 1079–1082. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.120>.
- Stewart, K.K., Ebel, R.E., 2000. *Chemical Measurements in Biological System*. first ed. Wiley-Interscience, New York, pp. 111–115.
- Torres-López, E., 2001. La actividad de catalasa de *Nocardia brasiliensis* HJEG-1 como factor de virulencia en el micetoma experimental (PhD thesis), Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, pp. 146–148 (url:http://cdigital.dgb.uanl.mx/te/1020147522/1020147522_01.pdf).
- Yang, Y.S., Zhou, J.T., Lu, H., Yuan, Y.L., Zhao, L.H., 2011. Isolation and characterization of a fungus *Aspergillus* sp. strain F-3 capable of degrading alkali lignin. *Biodegradation* 22, 1017–1027. <http://dx.doi.org/10.1007/s10532-011-9460-6>.
- Younes, S.B., Sayadi, S., 2011. Purification and characterization of a novel trimeric and thermotolerant laccase produced from the ascomycete *Scytalidium thermophilum* strain. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 73, 35–42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmolcatb.2011.07.014>.
- Zhang, L.H., Li, D., Wang, L.J., Wang, T.P., Zhang, L., Chen, X.D., Mao, Z.H., 2008. Effect of steam explosion on biodegradation of lignin in wheat straw. *Bioresour. Technol.* 99, 8512–8515. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.03.028>.



CAPÍTULO II

GENERACIÓN DE MONÓMEROS AROMÁTICOS POR *Aspergillus* Y *Penicillium spp* A PARTIR DE LIGNINA RESIDUAL DE PAJA DE TRIGO



9. CAPÍTULO II. Generación de monómeros aromáticos por *Aspergillus* Y *Penicillium* spp a partir de lignina residual de paja de trigo

En cuanto a la generación de aromáticos producto de la despolimerización de la lignina residual de paja de trigo, los descubrimientos fueron publicados en el siguiente artículo:

- 2016; Aromatic monomers generation by *Aspergillus* and *Penicillium* spp from residual wheat straw lignin | Generación de monómeros aromáticos por *Aspergillus* y *Penicillium* spp a partir de lignina residual de paja de trigo. ISSN: 2145-2660, **Eduardo Baltierra-Trejo**, Liliana Márquez-Benavides, María Consuelo Hernández-Berriel, Juan Manuel Sánchez-Yáñez, Vitae, Vol. 22(3), Pag.197-204.

En este artículo presentamos un estudio sobre la producción biotecnológica de aromáticos a partir de la degradación de la lignina de un residuo agrícola (paja de trigo). Para ello utilizamos la capacidad de degradación de los hongos mitosporicos ligninolíticos *Aspergillus* y *Penicillium* spp. En el caso la lignina de paja de trigo en la producción de aromáticos se había descrito únicamente por métodos físico-químicos ([HTTP://dx.doi.org/10.1021/jf052725y](http://dx.doi.org/10.1021/jf052725y)) lo que es costoso y contaminante, mientras que esta investigación ofrece información novedosa sobre la capacidad de los hongos mitosporicos en la despolimerización de lignina para la biosíntesis de monómeros aromáticos. El presente manuscrito es una contribución de gran interés ya que la lignina de paja de trigo es un residuo que se produce en grandes cantidades y que en su mayoría es incinerado, sin embargo esta podría ser aprovechada en la obtención de metabolitos de valor biotecnológico.

GENERACIÓN DE MONÓMEROS AROMÁTICOS POR *Aspergillus* Y *Penicillium* spp A PARTIR DE LIGNINA RESIDUAL DE PAJA DE TRIGO

AROMATIC MONOMERS GENERATION BY *Aspergillus* AND *Penicillium* SPP FROM RESIDUAL WHEAT STRAW LIGNIN

Eduardo BALTIERRA-TREJO, MsC.^{1,4}; Liliana MÁRQUEZ-BENAVIDES, PhD^{1,2};
 Ma. del Consuelo HERNÁNDEZ-BERRIEL, PhD^{2,3}; Juan Manuel SÁNCHEZ-YÁÑEZ, PhD^{4*}

Recibido: Junio 11 de 2015 Aceptado: Marzo 9 de 2016

RESUMEN

Antecedentes: La paja de trigo es un residuo agrícola con un 17% de lignina, un polímero recalcitrante con potencial biotecnológico si se despolimeriza en aromáticos de interés para la industria; lo que es posible por métodos químicos, pero que son costosos y contaminantes. Una alternativa es su despolimerización biológica por hongos mitospóricos ligninolíticos como *Aspergillus* y *Penicillium* spp. Sin embargo existen pocos reportes del uso de hongos en la generación de aromáticos por despolimerización de la lignina de residuos agrícolas. **Objetivo:** Determinar la generación de aromáticos utilizando los hongos *Aspergillus* y *Penicillium* por despolimerización de la lignina residual de paja de trigo semipurificada. **Métodos:** Para ello los hongos se cultivaron en lignina residual de paja de trigo por 28 días, que por despolimerización generaron aromáticos que se identificaron en cromatografía de gases. **Resultados:** Los resultados mostraron que ambos hongos generan aromáticos como: guayacol 3,5, vainillina 3,3, ácidos hidroxibenzoico 3,2, vainillinico 3,3, siringico 10,1 y ferúlico 21,9 mg mL⁻¹. **Conclusiones:** *Aspergillus* y *Penicillium* son una opción ecológica en el aprovechamiento de la lignina residual de paja de trigo semipurificada para la generación de aromáticos de interés industrial, en un tiempo relativamente corto a partir de un residuo abundante y barato.

Palabras clave: ascomiceto, despolimerización, hongo, mitospórico, ligninolítico.

ABSTRACT

Background: Wheat straw is an agricultural waste, which contains 17% of lignin, a recalcitrant polymer with biotechnological potential provided it is depolymerized. Lignin depolymerization has attracted interest because it yields aromatics of industrial interest; chemical and physical methods are available but entail economic and environmental constraints. An alternative is to exploit the ligninolytic capacity of mitosporic fungi, such as *Aspergillus* and *Penicillium* spp. There are few reports on the use of these funguses in the generation of aromatics by lignin depolymerization. **Objectives:** To use *Aspergillus* and *Penicillium*

¹ Laboratorio de Residuos Sólidos y Medio Ambiente del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales IIAF, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo UMSNH, 58302 Morelia-México.

² Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología aplicada al Estudio de los Residuos Sólidos SOMERS A.C. Av. Cuauhtemoc 403, Col. Roma Norte, Delegación Cuauhtemoc, 06700 México D.F.-México.

³ Instituto Tecnológico de Toluca 52149, Metepec, Edo. de México-México.

⁴ Laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas IIQB, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo UMSNH, 58040 Morelia-México

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: syanez@umich.mx

spp in the biological generation of aromatics from semipurified residual wheat straw lignin. **Methods:** Funguses were grown in semipurified residual wheat straw lignin for 28 days; produced aromatics were followed using gas chromatography. **Results:** Obtained results indicate a range of aromatics produced, i.e. 3,5 mg mL⁻¹ guaiacol, 3,3 vanillin, 3,2 hydroxybenzoic acid, 3,3 vanillinic, 10,1 syringic and 21,9 ferulic. **Conclusions:** *Aspergillus* and *Penicillium* represent an ecological option in the exploit of semi-purified residual lignin from wheat straw to generate aromatics in a shorter period from an abundant and cheap residue.

Keywords: Ascomycete, depolymerization, fungus, mitosporic, ligninolytic.

INTRODUCCIÓN

El trigo (*Triticum aestivum* L.) es uno de los principales cultivos agrícolas en el mundo, con una producción de 675 x 10⁹ kg año⁻¹ (1), en consecuencia como subproducto se estima se generan 877 x 10⁹ kg de paja (2), eliminada comúnmente por incineración “*in situ*”, con un impacto ambiental negativo por la emisión de gases: CO₂, NO₂, SO₂ y O₃ (3, 4). La paja de trigo se compone de un 35% de celulosa, 26% de hemicelulosas y 17% de lignina (5). Actualmente la celulosa y las hemicelulosas se extraen por tratamiento fisicoquímico para su conversión en bioetanol (6), pero la lignina es un residuo recalcitrante sin alternativas de aprovechamiento biotecnológico (7).

La lignina residual de paja de trigo (LIREPATO) está compuesta por polímeros de fenilpropanoides que podrían ser fuente para la obtención de aromáticos de interés en la industria farmacéutica y alimenticia (8), una vez que se han eliminado la celulosa y las hemicelulosas. Ejemplo de estos aromáticos son la vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído) saborizante de mayor consumo mundial con producción de 10 x 10⁶ kg año⁻¹ (9); el guayacol (o-metoxifenol) usado como expectorante; el ácido ferúlico (3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-propenoico) un antiinflamatorio, antioxidante y bloqueador solar; el ácido hidroxibenzoico (salicílico) precursor de aspirinas, conservador de alimentos, dentífricos y repelentes de insectos (10).

Comercialmente los aromáticos se generan por síntesis química a partir de derivados del petróleo (7), o por el tratamiento ácido o alcalino de lignina de madera proveniente del proceso kraft para la fabricación de pulpa de celulosa (8, 11) pero estos procesos son costosos y contaminantes. Una alternativa ambientalmente segura para su generación es por la despolimerización biológica de la lignina empleando basidiomicetos (12) y los hongos mitosporicos ligninolíticos (HML) (13). Aunque han

sido poco investigados, se ha reportado que ciertos HML tienen análoga o superior capacidad en la degradación de lignina que los basidiomicetos, como Chan (14) que reportó un 28% mayor capacidad de despolimerización de lignina con *Fusarium moniliforme*, comparado con *Phanerochaete chrysosporium*.

Además son pocos los trabajos en los que se aprovecha la capacidad de los HML en la despolimerización de lignina para la generación de monómeros aromáticos y generalmente se enfocan en la transformación de intermediarios como del ácido ferúlico a vainillina; mientras que el aprovechamiento de la LIREPATO en la producción de aromáticos únicamente se ha descrito por métodos físico-químicos. Con base en lo anterior, el objetivo de esta investigación fue utilizar a los HML *Aspergillus* y *Penicillium* spp para la generación de aromáticos por despolimerización de LIREPATO semipurificada.

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación de la LIREPATO

A partir de paja de trigo por tratamiento ácido térmico se eliminó una fracción de la celulosa y las hemicelulosas con lo que se obtuvo LIREPATO semipurificada. Para ello se empleó paja de trigo seca previamente molida y tamizada en una criba de 0,0841 mm, se trató por aspersión con CH₃-COOH (ácido acético) al 10% (v/v) por 30 min en relación 1:2 (p/v), luego se neutralizó con NaOH (hidróxido de sodio) al 10% (p/v) y después se sometió a tratamiento térmico a 120° C por 60 min. Finalmente se lavó con agua destilada y secó a 70° C por 24 h. Se caracterizó el contenido de lignina por el método de extracción con solventes orgánicos con equipo Soxhlet de acuerdo a Sun (15) y precipitación de lignina con ácido sulfúrico (72% v/v) de acuerdo a Runkel (16); el contenido de celulosa y hemicelulosas se realizó por digestión con NaClO₂ (clorito de sodio) de acuerdo con el método de Wise (17).

Activación de *Aspergillus* spp y *Penicillium* spp

De la colección del Laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH Morelia, Michoacán se emplearon las cepas de HML *Penicillium chrysogenum* AT3 y AT4; *Aspergillus fumigatus* AT11 y *A. tubigensis* AT12.

Estos HML se activaron en agar-LIREPATO con la siguiente composición química (g L⁻¹): LIREPATO 10,0; peptona de caseína 5,0; extracto de levadura 1,3; K₂HPO₄ 0,17; KH₂PO₄ 2,61; MgSO₄ 1,5; NaCl 0,9; CuSO₄ 0,05; además se añadió indicador de pH azul de bromotimol 10,0 ppm; 2,5 mL de detergente Roma® al 10% (p/v), agar 18 g L⁻¹ y 1,0 mL L⁻¹ de solución de oligoelementos que se preparó con la siguiente composición química (g L⁻¹): H₃BO₃ 2,86; ZnSO₄·7H₂O 0,22; MnCl₂·7H₂O 1,81; KMnO₄ 0,09. Finalmente se ajustó el pH del agar-LIREPATO a 5,5 y se esterilizó a 121°C por 20min (18).

Ambos HML se sembraron en cajas de Petri con agar LIREPATO e incubaron a 30° C por 5 días. Luego el micelio de cada HML se separó con 15,0 mL de solución salina-detergente estéril cuya composición es: 12,0 mL NaCl 0,85% y 3,0 mL detergente Roma® 0,01%, y enseguida se removió con asa bacteriológica y finalmente el micelio suspendido se colectó con una pipeta estéril.

A continuación, se inocularon 12,5 mL de micelio de cada HML en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 250 mL de caldo LIREPATO con la siguiente composición química (g L⁻¹): LIREPATO 10,0; peptona de caseína 5,0; extracto de levadura 1,3; K₂HPO₄ 0,17; KH₂PO₄ 2,61; MgSO₄ 1,5; NaCl 0,9; CuSO₄ 0,05 azul de bromotimol 10,0 ppm; 2,5 mL de detergente al 10% (p/v), y 1,0 mL L⁻¹ de solución de oligoelementos (g L⁻¹): H₃BO₃ 2,86; ZnSO₄·7H₂O 0,22; MnCl₂·7H₂O 1,81; KMnO₄ 0,09; se ajustó el pH a 5,5 que se esterilizó a 121°C/20 min. Estos matraces se incubaron en aerobiosis en un agitador rotatorio por 28 días a 30°C y 150 rpm. Luego se tomó una muestra de 10,0 mL de cada matraz a los 7, 14, 21, 28 días para identificar y cuantificar los aromáticos derivados de la despolimerización de la LIREPATO.

El diseño experimental fue aleatorio simple y empleó cinco tratamientos: cuatro hongos más un control sin inocular, con tres réplicas por tratamiento.

Despolimerización de la LIREPATO

La despolimerización de la LIREPATO por los *Aspergillus* spp y *Penicillium* spp se determinó a los 28 días de incubación, para ello el caldo LIREPATO se filtró por succión al vacío y el remanente sólido se lavó con agua destilada, se secó a 70°C por 24 h, se enfriaron en desecador por 4 horas y se pesaron a peso constante para calcular el porcentaje de despolimerización por la pérdida de masa de las mismas: % despolimerización = 100 (peso inicial – peso final) / peso inicial. Se analizaron tres replicas por tratamiento.

Cuantificación de los aromáticos

Para extraer los aromáticos del caldo LIREPATO después de su despolimerización con HML, se tomaron 5,0 mL que se centrifugaron a 8000 rpm (5000 g) por 15 min (Universal 320 R Hettich), el sobrenadante se ajustó a un pH de 2,0 con HCl concentrado (37% p/p), se agregó NaCl a saturación y 5,0 mL de acetato de etilo concentrado; entonces se inyectó 1,0 µL de muestra en un cromatógrafo de gases (Varian CP-3800®), equipado con una columna capilar de fennilmetilpolisiloxano de 30 m x 0,53 mm, el gas acarreador N₂ se mantuvo con un flujo de 35,0 mL/min; la temperatura del horno, inyector y detector FID fueron de 90, 270 y 300 °C, respectivamente. Se usó como patrón de los aromáticos una mezcla estándar de los ácidos hidroxibenzoico, vanilínico, ferúlico y siríngico, así como de vainillina y guayacol en concentración de cada uno de 1,0, 0,5, 0,1 y 0,05 mg mL⁻¹ disueltos en acetato de etilo (19, 20), las mediciones se realizaron por triplicado. Los datos experimentales se analizaron con la prueba de Tukey, con un nivel de significancia del 5% con el programa JMP 8.0 (SAS®).

RESULTADOS

Se realizó una cinética de despolimerización de LIREPATO durante 28 días de cultivo con *Aspergillus* y *Penicillium* spp. Como variables respuesta se determinó el porcentaje de despolimerización y se realizó la cuantificación de aromáticos producto de la despolimerización.

Caracterización de la lignina residual de paja de trigo

La paja de trigo se sometió a tratamiento ácido-térmico para semipurificarla, con el que el contenido total de celulosa y hemicelulosas disminuyó de

un 67,4 a un 33,3% (p/p), debido a la degradación de los polímeros. El contenido de la lignina de la paja antes del tratamiento era de 21,3% y después fue de 49,8% (Tabla 2), por lo que se consideró a la LIREPATO como semipurificada.

Despolimerización de la LIREPATO

P. chrysogenum AT4 mostró la mayor despolimerización de LIREPATO de 34,8% en 28 días, seguido de *A. fumigatus* AT11 con un 29,1%; ambos valores estadísticamente superiores a los registrados en *P. chrysogenum* AT3 y *A. tubigensis* AT12 (Figura 1).

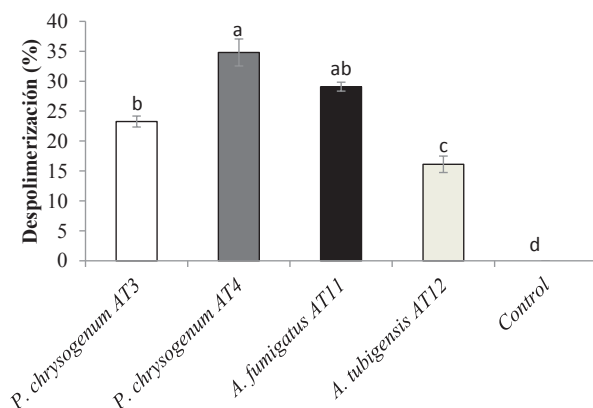


Figura 1. Porcentaje de despolimerización de lignina residual de paja de trigo (LIREPATO) por *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. El control es medio LIREPATO sin inocular. Las líneas corresponden a la desviación estándar de tres mediciones. Las letras indican diferencia estadística con un nivel de significancia $\alpha=0,05$.

Cuantificación de aromáticos

Se identificaron 6 monómeros aromáticos a partir de la despolimerización de la LIREPATO. Las 4 cepas de HML produjeron ácido ferúlico desde la primera semana de crecimiento, el que generó la mayor concentración fue *P. chrysogenum* AT3 con 21,9 mg mL⁻¹ en la semana 3. *A. tubigensis* AT12 produjo hasta 10,1 mg mL⁻¹ de ácido sirínico en la

semana 2. *A. fumigatus* AT11 generó 3,3 mg mL⁻¹ de ácido vainillínico en la semana 3. *P. chrysogenum* AT3 produjo 3,3 mg mL⁻¹ de vainillina hasta la semana 4, este aromático se generó a partir de la segunda semana por las 4 cepas de HML. *P. chrysogenum* AT4 fue el único que generó ácido hidroxibenzoico con 3,2 mg mL⁻¹ en la semana 2. Mientras que *P. chrysogenum* AT3 produjo 3,5 mg mL⁻¹ de guayacol en la semana 3 (Figura 2).

En el análisis de la producción acumulada de aromáticos durante las 4 semanas de crecimiento en la despolimerización de LIREPATO (Figura 3) se observó que *P. chrysogenum* AT3 tuvo la mayor producción de aromáticos, seguido por *P. chrysogenum* AT4 que fue la única cepa que generó los 6 tipos de aromáticos durante la cinética. Los aromáticos que se produjeron en mayor proporción fueron el ácido ferúlico y el sirínico.

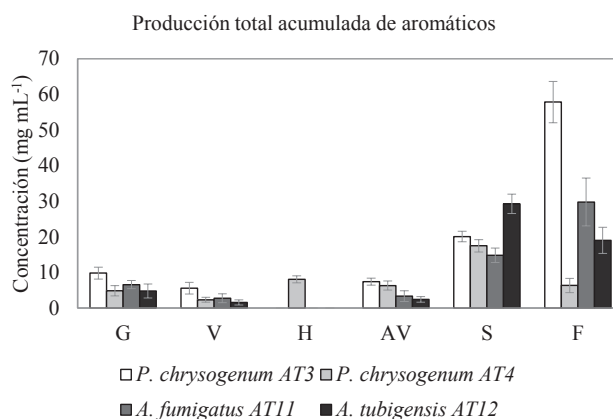


Figura 3. *Aspergillus* spp y *Penicillium* spp en la síntesis de aromáticos derivados de la despolimerización de lignina residual de paja de trigo (LIREPATO). G-Guayacol, V-Vainillina, H-ácido p-hidroxibenzoico, AV-ácido vainillínico, S-ácido sirínico, F-ácido ferúlico. En los controles no se detectaron aromáticos. Las líneas verticales corresponden a la desviación estándar de tres mediciones. Nivel significancia $\alpha=0,05$.

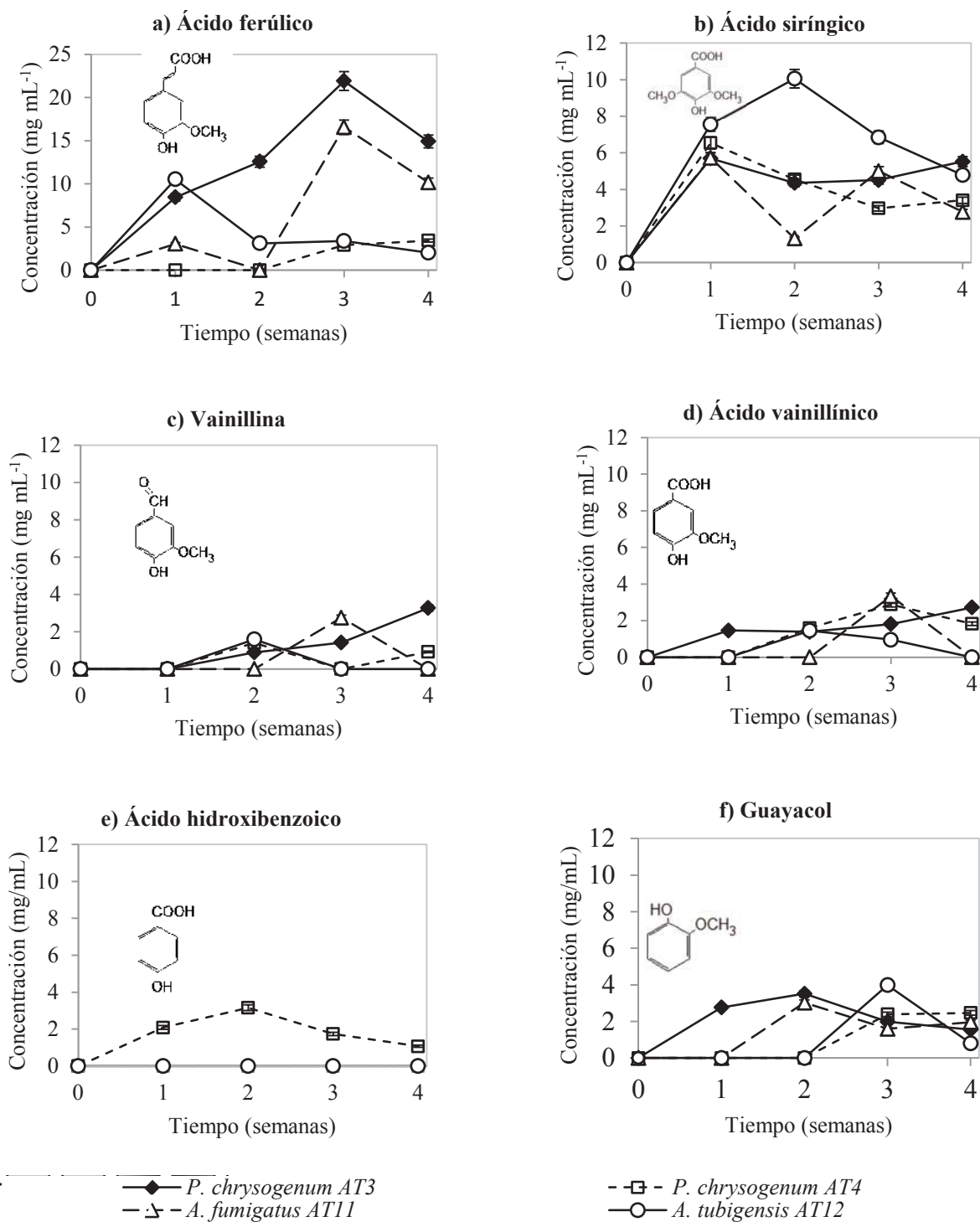


Figura 2. Cinética de la obtención de aromáticos por *Aspergillus* spp y *Penicillium* spp en la despolimerización de LIREPATO. En controles no se detectaron aromáticos. Las líneas verticales corresponden a la desviación estándar de tres mediciones. Significancia $\alpha=0,05$. Notese que en la gráfica “a” la escala es diferente al resto.

DISCUSIÓN

Los resultados mostraron que tanto *Aspergillus* como *Penicillium spp* tiene potencial para la obtención de aromáticos guayacol, vainillina, ácidos hidroxibenzoico, vainillínico, siríngico y ferúlico en un tiempo relativamente corto.

Los HML estudiados generaron ácido ferúlico durante las 4 semanas de ensayo y en mayor cantidad que los otros aromáticos, con base a los reportes en la literatura se considera que durante la despolimerización de la LIREPATO semipurificada se producirá primero ácido ferúlico y luego a partir de su transformación se derivaran otros aromáticos como el ácido vainillínico, la vainillina y el guayacol (21).

Aunque está reportado que *Aspergillus* y *Penicillium spp* son eficaces en la degradación de la lignina (13, 22), no se ha descrito su capacidad en la producción de aromáticos a partir de pajas agrícolas ya que los estudios se han enfocado principalmente en basidiomicetos y en la transformación de aromáticos intermediarios. Por ejemplo con *Trametes versicolor* a partir de ácido ferúlico se generó alcohol veratrílico y veratrilaldehído (23), mientras que con *Pycnoporus cinnabarinus* se liberó vainillina con un rendimiento de 0,064 mg mL⁻¹ en 7 días (9). Por otro lado, con el HML *Paecilomyces variotii* de ácido ferúlico se produjo ácido vainillínico, vainillina, alcohol vainillínico y 4 vinil-guayacol (24).

En general la obtención de aromáticos se ha estudiado principalmente a partir de lignina procedente de procesos kraft, mientras de pajas agrícolas existen solo algunos reportes pero sin un tratamiento previo de purificación para eliminar la celulosa y las hemicelulosas. Lesage-Meessen (25) con *Pycnoporus cinnabarinus* en rastrojo de maíz y 20 g L⁻¹ de maltosa produjeron 0,767 mg mL⁻¹ de vainillina en 8 días de cultivo. Granda (26) con *Lentinus crinitus* en la degradación 5,0 g de residuo de hoja de plátano (*Musa paradisiaca*) generaron ácido ferúlico, vainillina, ácido vainillínico y eugenol en concentración de 0,6, 0,04, 0,6 y 254 mg mL⁻¹. Estos valores en basidiomicetos fueron menores a lo registrado por los géneros y especies de *Aspergillus* y *Penicillium spp* de este trabajo (Tabla 1), pero al no tenerse las mismas condiciones de cultivo, es

necesario contar con investigaciones futuras para afirmar que estos HML tienen mayor capacidad de generación de aromáticos que los basidiomicetos. Mientras que los valores superiores en la generación de aromáticos también pueden explicarse por el uso de LIREPATO semipurificada, lo que aceleró la degradación de la lignina en aromáticos, al disminuir la concentración de carbohidratos.

En el caso de paja de trigo no se encontraron antecedentes sobre la obtención de aromáticos por HML o basidiomicetos, pero si por despolimerización química como se describe en Tapin (27) con una producción de 2 mg g⁻¹ de ácido ferúlico, 1,5 de coumárico, 0,30 de vainillina y 0,25 de ácido vainillínico; estos resultados fueron similares a los obtenidos en esta investigación, pues en función del peso de la LIREPATO se tuvo una producción de guayacol con 0,35, vainillina 0,33, ácidos hidroxibenzoico 0,32, vainillínico 0,33, siríngico 1,01 y ferúlico 2,19 mg g⁻¹ de LIREPATO semipurificada. Estos resultados apoyan que la opción biotecnológica genera aromáticos de manera similar a la lograda con métodos químicos y sin liberar residuos tóxicos al ambiente (28).

Utilizar la capacidad de *Aspergillus* y *Penicillium spp* en la generación de aromáticos daría valor agregado a la LIREPATO semipurificada. Se estima que el valor potencial de los aromáticos es de US\$10-15 kg⁻¹ con un mercado de 260 x 10⁶ kg año⁻¹ (7, 8). De acuerdo con Viñals-Verde (29) la obtención biotecnológica de aromáticos podría ser más rentable que la síntesis química, sin embargo se requiere mayor investigación al respecto, por ejemplo, en optimizar las condiciones de cultivo y demanda nutricional de los HML empleados para incrementar la producción de aromáticos.

Finalmente consideramos que son factores importantes para continuar con esta investigación con miras a su potencial escalamiento industrial: a) la obtención de aromáticos a partir de materia prima abundante, renovable y de bajo costo; b) la creciente demanda de productos orgánicos como alternativa a los de síntesis química; c) la conversión biológica de LIREPATO en aromáticos disminuiría los costos de producción de etanol a partir de celulosa; d) en contraste la síntesis química de aromáticos es compleja, costosa y con liberación de residuos contaminantes (7, 8, 30).

Tabla 1. Comparativo de la producción de compuestos aromáticos en investigaciones reportadas en la literatura.

Hongo	Sustrato	Aromáticos	Tiempo	Fuente
<i>Penicillium chrysogenum</i>	lignina de paja de trigo	ácido vainillínico 1,5 mg mL ⁻¹ guayacal 2,76 mg mL ⁻¹ ácido siríngico 5,7 mg mL ⁻¹ ácido ferúlico 8,4 mg mL ⁻¹	7 días	Esta investigación
<i>Lentinus crinitus</i>	Plátano (<i>Musa paradisiaca</i> L.)	ácido ferúlico 0,6 mg mL ⁻¹ vainillina 0,04 mg mL ⁻¹ ácido vainillínico 0,6 mg mL ⁻¹ eugenol 254 mg mL ⁻¹	16 días	Granda (26)
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	ácido ferúlico extraído de rastrojo de maíz	vainillina 0,767 mg mL ⁻¹	8 días	Lesage-Meessen (25)
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	ácido ferúlico	vainillina 0,064 mg mL ⁻¹	7 días	Lomascolo (9)
Síntesis química	lignina de paja de trigo	ácido ferúlico 2 mg g ⁻¹ ácido coumárico 1,5 mg g ⁻¹ vainillina 0,30 mg g ⁻¹ ácido vainillínico 0,25 mg g ⁻¹	----	Tapin (27)

Los datos de esta investigación se ajustaron a la semana 1 para compararlos con los otros reportes experimentales.

CONCLUSIONES

Para la demanda de aromáticos en el mercado se propone la LIREPATO extraída a partir de un residuo abundante, barato y recalcitrante. Con base a los resultados, se concluye que *Aspergillus* spp y *Penicillium* spp son una opción ambientalmente segura en el aprovechamiento de la LIREPATO semipurificada para la obtención de aromáticos de interés biotecnológico, en un tiempo relativamente corto.

Limitaciones del presente estudio

La detección de compuestos aromáticos por la despolimerización de la LIREPATO con géneros y especies de HML fue relativamente alta; sin embargo es necesario continuar la investigación para explotar su potencial aprovechamiento industrial, ya que aun se desconocen las condiciones y costos de ese escalamiento. La potencial aplicación del método de semipurificación de la LIREPATO es en este punto limitada, ya que se ignora el resultado con una lignina de otra fuente vegetal diferente a esta gramínea. La idoneidad de los resultados tendrá que compararse con los basidiomicetos conocidos y con otros hongos mitosporicos, para medir objetivamente la capacidad de *Aspergillus* y *Penicillium* utilizados en esta investigación.

Trabajos futuros deberán tomar en cuenta las enzimas ligninolíticas sintetizadas con los compuestos aromáticos durante la despolimerización de la LIREPATO, y evitar las reacciones secundarias de despolimerización y/o incluso de polimeriza-

ción de los monómeros generados. Finalmente, las sucesivas investigaciones tendrán que avanzar con el empleo de mejores técnicas de extracción y purificación de los compuestos aromáticos producto de la despolimerización biológica de la LIREPATO.

AGRADECIMIENTOS

Al Proyecto 150001 SENER-CONACYT, al CONACYT por la BECA 239180, al proyecto 2.7 (2016) de la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores manifestamos que no se tiene ningún interés comercial o asociativo que represente un conflicto de intereses con los resultados del artículo.

REFERENCIAS

1. FAOSTAT [Internet]. Food and Agriculture Organization of the United Nations 2012. Available from: <http://faostat.fao.org>.
2. Talebna F, Karakashev D, Angelidaki I. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresour Technol.* 2010;101(13):4744-4753.
3. Li LJ, Wang Y, Zhang Q, Li JX, Yang XG, Jin J. Wheat straw burning and its associated impacts on Beijing air quality. *Sci China Ser D.* 2008;51(3):403-414.
4. Quintero-Núñez M, Moncada-Aguilar A. Contaminación y control de las quemadas agrícolas en Imperial, California, y Mexicali, Baja California. *Reg Soc.* 2008;20(43):3-24.
5. Xu F, Sun J-X, Sun R, Fowler P, Baird MS. Comparative study of organosolv lignins from wheat straw. *Ind Crop Prod.* 2006;23(2):180-193.

6. Dashtban M, Schraft H, Syed TA, Qin W. Fungal biodegradation and enzymatic modification. *Int J Biochem Mol Biol.* 2010;1(1):36-50.
7. Chávez-Sifontes M, Domine ME. Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. *Av Cienc Ing.* 2013;4(4):15-46.
8. Gosselink R. Lignin as a renewable aromatic resource for the chemical industry. Wageningen, Nederland: Wageningen University; 2011.
9. Lomascolo A, Stentelaire C, Asther M, Lesage-Meessen L. Basidiomycetes as new biotechnological tools to generate natural aromatic flavours for the food industry. *Trends Biotechnol.* 1999;17(7):282-289.
10. Howard R, Abotsi E, Rensburg E, Howard S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *Afr J Biotechnol.* 2004;2(12):602-619.
11. Ibrahim M, Balakrishnan R, Shamsudeen S, Adam F, Bhawani S. A concise review of the natural existence, synthesis, properties, and applications of syringaldehyde. *BioResources.* 2012;7(3).
12. Ferraz A, Durán N. Lignin degradation during softwood decay by the ascomycete *Chrysomya sitophila*. *Biodegradation.* 1995;6(4):265-274.
13. Milstein O, Haars A, Sharma A, Vered Y, Shragina L, Trojanowski J, et al. Lignin degrading ability of selected *Aspergillus* Spp. *Appl Biochem Biotechnol.* 1984;9(4):393-394.
14. Chang A, Fan J, Wen X. Screening of fungi capable of highly selective degradation of lignin in rice straw. *Int Biodeter Biodegr.* 2012;72(0):26-30.
15. Sun R, Tomkinson J, Zhu W, Wang SQ. Delignification of maize stems by peroxymonosulfuric acid, peroxyformic acid, peracetic acid, and hydrogen peroxide. 1. physicochemical and structural characterization of the solubilized lignins. *J Agric Food Chem.* 2000;48(4):1253-1262.
16. Runkel ROH, Witt H. Zur Kenntnis des thermoplastischen Verhaltens von Holz. *Holz Roh Werkst.* 1953;11(12):457-461.
17. Wise LE, Murphy M, D'Addieco AA. Chlorite holocellulose, its fractionation and bearing on summative wood analysis and on studies on the hemicelluloses. *Pap Trade J.* 1946;122(2):35-42.
18. Sánchez-Yáñez JM. Breve Tratado de Microbiología Agrícola Teoría y Práctica. Morelia, Michoacán México: Corporativo de Desarrollo Sustentable, Centro de Investigación y Desarrollo de Michoacán, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Secretaría de Desarrollo Rural en Michoacán; 2007. 130-133 pp.
19. Wu FJ, Moreno J, Vela GR. Growth of *Azotobacter vinelandii* on soil nutrients. *Appl Environ Microbiol.* 1987;53(3):489-494.
20. Valenciaga D, Herrera RS, Simoes EOd, Chongo B, Torres V. Composición monomérica de la lignina de *Pennisetum purpureum* cv. Cuba CT-115 y su variación con la edad de rebrote. *Rev Cubana Cienc Agr.* 2009;43(3):315-319.
21. Buranov AU, Mazza G. Lignin in straw of herbaceous crops. *Ind Crop Prod.* 2008;28(3):237-259.
22. Zeng G, Yu H, Huang H, Huang D, Chen Y, Huang G, et al. Laccase activities of a soil fungus *Penicillium simplicissimum* in relation to lignin degradation. *World J Microb Biot.* 2006;22(4):317-324.
23. Nishida A, Fukuzumi T. Formation of coniferyl alcohol from ferulic acid by the white rot fungus *Trametes*. *Phytochem.* 1978;17(3):417-419.
24. Rahouti M, Seigle-Murandi F, Steiman R, Eriksson K-E. Metabolism of ferulic acid by *Paecilomyces variotii* and *Pestalotia palmarum*. *Appl Environ Microbiol.* 1989;55(9):2391-2398.
25. Lesage-Meessen L, Lomascolo A, Bonnin E, Thibault J-F, Buleon A, Roller M, et al. A biotechnological process involving filamentous fungi to produce natural crystalline vanillin from maize bran. *Appl Biochem Biotechnol.* 2002;102-103(1-6):141-153.
26. Granda D, Mejía A, Jiménez G. Utilización de residuos de plátano para la producción de metabolitos secundarios por fermentación en estado sólido con el hongo *Lentinus crinitus*. *Vitae.* 2005;12(2):13-20.
27. Tapin S, Sigoillot J-C, Asther M, Petit-Conil M. Feruloyl Esterase Utilization for Simultaneous Processing of Nonwood Plants into Phenolic Compounds and Pulp Fibers. *J Agric Food Chem.* 2006;54(10):3697-3703.
28. Arora D, Sharma RK, Chandra P. Biodelignification of wheat straw and its effect on in vitro digestibility and antioxidant properties. *Int Biodeter Biodegr.* 2011;65(2):352-358.
29. Viñals-Verde M, Bell-García A, Michelena-Álvarez G, Ramil-Mesa M. Obtención de etanol a partir de biomasa lignocelulósica. *ICIDCA.* 2012;46(1):7-16.
30. González-García Y, González-Reynoso O, Nungaray-Arellano J. Potencial del bagazo de Agave tequilero para la producción de biopolímeros y carbohidrasas por bacterias celulolíticas y para la obtención de compuestos fenólicos. *c-Gnosis.* 2005;3:1-18.



CAPÍTULO III

GENERACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA A PARTIR DE LA DEGRADACIÓN DE LA LIGNINA RESIDUAL DE PAJA DE TRIGO



10. CAPÍTULO III. Generación de ácidos grasos de cadena corta a partir de la degradación de la lignina residual de paja de trigo

La generación de ácidos grasos de cadena corta a partir de la degradación de la lignina residual de paja de trigo, fue descrita en el siguiente artículo:

- 2015; Production of short-chain fatty acids from the biodegradation of wheat straw lignin by *Aspergillus fumigatus*. ISSN: 0960-8524, 1873-2976, **Eduardo Baltierra-Trejo**, Juan Manuel Sánchez-Yáñez, Otoniel Buenrostro-Delgado, Liliana Márquez-Benavides, Bioresource Technology, Vol.196, Pag.418-425.

En este trabajo se presenta un estudio sobre la producción biotecnológica de ácidos grasos de cadena corta derivados de la despolimerización de lignina de paja de trigo. Para ello se utilizó la capacidad de degradación de aromáticos del hongo mitospórico *Aspergillus fumigatus*. Estudios previos ([HTTP://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.08.054](http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.08.054)) reportan el aprovechamiento de la paja de trigo en la obtención de compuestos de metabolitos; sin embargo, hacen uso sólo de la celulosa y las hemicelulosas, dejando la lignina sin aprovechamiento. Actualmente existe poca información sobre la generación de ácidos grasos de cadena corta derivados de la despolimerización de la lignina; los representan compuestos de valor industrial y energético.



Production of short-chain fatty acids from the biodegradation of wheat straw lignin by *Aspergillus fumigatus*



Eduardo Baltierra-Trejo^{a,b}, Juan Manuel Sánchez-Yáñez^b, Otoniel Buenrostro-Delgado^a, Liliana Márquez-Benavides^{a,c,*}

^a Solid Waste and Energy Efficiency Research Group IIAF – Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 58302 Morelia, Mexico

^b Environmental Microbiology Research Group IIQB – Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 58040 Morelia, Mexico

^c Mexican Society of Science and Technology Applied to Solid Waste, Av. Cuauhtémoc 403, Col. Roma Norte, Delegación Cuauhtémoc, D.F., C.P. 06700, Mexico

HIGHLIGHTS

- *Aspergillus fumigatus* biosynthesizes fatty acids from wheat straw lignin.
- Wheat straw lignin is a source for the production of aromatics and fatty acids.
- Additional fatty acids such as propionic, butyric and caproic acids were detected.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 June 2015

Received in revised form 29 July 2015

Accepted 30 July 2015

Available online 4 August 2015

Keywords:

Ascomycetes
Biodegradation
Fungus
Mitosporic
Ligninolytic

ABSTRACT

The wheat straw lignin-rich fraction (WSLig-RF) can be used as a raw material for the production of metabolites for industrial use if ligninolytic mitosporic fungi are used for its biodegradation into aromatics and short-chain fatty acids (SCFAs, i.e., SCFA2–6). Although methods for the production of SCFA2–6 have been described previously, quantitative data of SCFA2–6 production have not been reported. The objectives of this study were to investigate the biodegradation of different concentrations of WSLig-RF by *Aspergillus fumigatus* and to identify whether SCFA2–6 production was dependent on the concentration of aromatics. *A. fumigatus* generated 2805 mg L^{−1} acetic acid when mixed with WSLig-RF at a concentration of 20 g L^{−1}. Thus, aromatics are a substrate for the biosynthesis of SCFA2–6, and their production depends on the concentration of WSLig-RF aromatics.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Globally, 877 million tonnes of wheat straw are produced each year (Talebnia et al., 2010). An estimated 15% of the product is reincorporated into the soil or used as cattle feed, whereas 85% is burned in situ, having a negative impact on the environment resulting from the emission of greenhouse gases (Li et al., 2008). Wheat straw is composed of cellulose (35%), hemicellulose (26%), and lignin (17%) (Xu et al., 2006). Some physical and chemical methods have been used for extraction of cellulose and subsequent conversion of cellulose into bioethanol (Dashtban et al., 2010);

however, few studies have examined the biotechnological potential of purified, semi-purified, or untreated lignin because it is difficult to manipulate (Chávez-Sifontes and Domine, 2013).

Wheat straw lignin can be used as a raw material for the generation of metabolites of industrial interest, such as aromatics and short-chain fatty acids (SCFAs) of 2–6 carbons (SCFA2–6); the biodegradative ability of some genera and species of bacteria, basidiomycetes, and mitosporic ligninolytic fungi can be exploited for this purpose (Xiong et al., 2012). Among mitosporic ligninolytic fungi, the genus *Aspergillus* sp. has been reported to have the highest degradative capacity for aromatics (Milstein et al., 1983); however, few studies have examined the fungal biosynthesis of SCFA2–6 using lignin aromatics (Hirose et al., 2013). Martins et al. (2015) reported that *Aspergillus nidulans* biosynthesizes acetic acid (C₂H₄O₂) and succinic acid (C₄H₆O₄) from benzoic acid, an aromatic compound structurally similar to those present in lignin. However, few studies have reported the concentrations of each of the SCFAs generated.

Abbreviations: SCFA2–6, short-chain fatty acids (C₂–C₆); WSLig-RF, wheat straw lignin-rich fraction.

* Corresponding author at: Solid Waste and Energy Efficiency Research Group IIAF – Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 58302 Morelia, Mexico. Tel.: +52 (443)334 04 75x116.

E-mail address: lmarquez@umich.mx (L. Márquez-Benavides).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.105>

0960-8524/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Based on the literature, the following steps in the metabolic pathway of the degradation of wheat straw lignin to SCFA2–6 by ligninolytic fungi and bacteria are proposed:

- (1) The breaking of ether linkages (β -O-4) among the aromatic monomers of lignin via laccase, lignin peroxidase, and manganese peroxidase (Hirose et al., 2013).
- (2) Oxidative cleavage of the side chain propanoid, with the formation of SCFA2–6, which are incorporated into cellular metabolism by β -oxidation (Prenafeta-Boldú et al., 2006).
- (3) Demethylation and oxidation of aromatic functional groups. Depolymerised lignin forms a wide range of aromatics that are gradually oxidised until two basic types are formed: catechol and protocatechuic acid (Martins et al., 2015).
- (4) Cleavage of aromatic rings by monooxygenases and cytochrome P450 (Prenafeta-Boldú et al., 2006). Catechol and acid protocatechuic are broken by oxidation to form 3-ketoadipic acid, also called β -ketoadipic acid, as an intermediary before the formation of SCFA2–6 (Nichols et al., 2008).
- (5) Cleavage of 3-ketoadipic acid into two SCFAs, acetic acid and succinic acid (Wilson and Jones, 1993), which enter into the Krebs cycle as carbon and energy sources or become esterified in the biosynthesis of long-chain fatty acids, such as oleic acid ($C_{18}H_{34}O_2$), linoleic acid ($C_{18}H_{32}O_2$) (Prenafeta-Boldú et al., 2006), or triacylglycerol (Kosa and Ragauskas, 2012).

According to Kirk and Chang (1981), the pathway for the generation of SCFA2–6 from the aromatics found in lignin is via 3-ketoadipic acid; however, this route only explains the generation of acetic and succinic acids, whereas the pathways for the synthesis of other types of SCFA2–6 molecules have not been described.

Therefore, the objectives of this study were to evaluate the biodegradation of different concentrations of the wheat straw lignin-rich fraction (WSLig-RF) by *A. fumigatus* and to identify whether SCFA2–6 production was dependent on the concentration of aromatic by-products of WSLig-RF.

2. Methods

2.1. Preparation of the WSLig-RF

To obtain the WSLig-RF, wheat straw was treated to decrease cellulose and hemicellulose content. First, dry wheat straw was grounded and sieved through a 0.0841 mm screen. To remove the cellulose and hemicellulose fractions from the wheat straw, the material was hydrolysed by adding 10% CH_3-COOH (acetic acid) (v/v) at a ratio of 1: 2 (w/v) for 30 min, neutralised with sodium hydroxide (NaOH) 10% (w/v), and then heated at 120 °C for 60 min. Finally, the treated wheat straw was washed with distilled water and dried at 70 °C for 24 h (Fig. 1).

2.2. Wheat straw characterisation

A Soxhlet extraction method was used to analyse the content of lignin and holocelulloses in wheat straw. A sample (6.0 g) was weighed and placed into a cellulose extraction thimble

(25 mm $\times$ 80 mm; Whatman). The thimble in the Soxhlet extraction apparatus was subjected to a series of distillation processes with a solution of ethanol-toluene (1:3) at 110 °C for 4 h to obtain an extractive-free sample (Sun et al., 2000).

To determine the content of holocelulloses, 1 g of the extractive-free sample was used. To this sample, 50 mL distilled water, two drops of acetic acid, and 0.3 g sodium chlorite ($NaClO_2$) were added. Acetic acid and sodium chlorite were added three times every hour, and the mixture was kept in a water bath at 75 °C for 4 h. At the end of this incubation period, the mixture was vacuum filtered, and the remnant was dried at 40 °C until a constant weight was reached (Wise et al., 1946).

Next, to determine the content of lignin, 1 g of the extractive-free sample was used. Sulphuric acid (50 mL; 72%) was added to the sample, and the mixture was kept at 20 °C in a water bath for 2 h. Then, 200 mL distilled water was slowly added, and the mixture was boiled for 5 min. After cooling, the mixture was filtered on a Gooch crucible, and the solid fraction was dried at 105 °C to a constant weight. To determine ash content, the following modifications were carried out. First, 3 g of wheat straw was calcined at 550 °C for 4 h. The sample was then cooled and weighed until a constant weight was achieved, as described by Runkel and Witt (1953) and (Bernabé-Santiago et al., 2013). All experiments were carried-out in triplicate.

2.3. Activation and inoculation of *A. fumigatus*

The strain *A. fumigatus* AA4 from the mitosporic ligninolytic fungus collection of the Environmental Microbiology Laboratory (Research Institute of Chemistry-Biology of Michoacana University, Morelia, México) was used. The strain was cultivated in WSLig-RF agar, which contained the following components ($g L^{-1}$): WSLig-RF 10.0; casein peptone 5.0; yeast extract 1.3; K_2HPO_4 0.17; KH_2PO_4 2.61; $MgSO_4$ 1.5; NaCl 0.9; $CuSO_4$ 0.05; bromothymol blue (a pH indicator) 10 ppm; 2.5 mL powder detergent solution 10% (w/v); and 1.0 mL L^{-1} trace element solution containing (in $g L^{-1}$) H_3BO_3 2.86, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.22, $MnCl_2 \cdot 7H_2O$ 1.81, $KMnO_4$ 0.09, and agar 18.0. Finally, the pH of the WSLig-RF agar was adjusted to 5.5, and the agar was sterilised at 121 °C for 20 min (Sánchez-Yáñez, 2007).

A. fumigatus spores were initially preserved in soil at –5 °C. Spores were activated by direct inoculation into the WSLig-RF agar and then allowed to grow at 30 °C for 5 days. After this period, 15.0 mL of sterile saline-detergent solution (12.0 mL NaCl [0.85%] and 3.0 mL detergent [0.01%]) was added to separate and cultivate the mycelium. The mixture was carefully stirred by hand, and the mycelia were removed using a bacteriological loop. The remaining suspended mycelia were collected using a sterile pipette. Afterwards, 12.5 mL of the obtained mycelia was added to Erlenmeyer flasks (500 mL) containing 250 mL sterile WSLig-RF broth (pH 5.5). The composition of the broth was as follows ($g L^{-1}$): WSLig-RF 20, 30, 40, or 50 $g L^{-1}$; casein peptone 5.0; yeast extract 1.3; K_2HPO_4 0.17; KH_2PO_4 2.61; $MgSO_4$ 1.5; NaCl 0.9; $CuSO_4$ 0.05; bromothymol blue 10 ppm; 2.5 mL powder detergent solution 10% (p/v); and 1 mL L^{-1} trace element solution containing (in $g L^{-1}$) H_3BO_3 2.86, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.22, $MnCl_2 \cdot 7H_2O$ 1.81, and $KMnO_4$ 0.09 (Sánchez-Yáñez, 2007). The Erlenmeyer flasks were aerobically incubated in a shaker (ThermoScientific MaxQ4000)

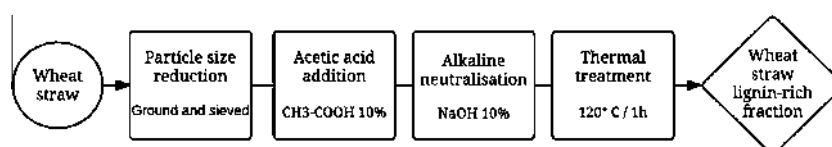


Fig. 1. Steps to obtain the wheat straw lignin-rich fraction.

for 28 days at 30 °C and 150 rpm. Samples (10 mL) were taken from each flask on days 0, 7, 14, 21, and 28. All samples were centrifuged, and the supernatants were preserved at –5 °C for 1 week use in analyses of aromatics and fatty acids.

A randomised experimental design was used, and WSLig-RF concentrations, as previously stated, were 20, 30, 40, and 50 g L⁻¹. In addition, a control experiment (no inoculum) was included. All concentrations and control experiments were performed in triplicate. Six aromatics were studied: ferulic acid, syringic acid, vanillic acid, p-hydroxybenzoic acid, vanillin, and guaiacol. In addition, seven SCFAs (SCFA2–6) were studied as follows: acetic acid, propionic acid, butyric acid, isobutyric acid, valeric acid, isovaleric acid, and caproic acid.

2.4. Determination of the extent of WSLig-RF depolymerisation by *A. fumigatus*

The extent of WSLig-RF depolymerisation was measured after 28 days of incubation with *A. fumigatus*. WSLig-RF broth was vacuum filtered to separate the mycelia, and the remnant was washed using 500 mL distilled water, followed by drying at 70 °C for 24 h. Then, the extent of WSLig-RF depolymerisation was calculated by determining the lost weight as a percentage of the initial weight (Liew et al., 2011).

2.5. Identification of aromatics

Aromatics produced by *A. fumigatus* were extracted from the WSLig-RF broth. A 5.0 mL sample was collected and centrifuged at 8000 rpm for 15 min, and the supernatant was adjusted to 2.0 pH with concentrated HCl (37% w/w). Finally, NaCl was added to saturation, 3.0 mL ethyl acetate was added (Wu et al., 1987). A 1.0 µL sample was injected into a gas chromatograph (Varian CP-3800) fitted with a capillary column composed of phenyl-methylpolysiloxane (30 m × 0.53 mm), using N₂ as a carrier gas and a flux of 35.0 mL/min; the temperatures of the oven, injector, and flame ionisation detector (FID) were 90, 270, and 300 °C, respectively. Aromatic standards consisted of a mixture of p-hydroxybenzoic, vanillic, ferulic, and syringic acids as well as vanillin and guaiacol at concentrations of 0.05, 0.1, 0.5, and 1.0 mg mL⁻¹ in ethyl acetate (Wu et al., 1987).

2.6. Identification of SCFA2–6

A standard mixture of SCFA2–6 was prepared using acetic acid, propionic acid, isobutyric acid, butyric acid, isovaleric acid, valeric acid, and caproic acid (Baker) at a concentration of 0.5 mL⁻¹ (0.05 mL of each SCFA2–6 dissolved in 10.0 mL of methanol); then, 1:10, 1:20, 1:40, and 1:100 dilutions were made to construct the calibration curve (Valenciaga et al., 2009). To determine the identity of SCFA2–6, 3.0 µL was injected into the gas chromatograph (VARIAN CP-3800) fitted with a capillary column (Agilent, DB-FFAP; length 60.0 m × 0.53 mm diameter, film 1 µm). N₂ carrier gas was maintained at a flow rate of 15.0 mL min⁻¹, the oven temperature was 200 °C, the FID temperature was maintained at

250 °C, and a temperature ramp was used for the injector, starting at 120 °C and increasing by 10 °C min⁻¹ until reaching 200 °C.

2.7. Statistical methods

Lignin content and the extent of WSLig-RF depolymerisation were analysed by Tukey's test at a significance level of $\alpha = 0.05$. To establish the relationship between production of aromatics and SCFA2–6, we used the determination coefficient R^2 . The statistical distribution similarities were compared using the Mann–Whitney–Wilcoxon test ($\alpha = 0.05$) with JMP 8.0 software (SAS).

3. Results and discussion

3.1. Wheat straw and WSLig-RF characterisation

Wheat straw was partially purified using a thermal acid method; this method decreased the total concentration of holocellulose from 67.4% to 33.3% (w/w) through hydrolysis of these polymers. The lignin content increased from 21.3% to 49.8% after treatment (Table 1) due to the reduction of cellulose and hemicellulose concentrations.

3.2. Biodegradation of the WSLig-RF by *A. fumigatus*

The highest percentage of WSLig-RF depolymerisation (26.2%) by *A. fumigatus* was observed at a concentration of 20 g L⁻¹ WSLig-RF after 28 days of incubation, although this value was not significantly different ($\alpha = 0.05$) from that observed at 30 and 40 g L⁻¹ WSLig-RF, which yielded WSLig-RF depolymerisation percentages of 24.6% and 23.5%, respectively. At 50 g L⁻¹ WSLig-RF, WSLig-RF depolymerisation was only 21.4%, which was significantly different from the other tested WSLig-RF concentrations.

3.3. Generation and identification of aromatics

Fig. 2 shows the kinetics of aromatic production during 28 days of culturing. At concentrations of 20 and 30 g L⁻¹, the most abundant aromatic was ferulic acid, with 5 g L⁻¹ at the end of week 1. At a concentration of 40 g L⁻¹ WSLig-RF, the most abundant was syringic acid, reaching a concentration of 6.7 g L⁻¹ after 1 week. At a concentration of 50 g L⁻¹, the most abundant product was vanillic acid, reaching 6.4 g L⁻¹ at week 2. Thus, as the concentration of WSLig-RF increased, the aromatic profile was modified.

3.4. Generation and identification of SCFAs

WSLig-RF biodegradation by *A. fumigatus* produced seven detected SCFAs: acetic acid, propionic acid, butyric acid, isobutyric acid, valeric acid, isovaleric acid, and caproic acid. The SCFA2–6 that was generated in the largest amount was acetic acid, for which cumulative totals of 5.7 and 4.5 g L⁻¹ were produced after 28 days of incubation with 20 or 30 g L⁻¹ WSLig-RF, respectively (Fig. 3a and b). The smallest amounts of SCFA2–6 were produced at concentrations of 40 and 50 g L⁻¹ WSLig-RF, reaching only 3.1

Table 1
Chemical composition of wheat straw and the wheat straw lignin-rich fraction.

Material	Lignin (% w/w)		Holocellulose (% w/w)		Ash (% w/w)	
Wheat straw (dry weight)	21.3 ± 4.0	b	67.4 ± 0.6	A	11.3	A
WSLig-RF	49.8 ± 5.2	a	33.3 ± 1.0	B	16.9	A
WSLig-RF-biodegraded*	16.6 ± 6.2	bc	0.6 ± 0.6	C	14.6	A

The letters indicate statistically significant differences in enzymatic activity measurements for each week with a significance level of $\alpha = 0.05$.

* Wheat straw lignin-rich fraction at a concentration of 20 g L⁻¹ biodegraded by *Aspergillus fumigatus* after 28 days of culture. Holocellulose: sum of hemicelluloses and cellulose.

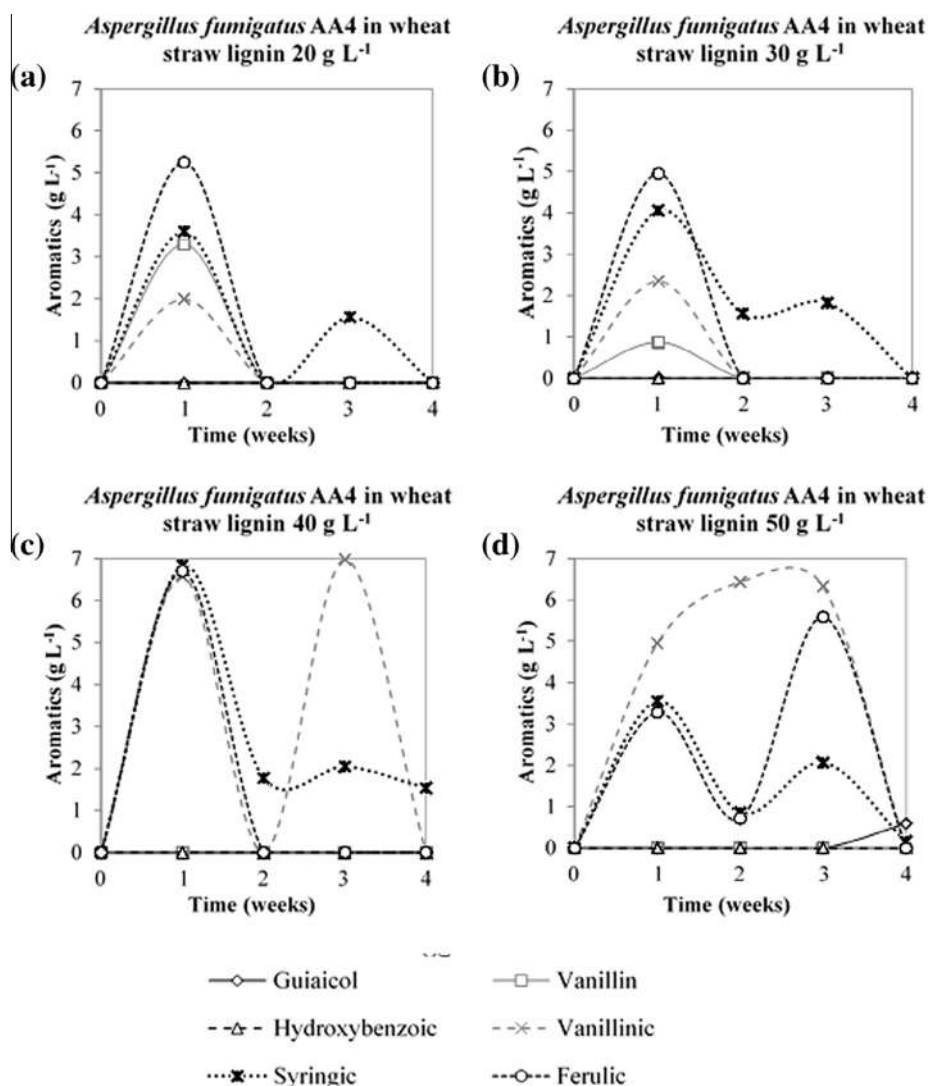


Fig. 2. Kinetics of aromatic production by the biodegradation of WSLig-RF by *Aspergillus fumigatus* AA4 at different concentrations: (a) 20 g L⁻¹, (b) 30 g L⁻¹, (c) 40 g L⁻¹, and (d) 50 g L⁻¹ after 28 days of incubation.

and 2.3 g L⁻¹, respectively (Fig. 3c and d). Over the time course, our results indicate that 40 g L⁻¹ WSLig-RF exhibited a negative effect on SCFA2–6 generation by *A. fumigatus* starting from the second week of culture.

Because WSLig-RF is regarded as a partially purified lignin source, identifying whether SCFA2–6 generation by *A. fumigatus* depended on the concentration of aromatics is important, but requires the consideration of some observations. First, sugars from cellulose and hemicellulose are more easily used as carbon sources than aromatics (Chen et al., 2009). Thus, SCFA2–6 may originate from this source, but once cellulose and hemicellulose have been depleted, SCFA2–6 only must be generated from lignin. Furthermore, in *A. fumigatus*, a shortage of carbohydrates as carbon sources induces ligninolytic enzyme activities (Munster et al., 2014). According to the results of the biodegradation kinetics of WSLig-RF by *A. fumigatus*, four phases for SCFA2–6 generation are proposed depending on carbon source availability under specific culture medium (Fig. 4). Phase I is the period prior to the induction of ligninolytic activity when *A. fumigatus* consumes the remaining cellulose and hemicellulose; in phase II, *A. fumigatus* degrades the aromatic fraction released by WSLig-RF after the thermal acid treatment (Section 2.1). After this, the fungus uses

the remaining cellulose and hemicellulose and degrades them until acetic acid is formed. In phase III, SCFA2–6 generation depends only on the biodegradation of lignin to aromatics, whereas in phase IV, *A. fumigatus* metabolic activity decreases as WSLig-RF is consumed and as its concentration decreases in the culture medium, subsequently decreasing the concentrations of aromatics and SCFA2–6.

The process through which *A. fumigatus* transforms WSLig-RF into SCFA2–6 is shown in Fig. 5. WSLig-RF is initially biodegraded into three basic monomer types: ferulic acid, syringic acid, and possibly smaller amounts of *p*-coumaric acid, as previously described (Buranov and Mazza, 2008; Ghaffar and Fan, 2014). Next, these initial monomers are transformed into other aromatics, such as vanillin, vanillic acid, and guaiacol. According to Rahouti et al. (1989), these aromatics are sequentially generated, i.e., they are formed when the concentrations of the primary ferulic and syringic acids decrease. The pool of aromatics is gradually oxidised into two basic forms: protocatechuic acid or catechol, following the splitting of the enzymatic aromatic ring with the formation of 3-ketoadipic acid, which in turn is fractioned into acetic acid and succinic acid, as reported by Rochkind et al. (1986). However, the obtained results showed that other SCFAs, such as

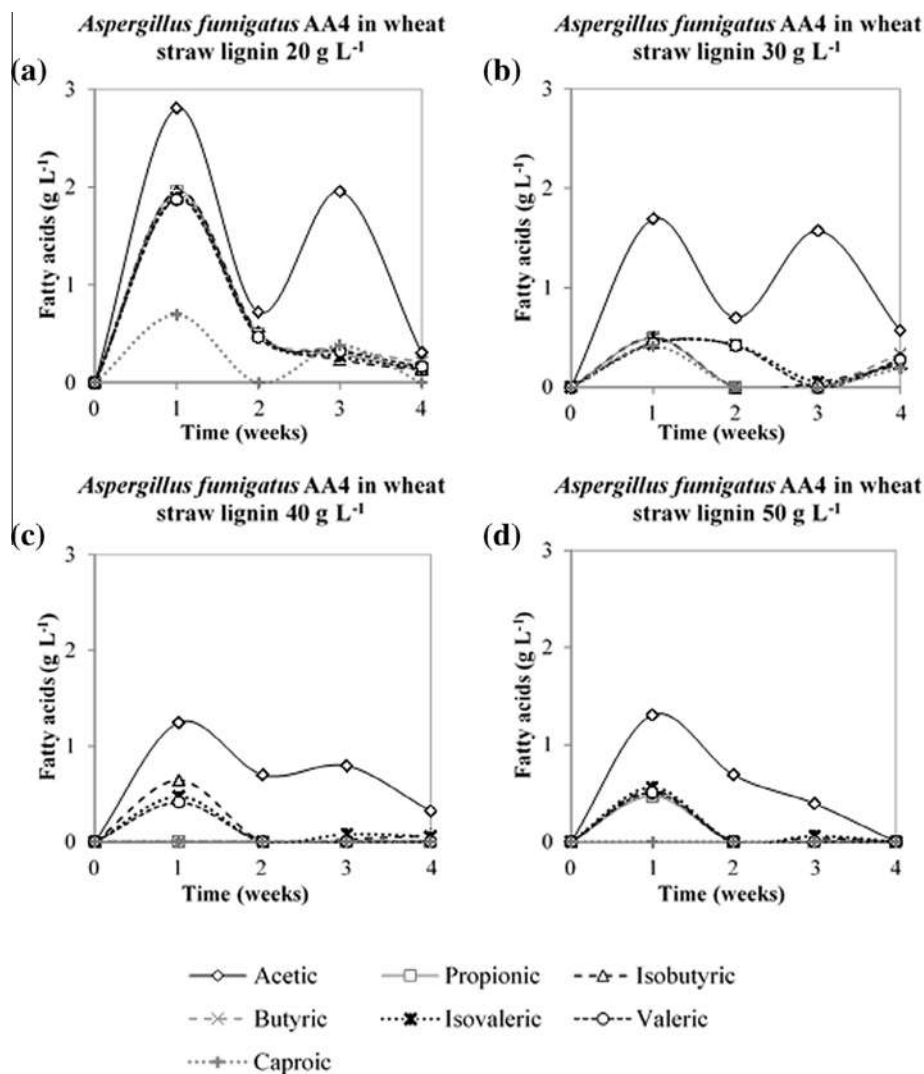


Fig. 3. Kinetics of short-chain fatty acid production by the biodegradation of WSLig-RF by *Aspergillus fumigatus* AA4 at different concentrations: (a) 20 g L⁻¹, (b) 30 g L⁻¹, (c) 40 g L⁻¹, and (d) 50 g L⁻¹ after 28 days of incubation.

propionic and butyric acids, are formed and have not been previously reported.

During the production of acetic acid in experiments with WSLig-RF concentrations of 20 and 30 g L⁻¹ (Fig. 3a and b), a diauxic curve was detected with two peak values in weeks 1 and 3, similar to that of syringic acid. These data suggested that WSLig-RF biodegradation towards syringic acid was related to the biosynthesis of acetic acid. Thus, acetic acid and syringic are key metabolites that are found in both the initial and final phases of the biodegradation of WSLig-RF. According to the determination coefficient (R^2), there was a direct correlation between syringic and acetic acid production; at a concentration of 20 g L⁻¹ WSLig-RF, the correlation coefficient was 94%. Furthermore, the Mann–Whitney–Wilcoxon test revealed that the production of syringic acid and acetic acid was similar when comparing their statistical distributions (Table 2), suggesting that the production of fatty acids depended on the release of the lignin aromatic monomers. According to Rochkind et al. (1986) and Wilson and Jones (1993), acetic acid is synthesised via 3-ketoadipic acid due to the rupture of either catechol aromatic rings or protocatechuic acid during lignin depolymerisation. Nonetheless, the presence of propionic acid, butyric acid, isobutyric acid, valeric acid, and iso-valeric acid indicates that this

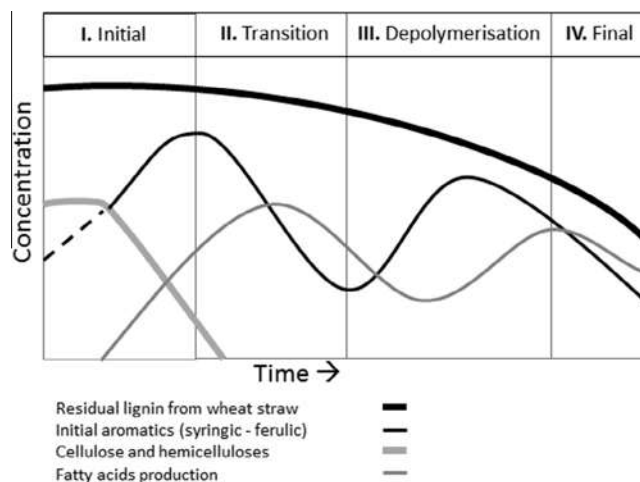


Fig. 4. Biodegradation phases of wheat straw lignin-rich fraction (WSLig-RF) by *Aspergillus fumigatus*.

metabolic route is actually more common than suggested by the literature (Fig. 5).

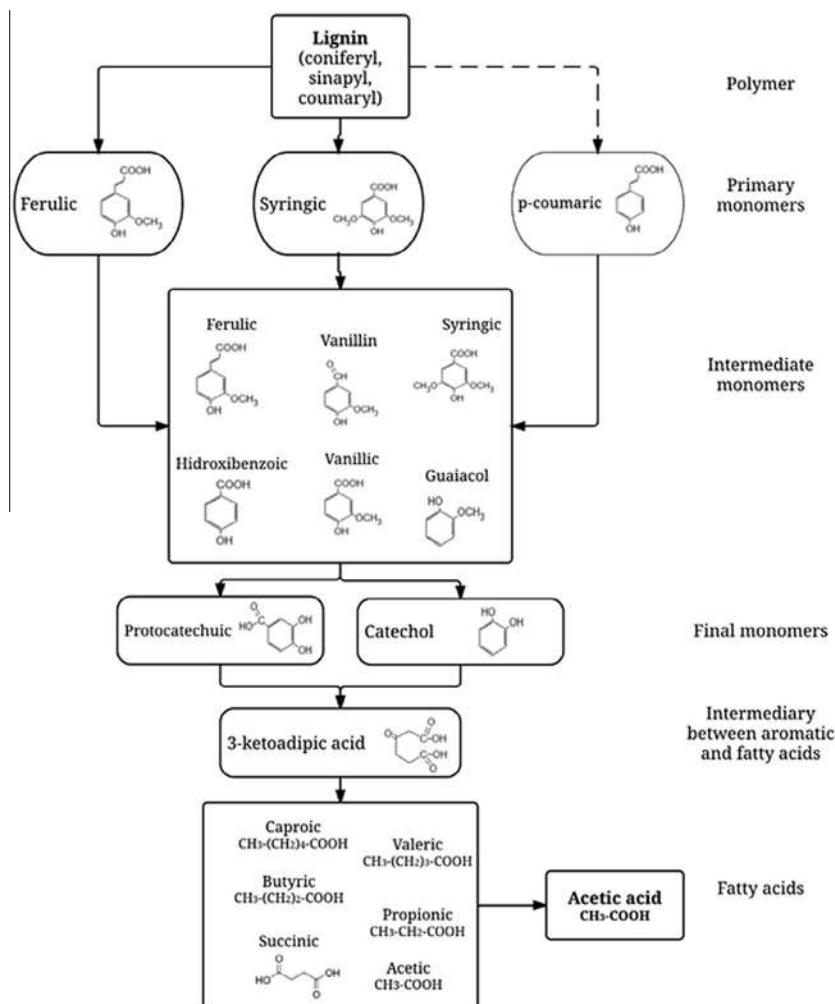


Fig. 5. Conversion of wheat straw lignin-rich fraction (WSLig-RF) into short-chain fatty acids by *Aspergillus fumigatus*.

Table 2

Comparison of syringic acid versus acetic acid production.

Time (weeks)	Concentration of the wheat straw lignin-rich fraction (WSLig-RF)							
	20 g L ⁻¹		30 g L ⁻¹		40 g L ⁻¹		50 g L ⁻¹	
	Syringic (g L ⁻¹)	Acetic (g L ⁻¹)	Syringic (g L ⁻¹)	Acetic (g L ⁻¹)	Syringic (g L ⁻¹)	Acetic (g L ⁻¹)	Syringic (g L ⁻¹)	Acetic (g L ⁻¹)
1	3.595	2.805	4.057	1.694	6.833	1.246	3.554	1.305
2	ND	0.721	1.560	0.696	1.769	0.698	0.847	0.687
3	1.560	1.956	1.818	1.573	2.045	0.794	2.066	0.392
4	ND	0.305	ND	0.569	1.537	0.320	0.154	ND
Correlation analysis	R ² = 0.94		R ² = 0.67		R ² = 0.77		R ² = 0.71	

Mann–Whitney–Wilcoxon test, similarity = 0.1088, prob > χ^2 α = 0.05. ND: not detected.

Table 3 shows a compilation of reports that have used lignin or wheat to obtain SCFAs. However, making a comparison among these different reports is difficult because fatty acids may originate from cellulose, hemicellulose, lignin, or a mixture of these components. Furthermore, the reports listed in Table 3 do not clarify the source of lignin or the purity of the lignin used, and the obtained concentrations of fatty acids were not provided. Most of the time, available data on fatty acids derived from cellulose and hemicellulose are collected using wheat straw. For example, Nigam (2001) used *Pichia stipitis* and reported the production of acetic acid (2.7 g L⁻¹) from hemicellulose wheat straw, concluding that hemicellulose is an important source for SCFAs; however, this study did not consider the production of aromatics. Thomsen et al. (2008)

used wheat straw processed by hydrothermal treatment in a three-step reactor and obtained 3.9 g L⁻¹ acetic acid, reported as being generated from the cellulose and hemicellulose fraction. Ahiring et al. (2015) used pretreated wheat straw by steam explosion and subjected this wheat straw to anaerobic degradation, yielding 3.2 g L⁻¹ butyric acid. However, the authors did not clarify the origins of the cellulose, hemicellulose, or aromatic fractions.

In our study, SCFA production depended on the initial concentration of WSLig-RF. At concentrations of 40 and 50 g L⁻¹, lower amounts of acetic acid were identified; at the 50 g L⁻¹ concentration, the level of acetic acid was below level detected during the last week of experimentation. Thus, under the described experimental conditions, WSLig-RF concentrations above 40 g L⁻¹ are

Table 3

Generation of short-chain fatty acids from different lignocellulosic biomass sources.

Material	Process type	Short-chain fatty acid	Concentration (g L ⁻¹)	References
<i>Mitosporic ligninolytic fungi and yeasts</i>				
Wheat straw lignin-rich fraction (20 g L ⁻¹)	Biosynthesis with <i>Aspergillus fumigatus</i>	Acetic acid	5.788	This work
		Propionic acid	2.885	
		Isobutyric acid	2.845	
		Butyric acid	2.970	
		Isovaleric acid	2.786	
		Valeric acid	2.823	
		Caproic acid	1.079	
Wheat straw hemicellulose	Biosynthesis with <i>Pichia stipitis</i>	Acetic acid	2.700	Nigam (2001)
<i>Bacteria</i>				
Purified lignin	Biosynthesis with <i>Escherichia coli</i>	Adipic acid	NS	Sauer et al. (2014)
Purified lignin	Biosynthesis with <i>Bacillus limnephilus</i>	Acetic acid	NS	Yang et al. (2014)
<i>Basidiomycetes</i>				
Purified lignin	Biosynthesis with <i>Nematoloma frowardii</i>	Acetic, formic, glyoxylic, oxalic, and malonic acids	NS	Hofrichter et al. (1998)
<i>Physicochemical treatments</i>				
Wheat straw (hemicellulose and cellulose)	Hydrothermal treatment, 3 stage reactor (180 °C, 200 kg water/h)	Acetic acid	3.900	Thomsen et al. (2008)
<i>Mixed</i>				
Wheat straw	Steam explosion pretreatment and anaerobic digestion	Butyric acid	3.221	Ahring et al. (2015)
		Valeric acid	0.112	
		Caproic acid	0.107	

NS: not specified.

detrimental to the oxidation of aromatics into SCFAs. Because syringic acid is not being transformed into acetic acid, intermediate forms, such as vanillin, tend to accumulate (Fig. 2b and c). The WSLig-RF concentration is limiting to the production of SCFA2–6. Therefore, further studies are required because reports evaluating the use of purified wheat straw processed by basidiomycetes and ligninolytic mitosporic fungi have only described concentrations below 20 g L⁻¹ (Dinis et al., 2009; Dias et al., 2010). This must be taken into account for studies investigating the applications of wheat straw because the process is dependent upon the concentration of WSLig-RF as the sole source of carbon.

4. Conclusions

In summary, SCFA2–6 generation was dependent on the aromatics in the culture medium, and the WSLig-RF concentration was a limiting factor for the depolymerisation capacity of *A. fumigatus*. Therefore, further studies are needed to optimise the culture conditions as well as other nutritional factors to increase the production of SCFA2–6.

Acknowledgements

This study was generously funded by Project 150001 SENER-CONACyT, Project 2.7 (2015) CIC-UMSNH, and CONACyT (postgraduate grant 239180). We also acknowledge the insightful comments of the reviewers.

References

- Ahring, B.K., Biswas, R., Ahamed, A., Teller, P.J., Uellendahl, H., 2015. Making lignin accessible for anaerobic digestion by wet-explosion pretreatment. *Bioresour. Technol.* 175, 182–188.
- Bernabé-Santiago, R., Ávila-Calderón, L., Rutiaga-Quinones, J., 2013. Redalyc. Componentes químicos de la madera de cinco especies de pino del municipio de Morelia, Michoacán. *Madera y Bosques* 19, 21–35.
- Buranov, A.U., Mazza, G., 2008. Lignin in straw of herbaceous crops. *Ind. Crop. Prod.* 28, 237–259.

- Chávez-Sifontes, M., Domine, M.E., 2013. Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. *Av. Cienc. Ing.* 4, 15–46.
- Chen, X., Li, Z., Zhang, X., Hu, F., Ryu, D.Y.D., Bao, J., 2009. Screening of oleaginous yeast strains tolerant to lignocellulose degradation compounds. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 159, 591–604.
- Dashtban, M., Schraft, H., Syed, T.A., Qin, W., 2010. Fungal biodegradation and enzymatic modification. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 1, 36–50.
- Dias, A.A., Freitas, G.S., Marques, G.S.M., Sampaio, A., Fraga, I.S., Rodrigues, M.A.M., Evtuguin, D.V., Bezerra, R.M.F., 2010. Enzymatic saccharification of biologically pre-treated wheat straw with white-rot fungi. *Bioresour. Technol.* 101, 6045–6050.
- Dinis, M.J., Bezerra, R.M.F., Nunes, F., Dias, A.A., Guedes, C.V., Ferreira, L.M.M., Cone, J.W., Marques, G.S.M., Barros, A.R.N., Rodrigues, M.A.M., 2009. Modification of wheat straw lignin by solid state fermentation with white-rot fungi. *Bioresour. Technol.* 100, 4829–4835.
- Ghaffar, S.H., Fan, M., 2014. Lignin in straw and its applications as an adhesive. *Int. J. Adhes. Adhes.* 48, 92–101.
- Hirose, J., Nagayoshi, A., Yamanaka, N., Araki, Y., Yokoi, H., 2013. Isolation and characterization of bacteria capable of metabolizing lignin-derived low molecular weight compounds. *Biotechnol. Biochem. Eng.* 18, 736–741.
- Hofrichter, M., Scheibner, K., Schneegaß, I., Fritsche, W., 1998. Enzymatic combustion of aromatic and aliphatic compounds by manganese peroxidase from *Nematoloma frowardii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 399–404.
- Kirk, T.K., Chang, H.-M., 1981. Potential applications of bio-ligninolytic systems. *Enzyme Microb. Technol.* 3, 189–196.
- Kosa, M., Ragauskas, A.J., 2012. Bioconversion of lignin model compounds with oleaginous *Rhodococci*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 891–900.
- Li, L.J., Wang, Y., Zhang, Q., Li, J.X., Yang, X.G., Jin, J., 2008. Wheat straw burning and its associated impacts on Beijing air quality. *Sci. China D* 51, 403–414.
- Liew, C.Y., Husaini, A., Hussain, H., Muid, S., Liew, K.C., Roslan, H.A., 2011. Lignin biodegradation and ligninolytic enzyme studies during biopulping of *Acacia mangium* wood chips by tropical white rot fungi. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27, 1457–1468.
- Martins, T.M., Hartmann, D.O., Planchon, S., Martins, I., Renaut, J., Silva-Pereira, C., 2015. The old 3-oxoadipate pathway revisited: New insights in the catabolism of aromatics in the saprophytic fungus *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* 74, 32–44.
- Milstein, O., Vered, Y., Shragina, L., Gressel, J., Flowers, H.M., Hüttermann, A., 1983. Metabolism of lignin related aromatic compounds by *Aspergillus japonicus*. *Arch. Microbiol.* 135, 147–154.
- Munster, J.M.v., Daly, P., Delmas, S., Pullan, S.T., Blythe, M.J., Malla, S., Kokolski, M., Noltorp, E.C.M., Wennberg, K., Fetherston, R., Beniston, R., Yu, X., Dupree, P., Archer, D.B., 2014. The role of carbon starvation in the induction of enzymes that degrade plant-derived carbohydrates in *Aspergillus niger*. *Fungal Genet. Biol.* 72, 34–47.
- Nichols, N.N., Sharma, L.N., Mowery, R.A., Chambliss, C.K., Walsum, G.P.v., Dien, B.S., Iten, L.B., 2008. Fungal metabolism of fermentation inhibitors present in corn stover dilute acid hydrolysate. *Enzyme Microb. Technol.* 42, 624–630.

- Nigam, J.N., 2001. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. J. Biotechnol. 87, 17–27.
- Prenafeta-Boldú, F.X., Summerbell, R., Hoog, G.S.d.H., 2006. Fungi growing on aromatic hydrocarbons: biotechnologýs unexpected encounter with biohazard? FEMS Microbiol. Rev. 30, 109–130.
- Rahouti, M., Seigle-Murandi, F., Steiman, R., Eriksson, K.-E., 1989. Metabolism of ferulic acid by *Paecilomyces variotii* and *Pestalotia palmarum*. Appl. Environ. Microbiol. 55, 2391–2398.
- Rochkind, M.L., Blackburn, J.W., Sayler, G.S., 1986. Microbial decomposition of chlorinated aromatic compounds. United States Environmental Protection Agency, United States Environmental Protection Agency, University of Tennessee, Cincinnati, pp. 18–19.
- Runkel, R.O.H., Witt, H., 1953. Zur Kenntnis des thermoplastischen Verhaltens von Holz. Holz Roh Werkst. 11, 457–461.
- Sánchez-Yáñez, J.M., 2007. Breve tratado de microbiología agrícola. Teoría y práctica. Corporativo de Desarrollo Sustentable, Centro de Investigación y Desarrollo de Michoacán, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Secretaría de Desarrollo Rural en Michoacán, Morelia, Michoacán México.
- Sauer, M., Marx, H., Mattanovich, D., 2014. Towards production of short chain fatty acids and adipic acid in *Escherichia coli*. In: 36th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. U.S. Department of Energy, Clearwater Beach, Florida.
- Sun, R., Tomkinson, J., Zhu, W., Wang, S.Q., 2000. Delignification of maize stems by peroxymonosulfuric acid, peroxyformic acid, peracetic acid, and hydrogen peroxide. 1. Physicochemical and structural characterization of the solubilized lignins. J. Agric. Food Chem. 48, 1253–1262.
- Talebna, F., Karakashev, D., Angelidaki, I., 2010. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. Bioresour. Technol. 101, 4744–4753.
- Thomsen, M., Thygesen, A., Thomsen, A.B., 2008. Hydrothermal treatment of wheat straw at pilot plant scale using a three-step reactor system aiming at high hemicellulose recovery, high cellulose digestibility and low lignin hydrolysis. Bioresour. Technol. 99, 4221–4228.
- Valenciaga, D., Herrera, R.S., Simoes, E.O.d., Chongo, B., Torres, V., 2009. Composición monomérica de la lignina de *Pennisetum purpureum* vc. Cuba CT-115 y su variación con la edad de rebrote. Rev. Cubana Cienc. Agr. 43, 315–319.
- Wilson, S.C., Jones, K.C., 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. Environ. Pollut. 81, 229–249.
- Wise, L.E., Murphy, M., D'Addieco, A.A., 1946. Chlorite holocellulose, its fractionation and bearing on summative wood analysis and on studies on the hemicelluloses. Pap. Trade J. 122, 35–42.
- Wu, F.J., Moreno, J., Vela, G.R., 1987. Growth of *Azotobacter vinelandii* on soil nutrients. Appl. Environ. Microbiol. 53, 489–494.
- Xiong, X., Wang, X., Chen, S., 2012. Engineering of a xylose metabolic pathway in *Rhodococcus* strains. Appl. Environ. Microbiol. 78, 5483–5491.
- Xu, F., Sun, J.-X., Sun, R., Fowler, P., Baird, M.S., 2006. Comparative study of organosolv lignins from wheat straw. Ind. Crop. Prod. 23, 180–193.
- Yang, B., Wang, J., Zhu, D., Sun, J., 2014. Bioprocessing of biomass derived lignin to fatty acids. In: 36th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. U.S. Department of Energy, Clearwater Beach, Florida.



CAPÍTULO IV

CONVERSIÓN DE LOS PRODUCTOS DE LA DESPOLIMERIZACIÓN DE LA LIGNINA RESIDUAL DE PAJA DE TRIGO EN BIOGÁS



11. CAPÍTULO IV. Conversión de los productos de la despolimerización de la lignina residual de paja de trigo en biogás

11.1. Material y métodos

Selección y cultivo de los ascomicetos

Se seleccionaron y cultivaron por separado los ascomicetos más eficientes en la despolimerización de la LIREPATO a partir de cuatro cepas terrestres (AT1, AT2, AT3 y AT4) y cuatro acuáticos (AA1, AA2, AA3 y AA4), perteneciente a la colección del Laboratorio de Microbiología Ambiental del IIQB de la UMSNH, conservadas en viales con silosil a 10 °C.

Cultivo de los ascomicetos

Activación de los ascomicetos

Para la activación de los ascomicetos se inocularon en caja de Petri con medio agar-LIREPATO cuya composición es (g L⁻¹): LIREPATO 10; peptona de caseína (Bioxon) 5; extracto de levadura (Bioxon) 1.3; K₂HPO₄ (Meyer) 0.17; KH₂PO₄ (Meyer) 2.61; MgSO₄ (Fermon) 1.5; NaCl (Meyer) 0.9; CuSO₄ (Baker) 0.05; azul de bromotimol (Sigma) 10 ppm; detergente (Roma^{MR}) 2.5 mL de una solución al 10 % (p/v); 1 ml L⁻¹ de una solución de oligoelementos con la siguiente composición (g L⁻¹): H₃BO₃ (Baker) 2.86; ZnSO₄·7H₂O (Meyer) 0.22; MnCl₂·7H₂O (Meyer) 1.81; KMnO₄ (Meyer) 0.09; ajustar el pH a 5.5 con ácido acético (Baker) al 10 % (v/v), agar 18g L⁻¹, se esterilizó a 121 °C por 20 min (Sánchez-Yáñez, 2007).

La LIREPATO se extrajo a partir de paja de trigo mediante tratamiento ácido-térmico para eliminar la celulosa y la hemicelulosa. Se molió la paja y se tamizó en malla 20 (0.0841 mm), se adicionó con atomizador en solución CH₃-COOH (Baker) 10 % (v/v) en proporción 1:2 (p/v) y reposó 20 min. Posteriormente se neutralizó a pH 7 con NaOH (Meyer) 20 % (p/v). Se realizó tratamiento térmico a 120 °C por 60 min, finalmente se enjuagó con agua destilada y se secó a 70 °C por 24 h. Se conservó en refrigeración.



Preparación de inóculo

Para separar el micelio del LIREPATO se vació a la placa 15 mL de solución salina-detergente estéril (12 mL NaCl 0.85 % (p/v) y 3.0 ml detergente (Roma^{MR}) 0.01 % (p/v), se removió con asa bacteriológica y se recuperó con pipeta.

Se inoculó 12.5 mm de la cepa de ascomicetos en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 300 mL de caldo LIREPATO, el cual tuvo la siguiente composición (g L⁻¹): LIREPATO en cinco concentraciones distintas por cada hongo 10, 20, 30, 40, 50; peptona de caseína (Bioxon) 5; extracto de levadura (Bioxon) 1.3; K₂HPO₄ (Meyer) 0.17; KH₂PO₄ (Meyer) 2.61; MgSO₄ (Fermon) 1.5; NaCl (Meyer) 0.9; CuSO₄ (Baker) 0.05; azul de bromotimol (Sigma) 10 ppm; detergente (Roma^{MR}) 2.5 ml de una solución al 10 % (p/v); 1 mL L⁻¹ de una solución de oligoelementos con la siguiente composición (g L⁻¹): H₃BO₃ (Baker) 2.86; ZnSO₄·7H₂O (Meyer) 0.22; MnCl₂·7H₂O (Meyer) 1.81; KMnO₄ (Meyer) 0.09; se ajustó el pH a 5.5 con ácido acético (Baker) al 10 % (v/v), agar bacteriológico 18 g L⁻¹, se esterilizó a 121 °C por 20 min (Sánchez-Yáñez, 2007). Los matraces con caldo LIREPATO (Figura 9) se incubaron en un agitador rotatorio (Thermo Scientific MaxQ 4000) por 35 días a 30 °C y 150 rpm. El caldo LIREPATO se muestreó a los 1, 3, 4, 5, 7, 14, 28 días para determinación de la actividad Lac, LiP y MnP; así como para el análisis de generación de aromáticos y ácidos grasos de cadena corta.

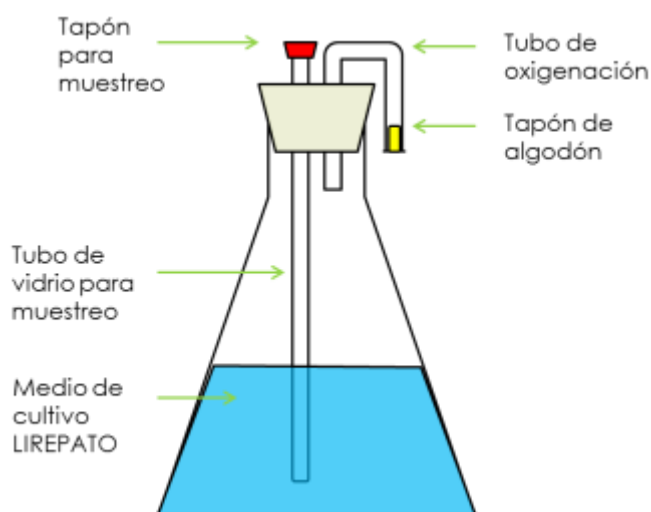


Figura 9. Diseño del matraz para el crecimiento de hongos ligninolíticos.



Contenido de lignina y holocelulosas

Se determinó el contenido de lignina y holocelulosas del LIREPATO previo y durante su despolimerización en base al siguiente protocolo:

Extracción preliminar de la lignina

Pesar en dedal de extracción de celulosa de porosidad media o fina (25 x 80 mm, Whatman) 6.0 g de la muestra y colocar en el aparato de extracción Soxhlet de 500 mL. La temperatura de operación es de 110 °C. Extraer con 200 mL de alcohol etílico al 95%, seguido de 200 mL de solución etanol-tolueno y finalmente con agua caliente de manera sucesiva por 4 horas cada uno. Lavar con 100 mL de agua caliente y finalmente con 50 mL de alcohol para que se facilitar la extracción de la muestra del crisol. Secar a 103 °C en horno por 30 minutos y enfriador en desecador con gel de sílice hasta peso constante. El contenido de extraíbles se calculó dividiendo el peso de la muestra seca entre el peso de la harina libre de extraíbles referido porcentualmente (Ecuación 1). (Sun *et al.*, 2000).

$$\text{Harina libre de extraíbles} = \frac{\text{peso seco inicial} - \text{peso de la muestra (libre de extraíbles)}}{\text{peso seco inicial}} * 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Determinación de celulosas y hemicelulosas

Colocar 1 g de muestra de harina libre de extraíbles en matraz Erlenmeyer. Adicionar 0.3 g de clorito de sodio (NaClO_2) y 50 mL de agua destilada con 2 gotas de ácido acético. Tapar la muestra con vidrio de reloj y llevar a baño maría a 75 °C por 4 horas. Adicionar 0.3 g de clorito de sodio y 2 gotas de ácido acético. Repetir la adición de clorito de sodio y ácido acético cada hora 2 veces más. Enfriar la muestra en agua con hielo. Filtrar en un embudo buchner al vacío con papel filtro # 40 (Whatman). Lavar con 100 agua destilada fría y 10 mL de acetona. Secar las muestras a 40 °C, durante 3 días, pesar hasta peso constante en desecador. El contenido de holocelulosas se calculó dividiendo el peso de la muestra entre el peso de la harina libre de extraíbles referido porcentualmente (Ecuación 2) (Wise *et al.*, 1946).

$$\text{Holocelulosas} = \frac{\text{peso de la muestra (lignina extraída)}}{\text{peso de la harina libre de extraíbles}} * 100 \quad \text{Ecuación 2}$$



Determinación de lignina

Finalmente, para calcular el contenido de lignina se siguieron los siguientes pasos: Pesar 1 g de la muestra de harina libre de extraíbles a un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Agregar removiendo lentamente 50 mL de ácido sulfúrico (72 %) frío (12-15 °C) (para preparar el ácido sulfúrico vaciar lentamente y agitando continuamente 73.096 mL de ácido sulfúrico al 98.5% en un matraz con 26.904 mL de agua destilada y aforar a 100 mL). Mezclar la muestra con el ácido vigorosamente durante un minuto. Dejar reposar dos horas a una temperatura de 18-20°C en un baño de agua. Agregar 200 mL de agua destilada. Llevar a ebullición por 5 minutos. Después de dejar que el material insoluble se precipite, filtrar en un crisol Gooch previamente secado a 100-105 °C y pesado en un frasco de vidrio con tapa (pesa filtro). Lavar el residuo libre de ácido con 500 mL de agua caliente y secar el crisol y su contenido en horno durante dos horas a 103 °C. Colocar el crisol en el pesa filtros y enfriar en un desecador. Aflojar la tapa del pesa filtros y pesar el contenido del crisol como lignina. Repetir el secado y pesado hasta llegar a peso constante. El contenido de lignina se calculó dividiendo el peso de la muestra entre el peso de la muestra libre de extraíbles referida porcentualmente (Ecuación 3) (Runkel y Witt, 1953).

$$Lignina = \frac{\text{peso de la muestra (holocelulosas extraídas)}}{\text{peso de harina libre de extraíbles}} * 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

Determinación del porcentaje de despolimerización

Se filtró al vacío la fracción sólida de LIREPATO contenida en los matraces al final de los 30 días de incubación, con embudo de filtración y papel filtro (cesta para café comercial); se secó en horno (Terlab) a 65 °C hasta peso constante; se calculó el porcentaje de despolimerización de la lignina por la pérdida de masa de las muestras (Ecuación 4):

$$\% DP = 100 \times \frac{(W_i - W_f)}{W_i} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde:

% DP: Porcentaje de despolimerización de la lignina



W_i : Peso seco inicial de la lignina

W_f : Peso seco de la lignina al final del tratamiento

Determinación de la actividad enzimática

Las muestras de LIREPATO se centrifugaron a 8000 rpm a 4°C por 15 minutos (Hettich Universal 320R), se utilizó el sobrenadante para determinar la actividad de la Lac, LiP y MnP, que se expresó en unidades enzimáticas por litro ($U L^{-1}$) que representan $1 \mu\text{mol}$ de producto oxidado por minuto:

$$U L^{-1} = \frac{(\Delta A)(V_t)(F_d)(10^6)}{(t)(\varepsilon)(d)(V_m)} \quad \text{Ecuación 5}$$

Dónde:

U = actividad enzimática ($\mu\text{mol min}^{-1} L^{-1}$)

ΔA = Absorbancia final – Absorbancia inicial

V_t = Volumen total de la reacción (mL)

t = Tiempo de la reacción (min)

ε = Coeficiente de extinción molar ($M^{-1} \text{cm}^{-1}$) o bien ($\text{mol L}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

d = Trayectoria óptica (1 cm)

V_m = Volumen de la muestra (mL)

F_d = Factor de dilución

10^6 = Factor de corrección ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)

Lacasa

Se determinó en espectrofotómetro (HachDR 2500) mediante la oxidación del ácido 2,2'-acino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS) a 420 nm, 25 °C, con un coeficiente de extinción molar de $\varepsilon_{420} = 36000 M^{-1} \text{cm}^{-1}$, se preparó una mezcla de reacción con 2.4 mL de buffer acetato de sodio 25 mM, pH 3.0 (Meyer), 300 μL de ABTS 10 mM (Sigma) y 300 μL de la muestra de cada hongo en caldo LIREPATO, la oxidación del ABTS se apreció cualitativamente con el vire de color a verdoso de la mezcla de reacción (Ibrahim *et al.*, 2012).

Lignina peroxidasa

La LiP se determinó en espectrofotómetro (UV-Vis Thermo Scientific Evolution 60S) mediante la oxidación de alcohol veratrílico a veratrilaldehído a 310 nm, 25 °C y coeficiente de extinción molar de $\varepsilon_{310} = 9300 M^{-1} \text{cm}^{-1}$. Se preparó la mezcla de la reacción con 2.5 mL de buffer tartrato de sodio 100 mM, pH 3.0 (Meyer), 1 mL de alcohol



veratrílico 10 mM (Sigma), 400 μ L de la muestra centrifugada y se inició la reacción con la adición de 100 μ L de H_2O_2 10 mM (Gao *et al.*, 2011).

Manganeso peroxidasa

La MnP se determinó en espectrofotómetro (UV-Vis Thermo Scientific Evolution 60S) por la formación de tartrato Mn^{+3} a 240 nm, 25° C y un coeficiente de extinción molar del $\epsilon_{240} = 6500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Se preparó la mezcla de reacción con 3.4 mL de buffer malonato de sodio 50 mM, pH 4.5 (Sigma), 0.1 mL de MnSO_4 15 mM (Meyer), 400 μ L de la muestra centrifugada y se inició la reacción con la adición de 0.1 mL de H_2O_2 10 mM (Gao *et al.*, 2011).

Las soluciones se prepararon utilizando la ecuación de Henderson-Hasselbach (Ecuación 6), la cual se despeja a continuación:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log[\text{sal}]/[\text{ácido}] \quad \text{Ecuación 6}$$

Despeje:

$$\log [\text{sal}]/[\text{Acido}] = \text{pH}-\text{pKa}$$

$$[\text{sal}]/[\text{ácido}] = \text{antilog} (\text{pKa}-\text{pH})$$

$$[\text{sal}] = \text{antilog} (\text{pKa}-\text{pH}) * [\text{ácido}] \quad \text{Ecuación 7}$$

$$[\text{M}] = [\text{sal}] + [\text{ácido}]$$

Sustituyendo 4 en 5

$$[\text{M}] = \text{antilog} (\text{pKa}-\text{pH}) [\text{ácido}] + [\text{ácido}]$$

$$[\text{ácido}] = [\text{M}] / (1 + \text{antilog} (\text{pKa}-\text{pH})) \quad \text{Ecuación 8}$$

Identificación de productos de despolimerización de la lignina residual de paja de trigo

Identificación de aromáticos

Se cuantificó e identificó los aromáticos productos de la despolimerización de la LIREPATO (Wu *et al.*, 1987). Para extraer los aromáticos se tomó 5 mL del sobrenadante de caldo LIREPATO centrifugado a 8000 rpm por 15 minutos. Se acidificó a pH 1-2 con HCl (Baker) concentrado, se adicionó NaCl a saturación y 5.0 mL de acetato de etilo (Sigma) concentrado, se golpeó ligeramente para separar las fases y se extrajo la muestra con micropipeta. Se colocaron los extractos en un baño de hielo para después



llevar a temperatura ambiente antes de inyectar en el cromatógrafo de gases (Varian CP-3800). Se usó como patrones una mezcla estándar de los ácidos *p*-hidroxibenzoico, vanilínico, ferúlico y sirínico, así como de vainillina y guayacol (Sigma) en concentración de 1.0 mg mL⁻¹ disueltos en acetato de etilo.

El cromatógrafo de gases funcionó con una columna capilar (Agilent) DB-5 (fenil metil polisiloxano) (Longitud 30 m x 0.53 diámetro mm Film 0.5 µm), el gas acarreador nitrógeno se mantuvo con un flujo de 15 mL min⁻¹. La temperatura del inyector fue de 270 °C, de la columna inicial de 70 °C y final de 240 °C (incremento de 20° C/min) y del detector FID de 300 °C. Se inyectó 3 µL de muestra.

Identificación de ácidos grasos

Se determinaron los ácidos grasos producto de la despolimerización de la LIREPATO (Hernández-Berriel *et al.*, 2010) en cromatógrafo de gases (VARIAN CP 3800). Para ello se inyectó en el cromatógrafo 3 µL con jeringa para líquidos de 5 µL.

Se usó como patrones una mezcla estándar de los ácidos acético, propiónico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico, caproico (Baker) en concentración de 0.05 mL mL⁻¹ (Sigma). Para ello se preparó una solución patrón de 5 mL de cada uno de los ácidos disueltos en 10 mL de metanol, posteriormente se realizaron diluciones 1:10, 1:20, 1:40 y 1:100 para construir la curva de calibración de cada uno de los ácidos.

El cromatógrafo de gases funcionó con una columna capilar (Agilent) DB-FFAP (Longitud 60 m x 0.53 diámetro mm Film 1 µm), el gas acarreador nitrógeno se mantuvo con un flujo de 15 mL min⁻¹. La temperatura del horno fue de 200°C, del inyector inicial de 120°C y final de 200°C (incremento de 10° C/min) y del detector FID de 250 °C. Se inyectó 1 µL de muestra.

Conversión de la lignina despolimerizada en metano

Para analizar la conversión de los productos de despolimerización en biogás se realizaron pruebas en botellas metanogénicas alimentadas con la fracción LIREPATO digerida por los ascomicetos.

Las muestras consistieron en el remanente sólido y el líquido de la LIREPATO degradado por ascomicetos durante una semana de cultivo con alta producción de ácidos



grasos de cadena corta. La producción de biogás de estos fue comparada con la de LIREPATO sin despolimerizar, paja de trigo, paja de alfalfa (control positivo) y un control negativo únicamente con inóculo. Para cada botella de prueba se mezcló 1 g de muestra con 99 mL de inóculo metanogénico, el que se preparó con 46.82 mL de agua destilada, más 18.73 mL de solución Buffer (preparada con g L⁻¹ NaHCO₃ 35 y (NH₄)HCO₃ 4), más 18.73 mL de solución de macroelementos (preparada con g L⁻¹ Na₂HPO₄ 5.7, KH₂PO₄ 6.2, MgSO₄·7H₂O 0.6), más 0.009 mL de solución de microelementos (preparada con g 100 mL⁻¹: CaCl₂·2H₂O 13.2, MnCl₂·4H₂O 10, CoCl₂·6H₂O 1.0, FeCl₂·6H₂O 0.8), más 0.17 mL de solución de resarzurina (resarzurina polvo 100 mg L⁻¹), más 5.619 mL de solución reductora (preparada con g L⁻¹ cisteína HCL 6.25, Na₂S·9H₂O 6.25 y NaOH 1N 40 mL) más 10 mL de inóculo metanogénico (el que se obtuvo de jugo ruminal de vacas alimentadas con forraje, filtrado con una tela de porosidad ≤1 mm; se conservó en baño María a 39 °C y se gaseó con CO₂ constante hasta la inoculación).

Una vez inoculados los frascos fueron herméticamente sellados con tapón de goma y se incubaron a 39 °C. Se realizó la medición del biogás generado con aguja acoplada al manómetro digital (Pressure Meter Sunshine Instruments PS-9302). Las lecturas se hicieron en PSI (0.07031 kg cm⁻²) a las 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 42, 52, 62 y 72 h de incubación.

Se cuantificó el CH₄ generado por cromatografía de gases (Varian CP 3800), se realizó la curva de calibración con inyecciones de 2.5, 5.0, 7.5, 10, 20 y 30 µL de CH₄ extra seco (INFRA). El cromatógrafo de gases funcionó con una columna empacada HAYESEP Q 80-100 de acero inoxidable (2.0 m x 2.0 mm), el gas acarreador se mantuvo con un flujo de 35.0 ml min⁻¹. La temperatura del horno, inyector y detector FID fueron de 90, 200 y 210 °C, respectivamente (Hernández-Berriel *et al.*, 2010).

Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente aleatorio, con tres réplicas por tratamiento. Los datos experimentales se validaron con la prueba Tukey con un nivel de significancia $\alpha=0.05$ mediante el programa JMP 8.0 (SAS®).



11.2. Resultados y discusión

Porcentaje de despolimerización

Para la selección de ascomicetos eficientes en la despolimerización de LIREPATO, se probaron cuatro cepas terrestres y cuatro de acuáticos, de las cuales se analizó su porcentaje de despolimerización y su actividad Lac, LiP y MnP.

El ascomiceto terrestre que mostró la mayor capacidad de despolimerización de LIREPATO fue AT2 con un rendimiento de 45 % después de 35 días de incubación en concentración de 10 g L⁻¹ de LIREPATO. Los ascomicetos acuáticos con mayor capacidad de despolimerización fueron AA2, AA4 con valores de 38 y 46 % estadísticamente superior al resto (Figura 10). Estas cepas fueron posteriormente identificadas genéticamente como *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus tubigensis*. Con base a este experimento se encontró que no existe diferencia estadísticamente significativa en la capacidad de despolimerización de la LIREPATO entre estos ascomicetos acuáticos al compararlos con los terrestres, bajo las mismas condiciones de cultivo.

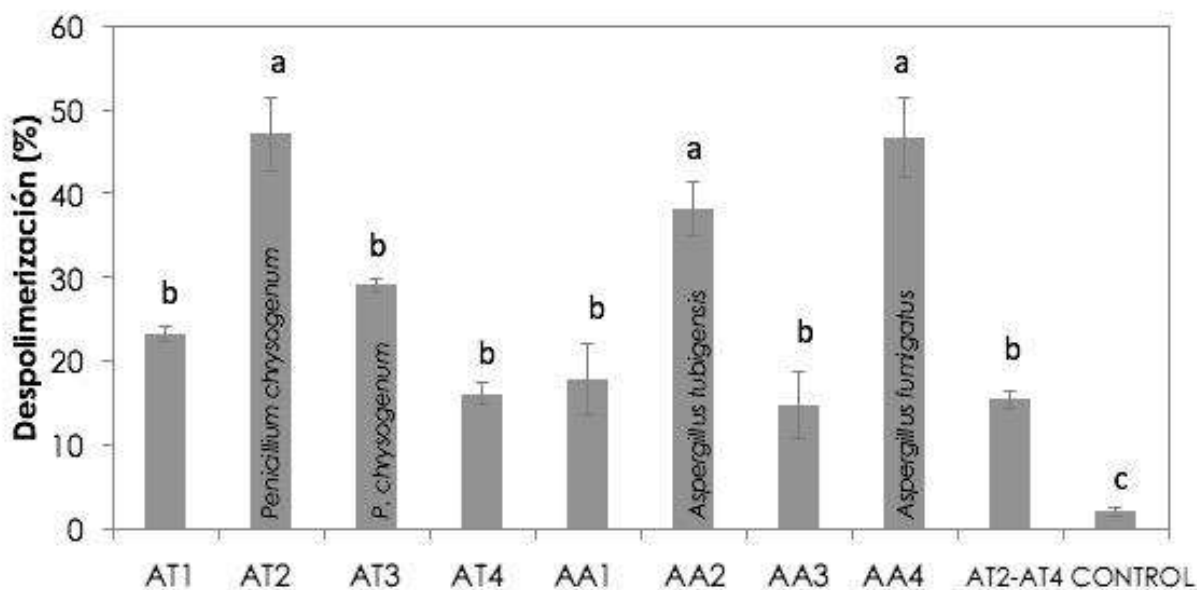


Figura 10. Porcentaje de despolimerización de 10 g L⁻¹ de lignina residual de paja de trigo por ascomicetos en 35 días de cultivo. Las líneas corresponden a la desviación estándar de tres mediciones, las letras indican diferencia significativa ($\alpha=0.05$, Tukey).



Se corroboró que el pH debe mantenerse cercano a 5.5, lo que es importante para lograr un alto porcentaje de despolimerización, sin embargo, los hongos alcalinizan el medio de cultivo a corto plazo. Por lo anterior se modificó al balance de las sales fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4) y dibásico de potasio (K_2HPO_4) con base a la ecuación de Henderson-Hasselbach para tener un amortiguamiento de pH en el rango ácido. Lo anterior se comprobó experimentalmente y se logró mantener el pH del medio constante en 7-9 días, en lugar de 1-3.

La capacidad de despolimerización de LIREPATO por *P. Chrysogenum* y *A. fumigatus* fue similar o superior a lo reportado en investigaciones previas con basidiomicetos en un periodo de tiempo relativamente corto de 28 días, por ejemplo el porcentaje de despolimerización en *Phlebia brevispora* fue de 30 % en 30 días de cultivo con 20 g L⁻¹ de paja de trigo + 25 mL de extracto de malta 0.05% (Arora y Sharma, 2009), en *P. chrysosporium* del 30 % en 21 días con 20 g L⁻¹ de LIREPATO + 25 mL de extracto de malta 0.05 % (Singh *et al.*, 2011), en *T. versicolor* del 46 % en 21 días de cultivo con 2 g L⁻¹ de paja de trigo + 40 g L⁻¹ de glucosa (Salvachúa *et al.*, 2011). Tras lo anterior es posible afirmar que los ascomicetos son una opción viable en la degradación de lignina residual de paja de trigo, potencial que puede usarse para la obtención de metabolitos intermediarios y fuentes alternativas energía.

Actividad enzimática

Los hongos con un alto porcentaje de despolimerización también presentaron una actividad enzimática alta. *P. chrysogenum* AT2 indujo la Lac desde el día siete con 111 U L⁻¹, los otros ascomicetos terrestres también la sintetizaron, pero con valores menores (Figura 11) En tanto que sólo *A. tubigenis* AA4 generó la LiP desde la semana dos con un valor máximo de 21.9 U L⁻¹ a los 21 días de incubación. Las cepas de *Aspergillus* y *Penicillium* sintetizaron la MnP con un tiempo de inducción de una semana. Los resultados indican que existe una relación directa entre el porcentaje de despolimerización y la actividad Lac.

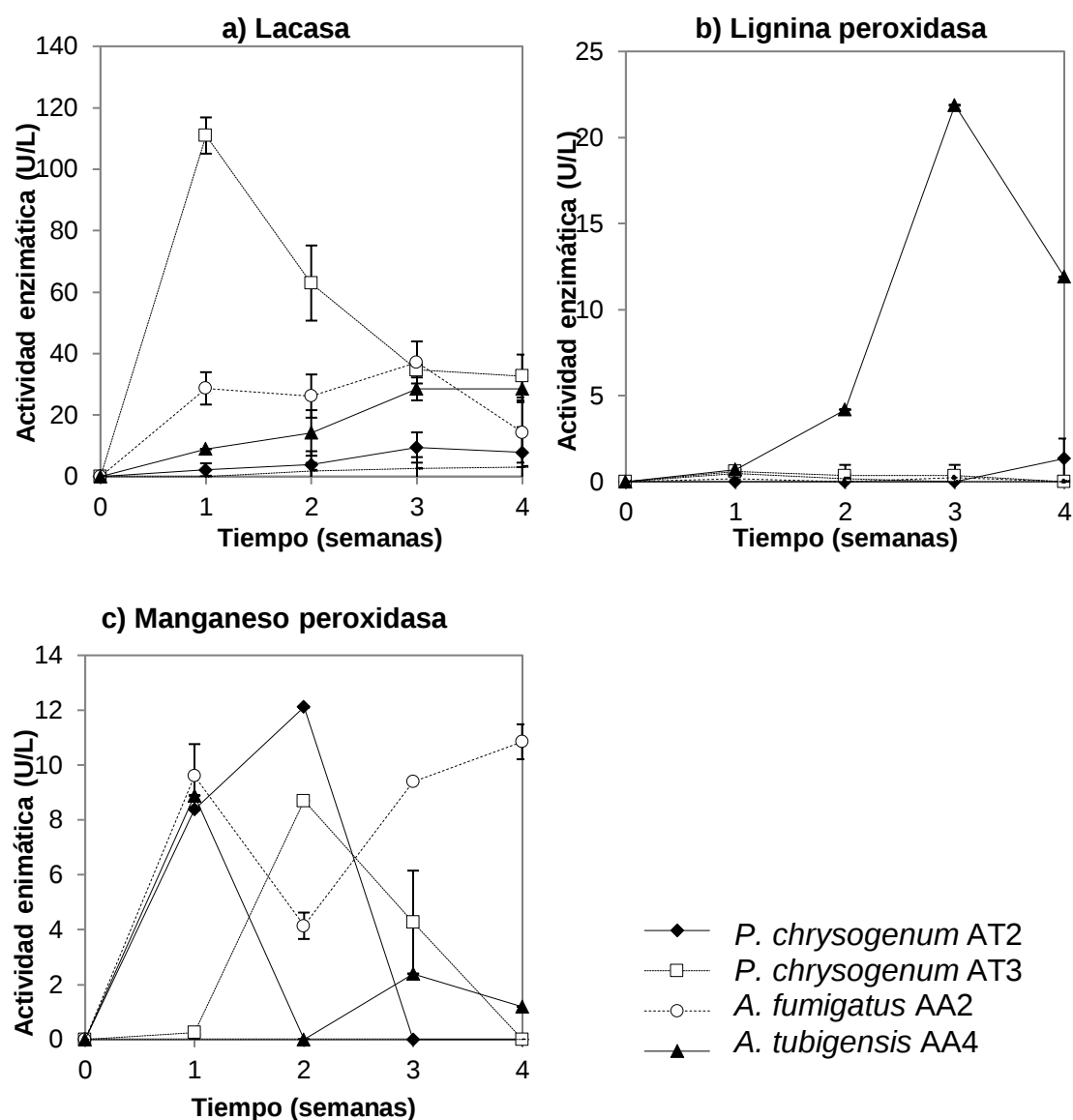


Figura 11. Cinética de la actividad enzimática de *Aspergillus* y *Penicillium* spp en la despolimerización de lignina residual de paja de trigo 10 g L^{-1} en 28 días. Las líneas verticales corresponden a la desviación estándar de tres mediciones.

La actividad Lac en *Aspergillus* y *Penicillium* spp fue elevada e inducida en un tiempo promedio de siete días, lo cual es considerablemente menor comparada con los basidiomicetos en los que se reporta en promedio a los 14 días (Salvachúa *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2011; Zeng *et al.*, 2006), los cuáles requieren además de la suplementación de una fuente de carbono adicional al medio de cultivo para que sea inducida.



Contenido de lignina y holocelulosas

Para determinar cómo se modifica el contenido de lignina durante el proceso de despolimerización, se caracterizaron materiales utilizados en distintas etapas del proceso experimental. Por espectrofotometría de infrarrojo (Figura 12) se determinó que existe una importante reducción de los grupos aromáticos existentes en la LIREPATO al despolimerizarla con *Aspergillus* y *Penicillium* spp. También se encontró que el tratamiento ácido-térmico al que se somete la LIREPATO previo a su despolimerización disminuyó la presencia de los grupos funcionales existentes en la celulosa y las hemicelulosas, sin alterar la estructura de los aromáticos.

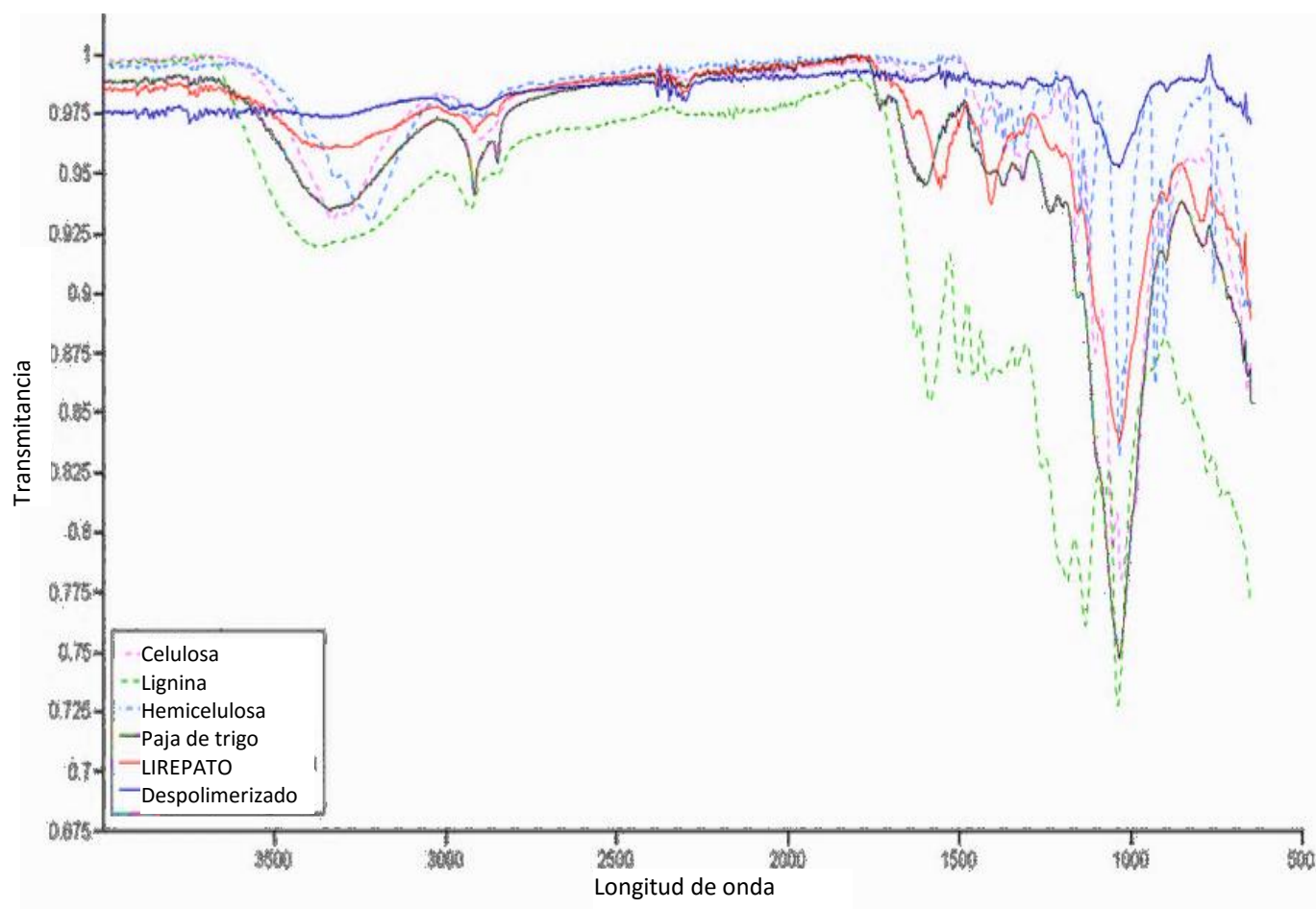


Figura 12. Espectros IR en un rango de longitud de onda entre 600 y 4000 cm^{-1} de grupos funcionales en la degradación de LIREPATO 10 g L^{-1} , tras 28 días de despolimerización por *Aspergillus fumigatus*.



Se analizó el contenido de lignina, holocelulosas (celulosas y hemicelulosas) y cenizas, en la LIREPATO (Figura 13). La paja de trigo tuvo un contenido de lignina del 21 % cercano a lo mencionado en la literatura del 18 % (Xu *et al.*, 2006). En la muestra de LIREPATO tras el tratamiento ácido-térmico el contenido de lignina incrementa a un 50 %. El contenido de holocelulosas en la LIREPATO disminuyó de un 67 a un 33 %.

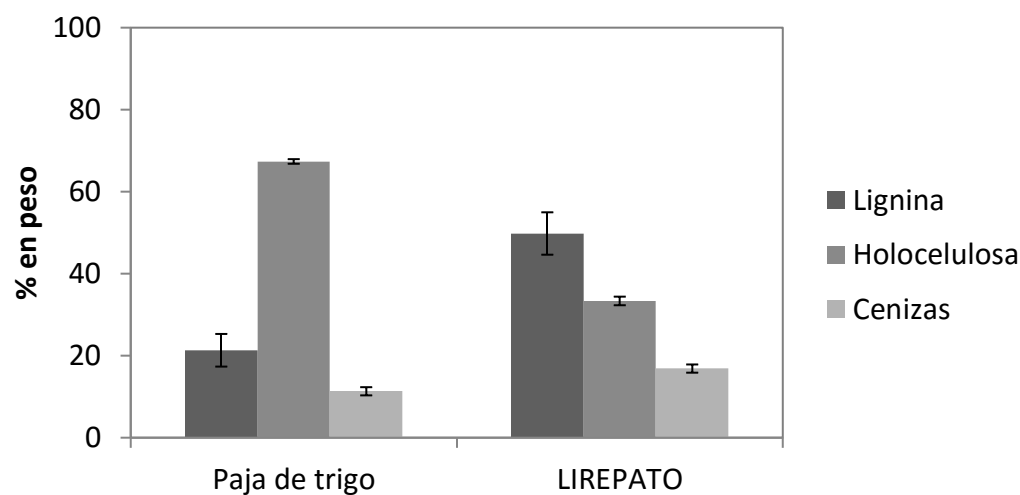


Figura 13. Caracterización del contenido de lignina y holocelulosas en paja de trigo sometida a tratamiento ácido-térmico. Las pruebas se hicieron por triplicado.

En cuanto a la LIREPATO sometida a proceso de despolimerización con ascomicetos (Figura 14). después de 28 días el 34 % de la lignina es degradada, mientras que las celulosas y hemicelulosas son consumidas totalmente por los ascomicetos.

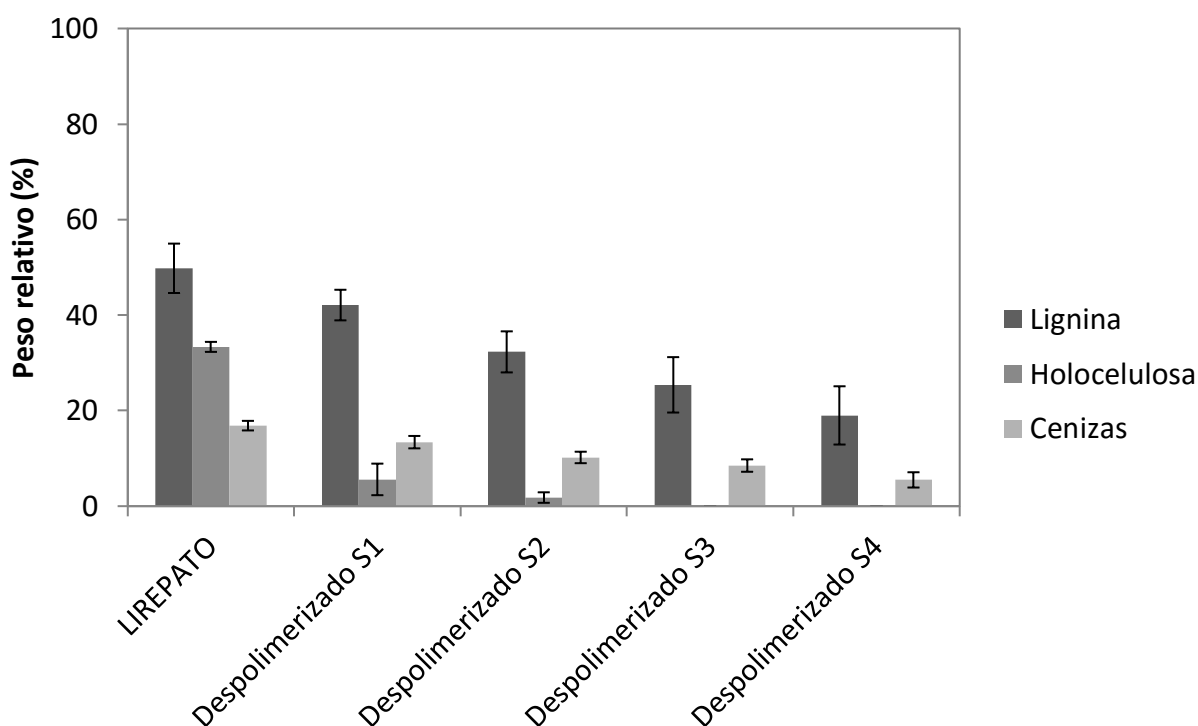


Figura 14. Despolimerización de la lignina y holocelulosas en muestra de LIREPATO por *Aspergillus fumigatus* en cuatro semanas de cultivo. Las líneas verticales corresponden a la desviación estándar de tres mediciones.

Análisis de la despolimerización de distintas concentraciones de LIREPATO

Se determinó el porcentaje de despolimerización para determinar la conversión de LIREPATO en aromáticos, ácidos grasos y biomasa fúngica. El HML que produjo el mayor porcentaje de despolimerización fue *P. chrysogenum* AT4 con hasta 32 % en la concentración de 20 g L⁻¹ de LIREPATO tras 4 semanas de cultivo, pero estadísticamente no hubo diferencia significativa con *A. fumigatus* AA4 con 26 % en la misma concentración. Se observó que un efecto inhibitorio de la despolimerización de *A. fumigatus* AA4 en la concentración de 50 g L⁻¹ de LIREPATO con un 21 %. (Figura 15).

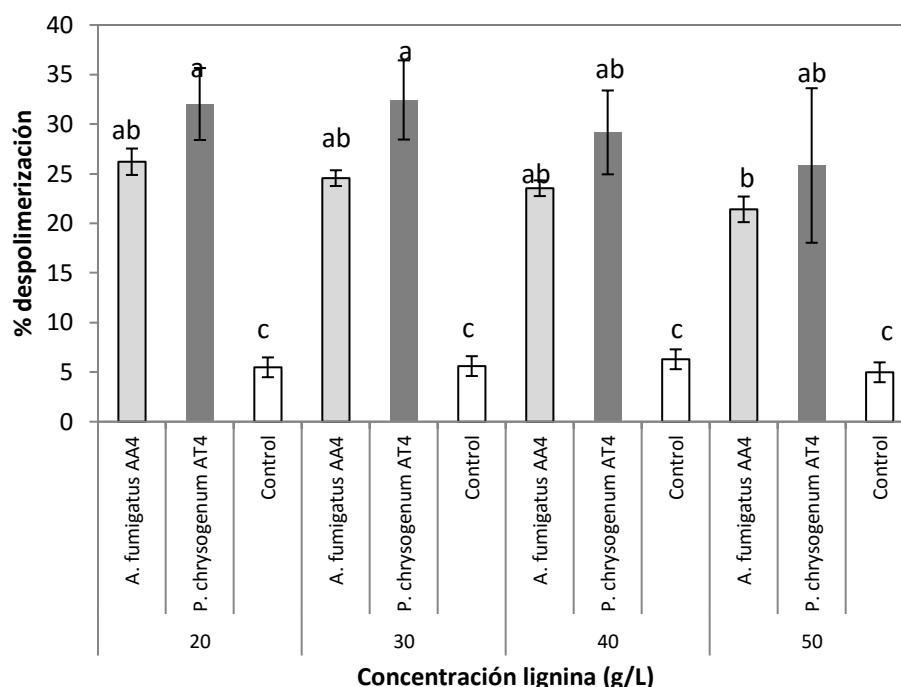


Figura 15. Porcentaje de despolimerización por *Aspergillus fumigatus* AA4 y *Penicillium chrysogenum* AT4 en 28 días de crecimiento en distintas concentraciones de LIREPATO 20, 30, 40 y 50 g L⁻¹. Las líneas verticales corresponden a la desviación estándar de tres mediciones. Las letras indican diferencia estadísticamente significativa ($\alpha=0.05$, Tukey).

Aspergillus y *Penicillium* spp degradaron concentraciones de 10 hasta 30 g L⁻¹, lo que fue relativamente alto sin necesidad de añadir una fuente adicional de carbono, lo anterior es destacable ya que diversos autores consideran que el medio de cultivo debe enriquecerse con glucosa u otra azúcar simple al medio de cultivo para inducir la actividad Lac u otras enzimas ligninolíticas.



Análisis de la producción de aromáticos en distintas concentraciones de LIREPATO

En el análisis de la producción acumulada de aromáticos durante 4 semanas de crecimiento en la despolimerización de LIREPATO (Figura 16) se observó que *P. chrysogenum* AT2 tuvo la mayor producción de aromáticos, seguido por *P. chrysogenum* AT3 que fue la única cepa que generó los 6 tipos de aromáticos durante la cinética de degradación. Los aromáticos que se produjeron en mayor proporción fueron el ácido ferúlico y el siríngico.

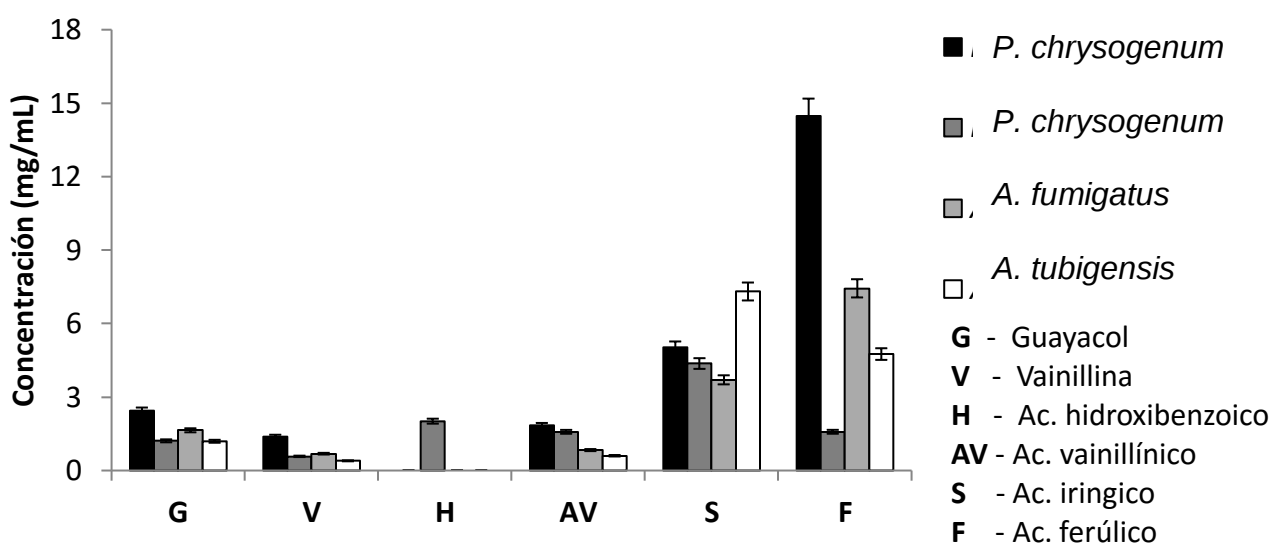


Figura 16. Producción total acumulada de aromáticos en 28 días por *Penicillium* y *Aspergillus* spp en la despolimerización de 10 g L⁻¹ de LIREPATO. Las pruebas se hicieron por triplicado.

La producción de aromáticos fue variable a lo largo del experimento, pero registrándose su producción máxima a los 14 días de crecimiento (Figura 17). Los aromáticos que se produjeron en mayor abundancia fueron el siríngico con 5200 mg L⁻¹ en la semana 1 de la concentración de 20 mg L⁻¹ de LIREPATO, el ferúlico con 6800 mg L⁻¹ en la concentración de 40 mg L⁻¹ y el vainillínico con 6900 mg L⁻¹ en la concentración de 50 mg L⁻¹ por *A. fumigatus*.

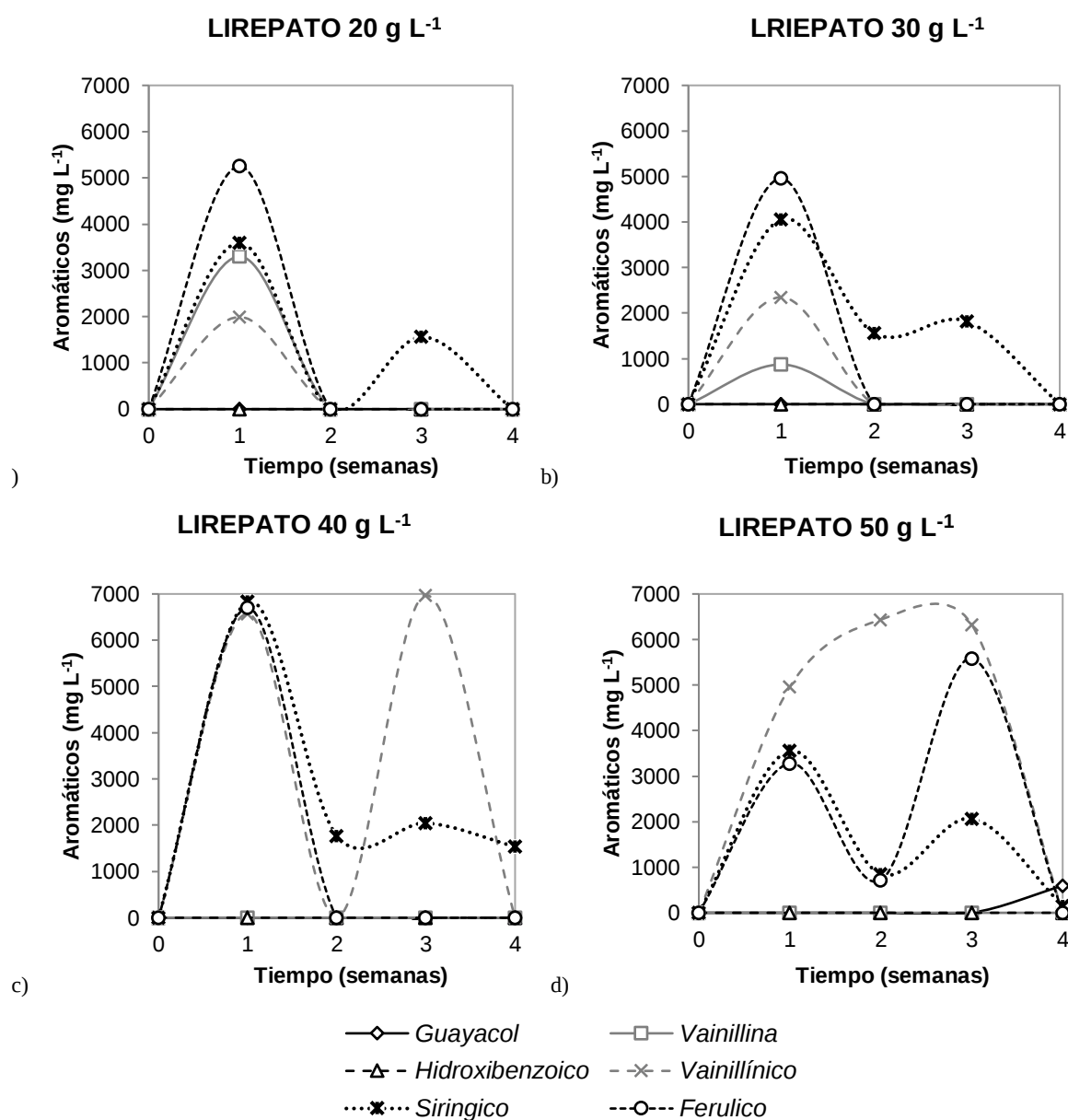


Figura 17. *Aspergillus fumigatus* en la cinética de producción de ácidos grasos por la despolimerización de distintas concentraciones de LIREPATO en 28 días de cultivo.

En general, la obtención de aromáticos se ha estudiado principalmente a partir de lignina pura procedente de procesos Kraft, mientras que de pajas agrícolas existen solo algunos reportes pero sin un tratamiento previo de purificación para eliminar la celulosa y las hemicelulosas. Por ejemplo, Lesage-Meessen *et al.* (2002) utilizó *Pycnopus*



cinnabarinus en rastrojo de maíz y 20 g L⁻¹ de maltosa produjeron 0.767 mg mL⁻¹ de vainillina en 8 días de cultivo; Granda *et al.* (2005) emplearon *Lentinus crinitus* en la degradación de 5 g de residuo de hoja de *Musa paradisiaca* (plátano) y generaron ácido ferúlico, vainillina, ácido vainillínico y eugenol en concentración de 0.6, 0.04, 0.6 y 254 mg mL⁻¹. Los datos muestran que una vez que se han extraído la celulosa y las hemicelulosas de la paja de trigo, es posible aprovechar el remanente residual en la obtención de compuestos de valor industrial, como los aromáticos.

Análisis de la producción de ácidos grasos de cadena corta

El ácido graso de cadena corta que se produjo en mayor concentración fue el acético (Figura 18). En la cinética de producción de ácido acético por los ascomicetos en las concentraciones de 20 y 30 g L⁻¹ de LIREPATO se observó una dinámica diaúxica, lo que puede explicarse a que su generación procede de dos fases diferentes en la disponibilidad de las fuentes de carbono, en el primer pico que corresponde a la primer semana, *Aspergillus* aprovecha los remanentes de la celulosa y las hemicelulosas así como las fracciones de aromáticos que se liberaron por el tratamiento ácido-térmico de la LIREPATO; mientras que el segundo pico de ácido acético corresponde a la liberación y oxidación de aromáticos consecuencia de la actividad enzimática ligninolítica.

La mayor producción de ácidos grasos de cadena corta ocurrió en los primeros siete días de crecimiento, *A. fumigatus* fue el ascomiceto que produjo los siete ácidos grasos analizados: acético, propiónico, butírico, isobutírico, valérico, isovalérico, caproico. El de mayor abundancia fue el acético con 2805 mg L⁻¹ a los siete días en la concentración de 20 g L⁻¹ de LIREPATO. Las concentraciones de 30, 40 y 50 g L⁻¹ de LIREPATO tuvieron menor producción de ácidos grasos de cadena corta. Los resultados indican que concentraciones superiores a 40 g L⁻¹ de LIREPATO tienen un efecto negativo en la generación de ácidos grasos de cadena corta, a partir de la segunda semana de cultivo.

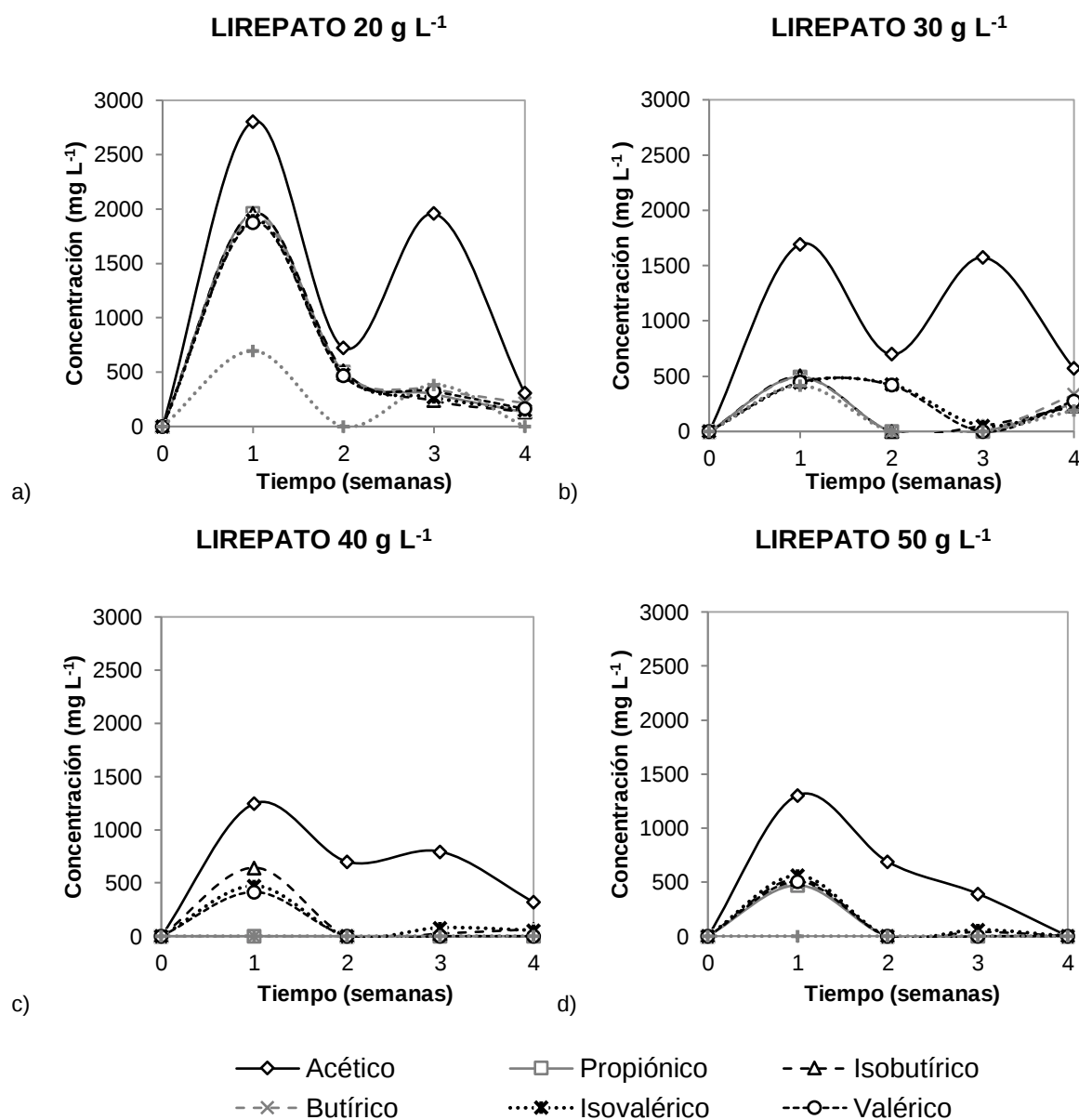


Figura 18. Cinética de producción de ácidos grasos por la despolimerización durante 28 días de distintas concentraciones de lignina residual de paja de trigo (LIREPATO) por *Aspergillus fumigatus*. Las pruebas se hicieron por triplicado

En la dinámica de generación de ácidos grasos de la LIREPATO se registró una diaúxia en la producción de ácido acético, que se observó también en la liberación de aromáticos, con dos picos de producción en la primer y tercer semana de crecimiento para el ácido sirínico y ferúlico en las concentraciones de 20 y 30 g L⁻¹ de LIREPATO,



lo anterior indica que la despolimerización de lignina en aromáticos no es continua sino gradual y que la generación de ácidos grasos de cadena corta ocurre en función de la disponibilidad de monómeros aromáticos en el medio de cultivo.

En las concentraciones de 40 y 50 g L⁻¹ de LIREPATO no hubo una producción importante de ácidos grasos de cadena corta debido a que existe un efecto inhibitorio de la actividad enzimática y por tanto de la liberación de monómeros aromáticos en el medio del cultivo.

Se ha realizado la obtención de ácidos grasos a partir de la degradación química o biológica de residuos agrícolas, pero estos han provenido de la degradación de las celulosas y hemicelulosas, pero no de los aromáticos. Por ejemplo Nigam (2001) utilizó a la levadura *Pichia stipitis* y reportó 2700 mg L⁻¹ de ácido acético a partir de hemicelulosas extraídas de la paja trigo. Thomsen *et al.* (2008) utilizaron paja de trigo bajo tratamiento hidrotérmico en un reactor de 3 etapas y obtuvieron un rendimiento de 3900 mg L⁻¹ de ácido acético y lo reportan como generado a partir de la celulosa y las hemicelulosas. Ahring *et al.* (2015) usaron como sustrato paja de trigo pretratada por explosión con vapor y degradada por bacterias en anaerobiosis con producción de 32001 mg L⁻¹ de ácido butírico, sin explicar si proviene de la celulosa, las hemicelulosas o de los aromáticos.

Aunque en menor concentración que el ácido acético se detectó también propiónico, butírico, isobutírico, valérico e isovalérico en el medio de cultivo, lo cual es un indicio de que la ruta adípica de la ruptura de aromáticos no es la única manera en la que estos son metabolizados.

Generación de biogás a partir de los productos de despolimerización de la LIREPATO

El potencial de generación de biogás fue mayor a las 12 horas en la paja de trigo y en el control positivo paja de alfalfa, mientras que el remanente despolimerizado y la LIREPATO generaron su mayor cantidad de biogás a las 56 horas (Figura 19). Lo anterior puede explicarse a que los materiales residuales que las componen a la LIREPATO son relativamente más resistentes a la degradación biológica.

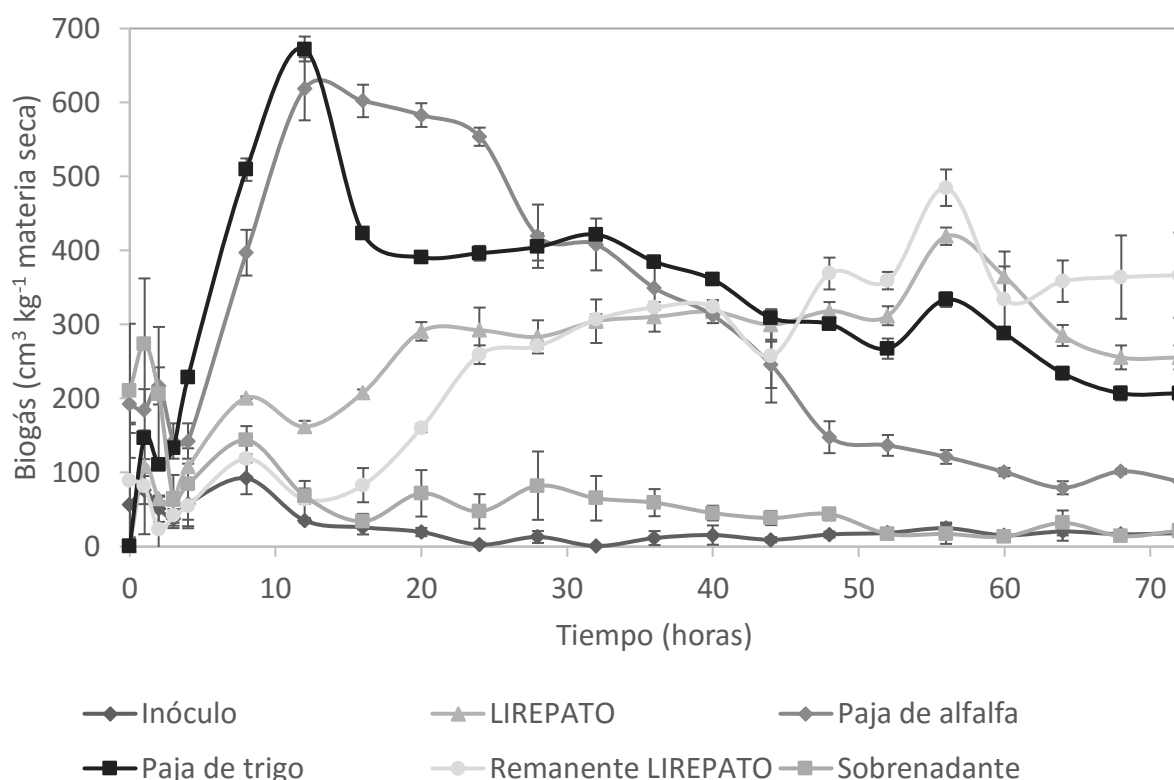


Figura 19. Cinética de producción de biogás por la actividad metanogénica en 72 horas a partir de los productos de despolimerización de LIREPATO y otras fuentes de carbono. Los análisis se hicieron por triplicado.

Al analizar la producción de CH_4 (Figura 20), puede observarse que aunque se produjo menos biogás en el remanente sólido del despolimerizado, comparado con la paja de trigo y el LIREPATO, este género cantidades similares de CH_4 . Lo anterior indica que el tratamiento biológico de despolimerización de la LIREPATO incrementa su potencial para degradarse en CH_4 , lo que permite que material residual se aproveche como fuente alternativa de energía. El remanente líquido que en teoría tiene disueltos los ácidos grasos, tuvo una baja producción acumulada de biogás anterior puede explicarse a que se encontraban diluidos, en concentración menor a $3\,000\text{ mg L}^{-1}$.

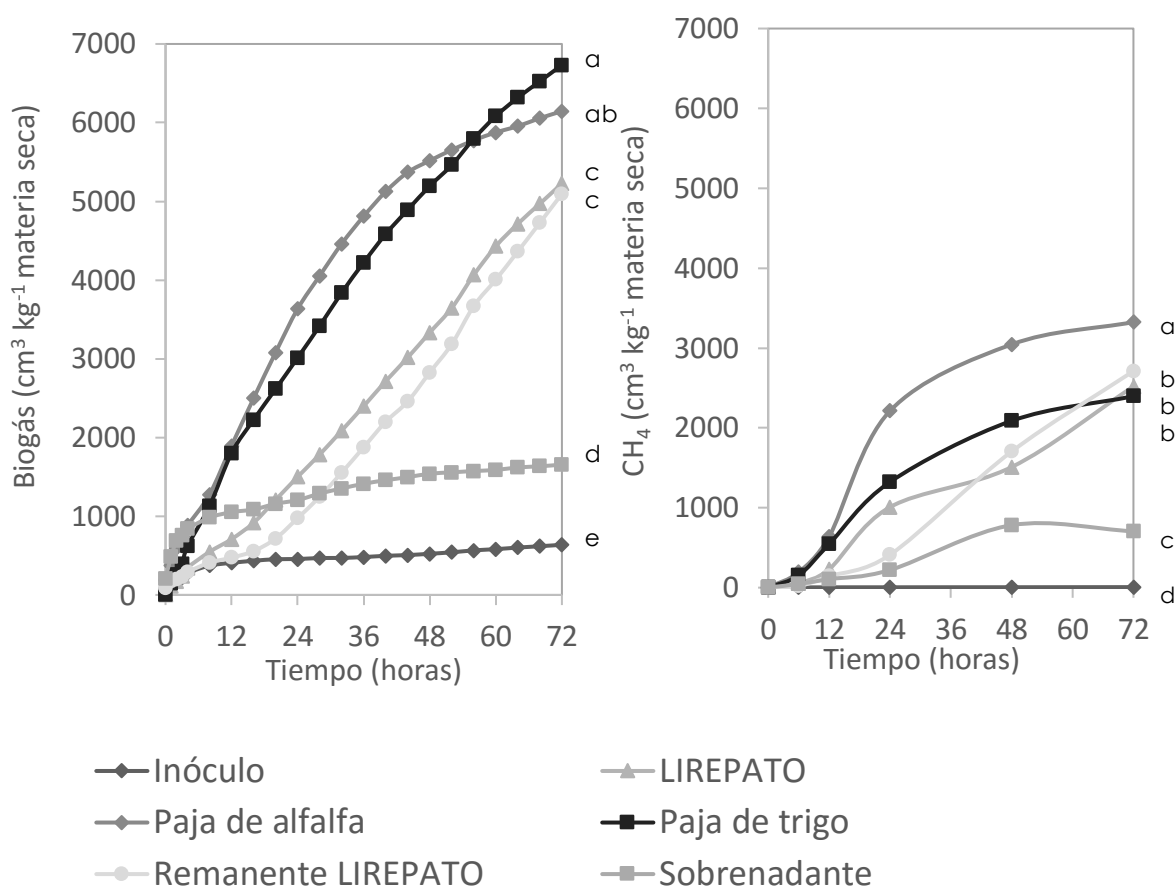


Figura 20. Producción acumulada de biogás y metano por la actividad metanogénica en 72 horas a partir de los productos de despolimerización de LIREPATO y otras fuentes de carbono. Los análisis se hicieron por triplicado. Las letras indican diferencia estadísticamente significativa ($\alpha=0.05$, Tukey).

Se encontró que la LIREPATO puede tener un aprovechamiento como fuente alternativa de energía, al combinar la despolimerización de los hongos mitosporicos con la metanogénesis anaerobia. Esta investigación es un punto de partida para un posible aprovechamiento integral de la LIREPATO, la que es residual de otros procesos de extracción biotecnológicos. Al dirigir el proceso en etapas, es posible obtener compuestos intermediarios de valor agregado como los aromáticos, los ácidos grasos de cadena corta y metano como fuente de energía. Técnicamente es posible escalar este proceso a una nivel industrial, aunque es necesario investigación para abaratar costos de insumos, así como en la purificación de los compuestos de valor biotecnológico.



12. Conclusiones

A partir de los resultados es posible afirmar lo siguiente:

- *Aspergillus* spp y *Penicillium* spp tienen capacidad de despolimerizar la lignina similar o a la de los basidiomicetos, en medio de cultivo sin una fuente de carbono adicional y con un tiempo menor de inducción de la actividad lacasa.
- *Aspergillus* spp y *Penicillium* spp son una opción en el aprovechamiento de la LIREPATO para la biosíntesis de aromáticos y ácidos grasos de cadena corta de valor industrial.
- De la degradación de la LIREPATO se obtuvo una variedad de ácidos grasos, cuya producción fue dependiente de la liberación de aromáticos en el medio de cultivo. La capacidad de despolimerización de los aromáticos tuvo como factor limitante la concentración inicial de la LIREPATO.
- La actividad fúngica provoca una fragmentación de la LIREPATO, lo que facilita que sea aprovechable por bacterias metanogénicas para su conversión en biogás.

Se concluye que es posible aprovechar la fracción remanente y recalcitrante de la LIREPATO, en la generación de compuestos de valor industrial como aromáticos o ácidos grasos de cadena corta y dirigir su conversión hasta CH₄ como fuente alternativa de energía.



13. Literatura Citada

- Ahring, B. K., Biswas, R., Ahamed, A., Teller, P. J., Uellendahl, H. (2015). Making lignin accessible for anaerobic digestion by wet-explosion pretreatment. *Bioresource Technology*, 175, 182-188. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.082>
- Arora, D. S., Sharma, R. K. (2009). Comparative ligninolytic potential of *Phlebia* species and their role in improvement of in vitro digestibility of wheat straw. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 18(1), 151-161.
- Barakat, A., Monlau, F., Steyer, J.-P., Carrere, H. (2012). Effect of lignin-derived and furan compounds found in lignocellulosic hydrolysates on biomethane production. *Bioresource Technology*, 104, 90-99.
- Bonugli-Santos, R. C., Durrant, L. R., Sette, L. D. (2012). The production of ligninolytic enzymes by marine-derived basidiomycetes and their biotechnological potential in the biodegradation of recalcitrant pollutants and the treatment of textile effluents. *Water, Air, & Soil Pollution*, 223(5), 2333-2345.
- Buranov, A. U., Mazza, G. (2008). Lignin in straw of herbaceous crops. *Industrial Crops and Products*, 28(3), 237-259. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.03.008>
- Chakroun, H., Mechichi, T., Martinez, M. J., Dhoub, A., Sayadi, S. (2010). Purification and characterization of a novel laccase from the ascomycete *Trichoderma atroviride*: application on bioremediation of phenolic compounds. *Process Biochemistry*, 45(4), 507-513.
- Chandra, R., Takeuchi, H., Hasegawa, T., Kumar, R. (2012). Improving biodegradability and biogas production of wheat straw substrates using sodium hydroxide and hydrothermal pretreatments. *Energy*, 43(1), 273-282.
- Chang, A., Fan, J., Wen, X. (2012). Screening of fungi capable of highly selective degradation of lignin in rice straw. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 72(0), 26-30.
- Chávez-Sifontes, M., Domine, M. E. (2013). Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 4(4), 15-46.
- Chen, Y., Cheng, J. J., Creamer, K. S. (2008). Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Bioresource Technology*, 99(10), 4044-4064.
- Clark, F. M., Fina, L. R. (1952). The anaerobic decomposition of benzoic acid during methane fermentation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 36(1), 26-32.
- Dashtban, M., Schraft, H., Syed, T. A., Qin, W. (2010). Fungal biodegradation and enzymatic modification. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 1(1), 36-50.
- De Graaf, D., Fendler, R. (2010). Biogas production in Germany. *SPIN Background Paper*, 24.
- Dekker, R. F. H., Barbosa, A. M., Sargent, K. (2002). The effect of lignin-related compounds on the growth and production of laccases by the ascomycete, *Botryosphaeria* sp. *Enzyme and microbial technology*, 30(3), 374-380.
- Durán, N., Ferrer, I., Rodríguez, J. (1987). Ligninases from *Chrysonilia sitophila* (TFB-27441 strain). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 16(1), 157-167.
- El-Mashad, H. M., Zeeman, G., Van Loon, W. K. P., Bot, G. P. A., Lettinga, G. (2004). Effect of temperature and temperature fluctuation on thermophilic anaerobic digestion of cattle manure. *Bioresource Technology*, 95(2), 191-201.
- FAO. (2012). FAOSTAT. from Food and Agriculture Organization of the United Nations <http://faostat.fao.org/>
- Ferraz, A., Durán, N. (1995). Lignin degradation during softwood decaying by the ascomycete *Chrysonilia sitophila*. *Biodegradation*, 6(4), 265-274.



- Gao, H., Wang, Y., Zhang, W., Wang, W., Mu, Z. (2011). Isolation, identification and application in lignin degradation of an ascomycete GHJ-4. *African Journal of Biotechnology*, 10(20), 4166-4174.
- García, C., Montero, G., Coronado, M., Acosta, M. (2013). Potencial energético de la paja de trigo en el Valle de Mexicali. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29, 67-72.
- González, V., Fernández, E. (2011). Tratamientos para incrementar el valor nutritivo de los subproductos agrícolas. Pajas de cereales. *Pastos*, 9(1), 95-100.
- Granda, D., Mejía, A., Jiménez, G. (2005). Utilización de residuos de plátano para la producción de metabolitos secundarios por fermentación en estado sólido con el hongo *Lentinus crinitus*. *Vitae*, 12(2), 13-20.
- Gubernatorova, T. N., Dolgonosov, B. M. (2010). Modeling the biodegradation of multicomponent organic matter in an aquatic environment: 3. Analysis of lignin degradation mechanisms. *Water resources*, 37(3), 332-346.
- Halaburgi, V. M., Sharma, S., Sinha, M., Singh, T. P., Karegoudar, T. B. (2011). Purification and characterization of a thermostable laccase from the ascomycetes *Cladosporium cladosporioides* and its applications. *Process Biochemistry*, 46(5), 1146-1152.
- Harayama, S. (1992). Aerobic Biodegradation of Aromatic Hydrocarbons. *Metal Ions in Biological Systems: Volume 28: Degradation of Environmental Pollutants by Microorganisms and Their Metalloenzymes*, 28, 99.
- Hernández-Berriel, M. C., Mañón-Salas, C., Sánchez-Yáñez, J. M., Lugo-de la Fuente, J., Márquez-Benavides, L. (2010). Influence of recycling different leachate volumes on refuse anaerobic degradation. *The Open Waste Management Journal*, 3(1), 155-166.
- Ibrahim, M., Balakrishnan, R., Shamsudeen, S., Adam, F., Bhawani, S. (2012). A concise review of the natural existence, synthesis, properties, and applications of syringaldehyde. *BioResources*, 7(3), 4377-4399.
- Kaparaju, P., Serrano, M., Angelidaki, I. (2009). Effect of reactor configuration on biogas production from wheat straw hydrolysate. *Bioresource Technology*, 100(24), 6317-6323.
- Kim, S., Dale, B. E. (2004). Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy*, 26(4), 361-375.
- Lesage-Meessen, L., Lomascolo, A., Bonnin, E., Thibault, J.-F., Buleon, A., Roller, M., . . . Asther, M. (2002). A biotechnological process involving filamentous fungi to produce natural crystalline vanillin from maize bran. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 102-103(1-6), 141-153.
- Li, L. J., Wang, Y., Zhang, Q., Li, J. X., Yang, X. G., Jin, J. (2008). Wheat straw burning and its associated impacts on Beijing air quality. *Science in China Series D: Earth Sciences*, 51(3), 403-414. doi:10.1007/s11430-008-0021-8
- Madigan, M. T., Clark, D. P., Stahl, D., Martinko, J. M. (2010). *Brock Biology of Microorganisms 13th edition*: Benjamin Cummings.
- Manyi-Loh, C. E., Mamphweli, S. N., Meyer, E. L., Okoh, A. I., Makaka, G., Simon, M. (2013). Microbial anaerobic digestion (bio-digesters) as an approach to the decontamination of animal wastes in pollution control and the generation of renewable energy. *International journal of environmental research and public health*, 10(9), 4390-4417.
- Martínez, Ruiz-Dueñas, F. J., Guillén, F., Martínez, A. T. (1996). Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *European Journal of Biochemistry*, 237(2), 424-432.
- Martínez, Speranza, M. F., Ruiz-Duenas, F. J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillen, F., . . . del Río, J. C. (2005). Biodegradation of lignocelluloses: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*, 8(3), 195-204.



- Martins, T. M., Hartmann, D. O., Planchon, S., Martins, I., Renaut, J., Silva-Pereira, C. (2015). The old 3-oxoadipate pathway revisited: New insights in the catabolism of aromatics in the saprophytic fungus *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology*, 74, 32-44.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2014.11.002>
- McInerney, M. J., Bryant, M. P., Hespell, R. B., Costerton, J. W. (1981). *Syntrophomonas wolfei* gen. nov. sp. nov., an anaerobic, syntrophic, fatty acid-oxidizing bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 41(4), 1029-1039.
- Montgomery, L. F. R., Bochmann, G. (2014). Pretreatment of feedstock for enhanced biogas production. *IEA Bioenergy*, 1-20.
- Nigam, J. N. (2001). Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *Journal of Biotechnology*, 87(1), 17-27. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00385-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00385-0)
- Nilsson, T., Daniel, G. (1989). Chemistry and microscopy of wood decay by some higher ascomycetes. *Holzforschung-International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood*, 43(1), 11-18.
- Quintero-Núñez, M., Moncada-Aguilar, A. (2008). Contaminación y control de las quemas agrícolas en Imperial, California, y Mexicali, Baja California. *Región y sociedad*, 20(43), 3-24.
- Rochkind, M. L., Blackburn, J. W., Saylor, G. S. (1986). *Microbial Decomposition of Chlorinated Aromatic Compounds*, United States Environmental Protection Agency. Retrieved from
- Rodríguez, J., Ferraz, A., Nogueira, R. F. P., Ferrer, I., Esposito, E., Durán, N. (1997). Lignin biodegradation by the ascomycete *Chrysomya sitophila*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 62(2-3), 233-242.
- Runkel, R. O. H., Witt, H. (1953). Zur Kenntnis des thermoplastischen Verhaltens von Holz. *Holz als Roh- und Werkstoff*, 11(12), 457-461. doi:10.1007/BF02606971
- Salvachúa, D., Prieto, A., López-Abelairas, M., Lu-Chau, T., Martínez, Á. T., Martínez, M. J. (2011). Fungal pretreatment: an alternative in second-generation ethanol from wheat straw. *Bioresource Technology*, 102(16), 7500-7506.
- Sánchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology advances*, 27(2), 185-194.
- Sánchez-Yáñez, J. M. (2007). *Breve Tratado de Microbiología Agrícola Teoría y Práctica* (C. d. I. y. D. d. M. Corporativo de Desarrollo Sustentable, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Secretaria de Desarrollo Rural en Michoacán Ed.). Morelia, Michoacán México: Corporativo de Desarrollo Sustentable, Centro de Investigación y Desarrollo de Michoacán, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Secretaria de Desarrollo Rural en Michoacán.
- Sinegani, A. A. S., Emtiazi, G., Hajrasuliha, S., Shariatmadari, H. (2005). Biodegradation of some agricultural residues by fungi in agitated submerged cultures. *African Journal of Biotechnology*, 4(10).
- Singh, D., Zeng, J., Laskar, D. D., Deobald, L., Hiscox, W. C., Chen, S. (2011). Investigation of wheat straw biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biomass and Bioenergy*, 35(3), 1030-1040.
- Smith, P. H., Mah, R. A. (1966). Kinetics of acetate metabolism during sludge digestion. *Applied microbiology*, 14(3), 368-371.
- Sun, R., Tomkinson, J., Zhu, W., Wang, S. Q. (2000). Delignification of maize stems by peroxy monosulfuric acid, peroxyformic acid, peracetic acid, and hydrogen peroxide. 1. physicochemical and structural characterization of the solubilized lignins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(4), 1253-1262. doi:10.1021/jf990646e
- Talebnia, F., Karakashev, D., Angelidaki, I. (2010). Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology*, 101(13), 4744-4753. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.080>



- Thomsen, M., Thygesen, A., Thomsen, A. B. (2008). Hydrothermal treatment of wheat straw at pilot plant scale using a three-step reactor system aiming at high hemicellulose recovery, high cellulose digestibility and low lignin hydrolysis. *Bioresource Technology*, 99(10), 4221-4228.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.08.054>
- Van Der Meer, J. R., De Vos, W. M., Harayama, S., Zehnder, A. J. (1992). Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiological reviews*, 56(4), 677-694.
- Wise, L. E., Murphy, M., D'Addieco, A. A. (1946). Chlorite holocellulose, its fractionation and bearing on summative wood analysis and on studies on the hemicelluloses. *Paper Trade Journal*, 122(2), 35-42.
- Wu, F. J., Moreno, J., Vela, G. R. (1987). Growth of *Azotobacter vinelandii* on soil nutrients. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(3), 489-494.
- Xu, F., Sun, J.-X., Sun, R., Fowler, P., Baird, M. S. (2006). Comparative study of organosolv lignins from wheat straw. *Industrial Crops and Products*, 23(2), 180-193.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2005.05.008>
- Younes, S. B., Sayadi, S. (2011). Purification and characterization of a novel trimeric and thermotolerant laccase produced from the ascomycete *Scytalidium thermophilum* strain. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 73(1), 35-42.
- Zeng, G., Yu, H., Huang, H., Huang, D., Chen, Y., Huang, G., Li, J. (2006). Laccase activities of a soil fungus *Penicillium simplicissimum* in relation to lignin degradation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(4), 317-324.