



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE  
HIDALGO**

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

“EVALUACION ENZIMATICA DE DIFERENTES CEPAS DE HONGOS  
ASOCIADOS A LA BIODEGRADACION DE LIGNINA CON APLICACIÓN  
AL PROCESO DE BLANQUEO DE LA CELULOSA”

TESIS PRESENTADA POR:

**ROSA MARIA DAMIAN ROBLES**

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS

EN INGENIERÍA QUÍMICA

ASESOR:

**D.C AGUSTÍN JAIME CASTRO MONTOYA**

CO-ASESOR:

**D.C JAIME SAUCEDO LUNA**

ASESOR EXTERNO:

**D.C. GERARDO VAZQUEZ MARRUFO**



**Morelia Michoacán febrero 2018**



## RESUMEN

Se identificaron tres cepas de hongos aisladas de troncos de madera mediante el análisis filogenético de la región de rDNA de ITS como *Trametesversicolor* (CMU-TA01), *Irpexlacteus* (CMU-84/13) y *Phlebiopsis*sp. (CMU-47/13). Se realizó un simple ensayo de fermentación en estado sólido (SSF) para analizar la capacidad de las cepas fúngicas de crecer y blanquear la pulpa Kraft (KP). En SSF conducido sin o con baja concentración (0,5% p / v) de glucosa, las tres cepas blanquearon KP con diferentes grados de eficiencia. El mejor porcentaje de reducción del número de kappa obtenido con *Phlebiopsis*sp. (48,3%), *T. versicolor* (43%) e *Irpexlacteus* (39,3%), lo que demuestra su capacidad para la descomposición de la lignina. Estos porcentajes de reducción del número de kappa de KP son iguales o mejores que los reportados anteriormente para otros hongos de pudrición blanca, y la deslignificación de KP por *Phlebiopsis*sp. se reporta por primera vez. Las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de fibras KP en ensayos de SSF demostraron rugosidad aumentada, estrías, hendiduras y ranuras, mostrando una modificación significativa de la pared celular. En medio líquido suplementado con KP al 0,5% (p / v), el *T. versicolor* produjo los niveles más altos de lacasa extracelular (Lac,  $99,94 \pm 4,58$  U / mL), Manganeseperoxidasa (MnP,  $82,96 \pm 2,99$  U / mL) y lignina-peroxidasa (LiP,  $39,06 \pm 4,66$  U / mL), mientras que *Phlebiopsis*sp. y *I. lacteus* no mostraron actividad Lac y baja LiP. Por lo tanto, la actividad de MnP se asoció fuertemente con la capacidad de deslignificación de las cepas estudiadas.

## Abstract

Three fungal strains isolated from wood logs were identified by phylogenetic analysis of ITS rDNA region as *Trametes versicolor* (CMU-TA01), *Irpexlacteus* (CMU-84/13), and *Phlebiopsis* sp. (CMU-47/13). A simple solid-state fermentation assay (SSF) was implemented to analyze the capability of fungal strains to grow on and bleach kraft pulp (KP). In SSF conducted without or with low concentration (0.5% w/v) of glucose, the three strains bleached KP with different degrees of efficiency. The best percentage kappa number reductions obtained with *Phlebiopsis* sp. (48.3%), *T. versicolor* (43%), and *Irpexlacteus* (39.3%), evidencing their capability for lignin breakdown. These percent kappa number reductions of KP are equal or better than those previously reported for other white-rot fungi, and KP delignification by *Phlebiopsis* sp. is reported for the first time. Scanning electron microscopy (SEM) images of KP fibers in SSF assays demonstrated increased roughness, striation, clefts, and grooves, showing significant cell wall modification. In liquid medium supplemented with 0.5% (w/v) of KP, *T. versicolor* produced the highest levels of extracellular laccase (Lac, 99.94±4.58 U/mL), Manganese-peroxidase (MnP, 82.96±2.99 U/mL), and lignin-peroxidase (LiP, 39.06±4.66 U/mL) activities, whereas *Phlebiopsis* sp. and *I. lacteus* showed no Lac and low LiP activities. Thus, MnP activity was strongly associated with the delignification ability of studied strains.

**Keywords:** white-rot fungi, ligninolytic enzymes, kraft pulp bleaching, *Trametes*, *Phlebiopsis*, *Irpex*.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por darme la oportunidad de llevar a término este proyecto.

A mi Familia, que siempre me han mostrado su apoyo incondicional en cada etapa que emprendo.

A mis Asesores: D.C. Agustín Jaime Castro Montoya por su gran apoyo y aportaciones al desarrollo de este proyecto; al D.C Gerardo Vázquez Marrufo por el impulso por mantener la confianza y claridad en esta investigación, así como ser guía del presente trabajo.

A los Doctores en Ciencias: Ma del Carmen Chávez Parga; Juan Carlos González Hernández y Jaime Saucedo Luna que fungieron como sinodales y en cada avance mostraron sus ideas apoyando al desarrollo del presente proyecto.

Al D.C José Guadalupe Rutiaga Quiñones a la D.C Soledad Vázquez Garcidueñas y a la D.C Virginia Angelica Robinson Fuentes por su colaboración en la definición de este proyecto.

Agradezco al CONACyT por la beca otorgada durante el estudio de Doctorado.

## NOMENCLATURA

SSF Fermentación en estado sólido (SSF)

KP Pulpa de celulosa Kraft

LiP Lignin Peroxidasa

Lac Lacasa

MnP Manganese Peroxidasa

NK Índice de Kappa

# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	5
NOMENCLATURA.....	6
INDICE DE TABLAS.....	8
INDICE DE FIGURAS.....	9
<b>CAPITULO I ANTECEDENTES.....</b>	<b>10</b>
1.1 Características estructurales Pared celular.....	10
1.2 Características estructurales de la lignina.....	12
1.2.1. Enlaces presentes entre los monómeros de la lignina.....	15
1.3 Degradación de material lignocelulósico.....	16
1.4. Mecanismos implicados en la degradación de lignina.....	17
1.4.1. Lacasas.....	18
1.4.2 Manganese Peroxidasas (MnP).....	20
1.4.3 Lignin Peroxidasas(LiP).....	21
1.5. Procesos Químicos para la obtención de celulosa.....	22
1.5.1 Proceso Kraft.....	23
<b>CAPÍTULO II. INTRODUCCION.....</b>	<b>25</b>
2.1 Justificación.....	25
2.2. Hipótesis.....	26
2.3. Objetivo General.....	26
2.4. Objetivos específicos.....	26
<b>CAPÍTULO III. CARACTERIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIGNINOLITICAS EN CEPAS SILVESTRES FUNGICAS UTILIZADAS PARA BLANQUEAR LA PUNPA KRAFT. ....</b>	<b>27</b>
3.1 Introducción.....	27
3.2 Materiales y métodos.....	29
3.2.1 Muestreo y procesamiento de pulpa.....	29
3.2.2. Cepas fúngicas.....	29
3.2.3. Medios Sólidos y Líquidos.....	29
3.2.4. Generación de Inóculos.....	30
3.2.5. Extracción de ADN, ensayos de PCR y secuenciación.....	30
3.2.6. Análisis Filogenético.....	31
3.2.7 Evaluación de diferentes compuestos aromáticos.....	32
3.2.8 Tratamiento y análisis de pulpa Kraft.....	32
3.2.9. Determinación de actividades enzimáticas ligninolíticas extracelulares fúngicas.....	34
3.3 Resultados y discusión.....	35
3.3.1 Análisis Filogenético.....	35
3.3.2 Decoloración / oxidación de compuestos fenólicos por cepas fúngicas.....	39
3.3.3. Modificaciones de pulpa Kraft originadas por las cepas de hongos.....	41

3.3.4. Determinación de actividades enzimáticas ligninolíticas extracelulares fúngicas.....	46
<b>CAPÍTULO IV. ANALISIS DE COMPUESTOS DE DEGRADACION.....</b>	<b>54</b>
4.1 Introducción.....	54
4.2 Metodología.....	55
4.2.1. Evaluación de Extractos enzimáticos sobre Lignina y pulpa Kraft.....	55
4.2.2. Electroforesis Capilar.....	56
4.3. Resultados.....	56
4.3.1. Identificación de compuestos de degradación por medio de Electroforesis capilar	56
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>59</b>
<b>APÉNDICE.....</b>	<b>64</b>
<b>Apéndice A: Cromatogramas de Electroforesis Capilar.....</b>	<b>64</b>
<b>Apéndice B: Publicación de artículo.....</b>	<b>77</b>

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Contenido de celulosa, hemicelulosas y lignina en diferentes biomasas lignocelulósicas en base seca.....	11
Tabla 2. Abundancia de enlaces en lignina de madera.....	15
Tabla 3. Actividad enzimática de los hongos de podredumbre blanca.....	22
Tabla 4. Diseño experimental para blanqueo de pulpa Kraft en bioensayos.....	33
Tabla 5 Numero Kappa de la pulpa Kraft después de tratamientos con cepas de hongos.....	42
Tabla 6 Longitud de la fibra de celulosa después del tratamiento con cepas fúngicas .	44
Tabla 7 Actividad enzimática basal e inducida (U/mL) en las cepas de hongos estudiadas.....	48
Tabla 8. Incrementó en actividades enzimáticas con respecto a actividad basal de los hongos estudiados.....	49
Tabla 9 Tiempo de retención en electroforesis Capilar de estándares.....	57
Tabla 10 Análisis de Muestras en electroforesis Capilar.....	57

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la madera y de la pared de las fibras vegetales, adoptado de Menon y Rao (2012).....	10
Figura 2. Modelo estructural de lignina de maderas suaves. ....	13
Figura 3. Alcoholes precursores de la lignina. ....	14
Figura 4. Unidades que forman la lignina. ....	14
Figura 5. Proporciones de los enlaces entre las unidades de la lignina en maderas suaves y duras.....	16
Figura 6. Ciclo catalítico de lacasa (Lac). ....	19
Figura 7. Ciclo catalítico de la Manganese Peroxidasa (MnP). ....	20
Figura 8. Ciclo catalítico de la Lignin Peroxidasa (LiP).....	21
Figura 9. Proceso Kraft con recuperación de reactivos y energía.....	23
Figura 10. Producción de pasta lignocelulósica anual y aproximación de la lignina recuperable. ....	24
Figura 11. Análisis Filogenético de las cepas estudiadas.....	37
Figura 12. Decoloración / oxidación de compuestos fenólicos por cepas analizadas. ....	40
Figura 13. Blanqueo de la pasta de papel por cepas fúngicas estudiadas.....	41
Figura 14. SEM de secciones de pulpa Kraft tratadas con cepas de hongos estudiadas. ....	46
Figura 15. Actividades enzimáticas en medio Basal PDB.....	47
Figura 16. Actividades enzimáticas inducidas con $\text{CuSO}_4$ .....	51
Figura 17. Actividades enzimáticas inducidas con Celulosa. ....	53

## CAPITULO I ANTECEDENTES

### 1.1 Características estructurales Pared celular.

El CO<sub>2</sub> atmosférico es fijado por los tejidos vegetales a través del complejo fotosintético, constituyendo el paso más importante en la incorporación de carbono inorgánico a los ecosistemas. Parte de este CO<sub>2</sub> es incorporado en las plantas en forma de tejidos de defensa y sostén, constituido mayoritariamente por lignina, celulosa y hemicelulosas. La celulosa es un polisacárido formado por largas cadenas lineales de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos  $\beta$ -(1,4). Las cadenas formadas, unidas entre sí por puentes de hidrógeno, dan lugar a las microfibrillas de celulosa Figura.1. Estas microfibrillas se agregan a su vez mediante puentes de hidrógeno. La composición de la celulosa es semejante en todas las plantas. Las microfibrillas de celulosa se encuentran embebidas en una matriz de polisacárido que constituye la hemicelulosa.

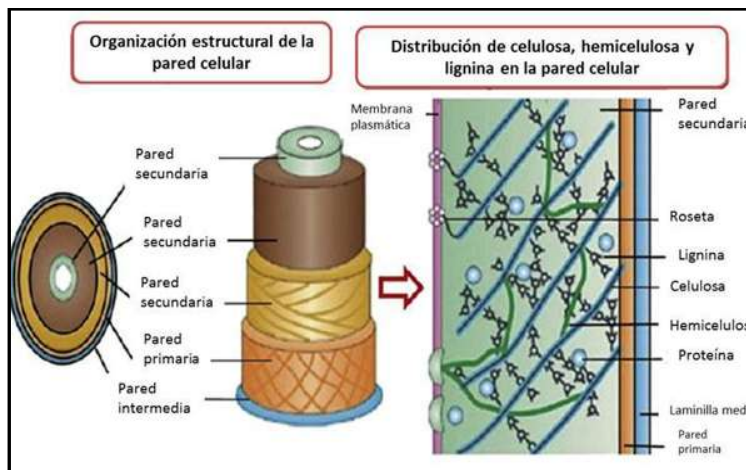


Figura 1. Estructura de la madera y de la pared de las fibras vegetales, adoptado de Menon y Rao (2012)

La hemicelulosa es un heteropolisacárido ramificado de cadenas cortas que, generalmente, se clasifica de acuerdo al principal residuo azucarado presente en el esqueleto del polímero. Las hemicelulosas más abundantes tienen un esqueleto formado por xilano (cereales y madera de caducifolias) y galacto-glucomanano (madera

de coníferas), constituido por unidades de D-xilosa y D-manosa unidas por enlaces  $\beta$ -(1,4), respectivamente (Aro et al., 2005). Las hemicelulosas menos abundantes son el arabinano, constituido por unidades de L-arabinosa unidas por enlaces  $\alpha$ -(1,4), y el galactano, constituido por unidades de D-glucosa unidas por enlaces  $\beta$ -(1,3). Las cadenas principales de azúcar de las hemicelulosas son modificadas por grupos laterales, como el ácido 4- O-metilglucurónico, la arabinosa, la galactosa y grupos acetilo, haciendo que las hemicelulosas sean más ramificadas y variables en estructura. La estructura de la celulosa en la pared se encuentra reforzada por la lignina, un polímero complejo, altamente ramificado e insoluble, formado por unidades sustituidas de fenilpropano unidas por diferentes tipos de enlaces, dando lugar a una enmarañada red que se extiende a lo largo de la pared celular (Aro et al., 2005). La lignina forma una matriz en íntima relación con las hemicelulosas, ordenadamente dispuestas, a las que rodea y une mediante enlaces éter (Brunow G, 2001).

En la tabla 1, es posible apreciar las composiciones de diferentes tipos de biomasa lignocelulósica, de acuerdo a su contenido en celulosa, hemicelulosas, lignina y otros compuestos que pueden ser extraíbles (como resinas).

Tabla 1. Contenido de celulosa, hemicelulosas y lignina en diferentes biomásas lignocelulósicas en base seca.

	<b>Celulosa</b>	<b>Hemicelulosas</b>	<b>Lignina</b>	<b>Extractivos</b>
	(%)	(%)	(%)	(%)
Maderas duras	40 - 55	24 – 40	18 – 25	3 – 8
Maderas blandas	45 - 50	25 – 35	25 – 35	2 – 5
Cáscaras de frutos	25 - 30	25 – 30	30 – 40	--
Mazorcas de maíz	45	35	15	--
Pastos	25 - 40	35 – 50	10 - 30	--

Papel	85 - 99	0	0 - 15	--
Paja de trigo	30	50	15	--
Hojas	15 - 20	80 - 95	0	--
Semillas de algodón	80 - 95	5 - 20	0	--
Papel periódico	40 - 55	25 - 40	18 - 30	--
Pulpa residuo	60 - 70	10 - 20	5 - 10	--
Desechos sólidos primarios	8 - 15	--	24 - 29	--
Pasto varilla	45	31	12	--
Bagazo de caña	22	15	11	--
Paja de trigo	37 - 41	27 - 32	13 - 15	5 - 9
Tallo de maíz	39 - 47	26 - 31	3 - 5	1 - 3

## 1.2 Características e estructurales de la lignina.

La lignina, después de la celulosa, es el segundo componente más abundante e importante de las sustancias orgánicas poliméricas en las plantas (Fengel & Wegner, 1989). No se encuentra lignina presente en plantas primitivas como los hongos, algas y líquenes (Freudenberg & Neish, 1968). De todos los componentes de la biomasa, la lignina es el único que está formado por anillos aromáticos; muchos aspectos relacionados con su comportamiento químico aún permanecen desconocidos. Un ejemplo de lo diverso de su química es la estructura específica que la lignina presenta en la madera dependiendo de la ubicación en el xilema, sin embargo, los principales elementos estructurales de la misma han sido identificados (Sjöström, 1981). En la Figura 1 se presenta la estructura característica de la lignina de madera suaves (Adler, 1977).

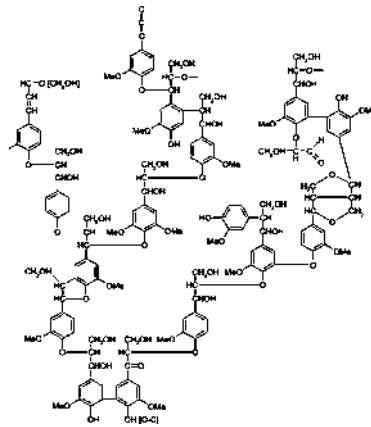
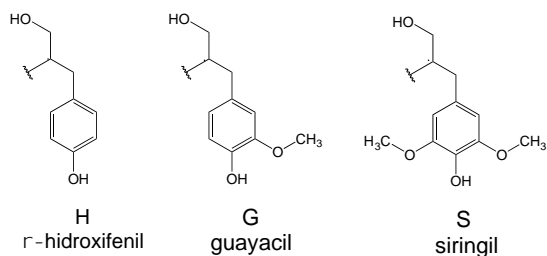
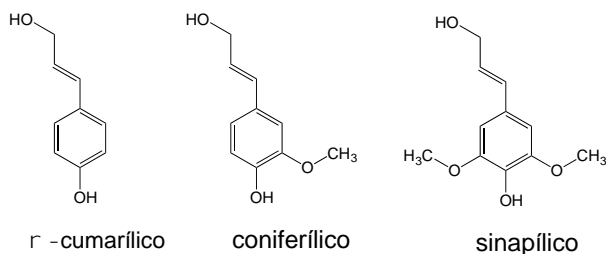


Figura 2. Modelo estructural de lignina de maderas suaves.

La lignina de maderas suaves se encuentra formada principalmente de unidades guayacilo originadas por la polimerización del alcohol trans coniferílico, la lignina de maderas duras se encuentra conformada por unidades de guayacilo y siringilo copolímero formado por el alcohol trans coniferílico y trans sinapílico, la lignina de arbustos contiene p hidroxifenol derivado del alcohol trans p cumarílico (Azadi et al., 2013). La Figura 3 muestra la estructura de los alcoholes; la biomasa que contiene lignina está formada por una o más de las tres unidades conocidas que se identifican en la Figura 4: p hidroxifenol, guayacilo y siringilo (Sakakibara & Sano, 2000).



La presencia de muchos y no sencillos enlaces entre carbono y carbono vuelve compleja la degradación del polímero a fragmentos de bajo peso molecular. Aún no ha sido posible aislar completamente todas las partes que componen la lignina por lo que se ha complicado el conocer de forma completa la estructura de dicha molécula. En 1968 Freudenberg et al. Realizaron el trabajo de biosíntesis de la lignina in vitro lo cual ha ayudado a conocer un poco más de su estructura (Sakakibara & Sano, 2000). Se sabe que los siguientes procesos son efectivos para la degradación de la lignina: hidrogenólisis catalítica, hidrólisis controlada y degradación por tioacetólisis o tioacidólisis seguida por una reducción (Sakakibara & Sano, 2000). Los datos cuantitativos que se pueden tener respecto al número de estructuras y enlaces presentes pueden ayudar a conocer más de su comportamiento. Los rayos ultra violeta (UV), infrarrojos (IR) y la resonancia magnética nuclear (RMN) junto con algunas modificaciones químicas han contribuido a estimar la frecuencia de los grupos funcionales y los tipos de enlaces (Sakakibara & Sano, 2000).

### 1.2.1. Enlaces presentes entre los monómeros de la lignina

Los enlaces tanto Carbono-Carbono como Carbono-Oxígeno son ambos identificados en la lignina. El grado de entrecruzamiento de la lignina, y por ende la rigidez de su estructura, depende del grado de sustitución. Así para el caso de maderas suaves, la estructura G es dominante, mientras que, en maderas duras, las ligninas contienen normalmente una mezcla de las estructuras S y G, siendo la S la mayoritaria, mientras que las estructura H es predominante en ligninas de pastos (Doherty et al., 2010). Los enlaces presentes en la lignina incluyen  $\beta$ -O-4, 5-5,  $\beta$ -5, 4-O-5,  $\beta$ -1, dibenzodioxocina y  $\beta$ - $\beta$ , siendo el enlace  $\beta$ -O-4 el enlace dominante en más de la mitad de las estructuras de unión propias de la lignina (Zakzeski, J et al 2010). La abundancia relativa de los tipos de enlaces en algunas maderas suaves y maderas duras se muestra en la tabla 2.

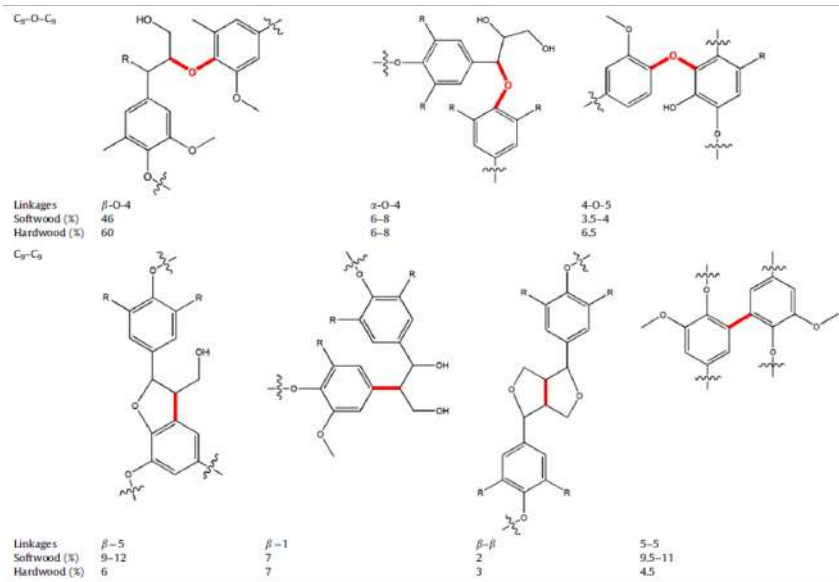
Tabla 2. Abundancia de enlaces en lignina de madera

MADERA	$\beta$ - O - 4	$\alpha$ - O - 4	4 - O - 5	$\beta$ - 5	$\beta$ - 1	$\beta$ - $\beta$	5 - 5
Madera suave (Softwood)	46	6-8	3.5-4	9-12	7	2	9.5 -11
Maderas duras (Hardwood)	60	6-8	6.5	6	7	3	4.5

Resaltando que el enlace predominante en ambas maderas es el  $\beta$ -O-4. Las maderas duras contienen cerca de 1.5 veces más enlaces  $\beta$ -O-4 en comparación con la lignina de las maderas suaves (Azadi, P et al., 2013). Un porcentaje aproximado de los tipos de enlaces en las maderas suaves y duras, se puede observar en la figura 2.6.

La composición de la lignina presente en las maderas suaves y duras discrepa en la abundancia de los alcoholes *p*-coumarílico, coniferílico y sinapílico. Los alcoholes coniferílicos componen cerca del 90% de la lignina de maderas suaves, mientras que, en la lignina de maderas duras, existen proporciones similares de alcohol coniferílico y

sinapílico (Zakzeski, J et al 2010). Los grupos metoxilo adicionales de los anillos aromáticos evitan la formación de enlaces 5-5 o dibenzodioxocina, teniendo como consecuencia que la lignina de maderas duras tenga una estructura mucho más lineal en comparación con la de maderas suaves (Zakzeski, J et al 2010). La presencia de diversos grupos funcionales como: metoxilos, hidroxilos fenólicos, hidroxilos alifáticos, alcoholes bencílicos no cíclicos. Benciléter y carbonilos; permite la reactividad de la lignina en varias reacciones químicas de interés (Azadi, P et al., 2013).



**Figura 5. Proporciones de los enlaces entre las unidades de la lignina en maderas suaves y duras.**

### 1.3 De gradación de material lignocelulósico.

La madera y otros materiales lignocelulósicos representan la mayor fuente de energía y materia orgánica renovables de la biosfera. La mayor parte de la biomasa del planeta está constituida por materiales lignocelulósicos, por lo que la degradación de estos compuestos representa el proceso biodegradativo más importante en el ciclo del carbono (Blanchette, 1995).

En el proceso de biodegradación intervienen un gran número de enzimas (como hidrolasas y oxidorreductasas) secretadas por diferentes tipos de organismos, en el que además juegan un papel importante compuestos de bajo peso molecular y radicales libres (Higuchi, T. 1985). La conversión de celulosas y hemicelulosas en azúcares más simples es llevada a cabo por un gran número de organismos (bacterias, hongos y protozoos) que secretan diferentes tipos de hidrolasas capaces de degradar estos polisacáridos en mono y disacáridos. Entre las hidrolasas que degradan celulosa se encuentran las enzimas pertenecientes al complejo celulasa formado por endoglucanasas (hidrolizan enlaces glicosídicos en el interior de la molécula de celulosa), exoglucanasas (hidrolizan los enlaces de los extremos no reductores de la cadena de glucosa liberando celobiosa o glucosa) y beta-glucosidasas (transforman la celobiosa y otras celodextrinas en glucosa). Dentro de las enzimas que degradan hemicelulosas (endo y exoxilasasas y beta-xilosidasas) podemos encontrar diferentes tipos con alta especificidad dependiendo de los azúcares mayoritarios que forman las cadenas. Se han descrito muchos organismos capaces de degradar polímeros aislados de la pared celular, especialmente polisacáridos. Sin embargo, para poder acceder a estos polímeros durante la colonización del material lignocelulósico es necesaria la alteración o degradación previa de la lignina. El tamaño del polímero de lignina hace imposible su absorción intracelular y su complejidad estructural dificulta su degradación (Aust, S. D. 1990). Por esta razón, la degradación de la lignina constituye el paso esencial en el reciclado de carbono dentro de los ecosistemas terrestres.

#### **1.4. Mecanismos implicados en la degradación de lignina.**

La biodegradación de la lignina es un proceso complejo catalizado por enzimas extracelulares que muestran una gran inespecificidad.

El proceso implica tanto la despolimerización inicial de la lignina como la transformación que sufren los productos derivados de la misma para incorporarse en las rutas generales del metabolismo. El sistema enzimático ligninolítico extracelular está formado por dos tipos de actividades enzimáticas, peroxidasas y oxidasas (Brunow G, 2001).

Los hongos de podredumbre blanca (HPB) son reconocidos por su producción de enzimas lignolíticas. Dichas enzimas pertenecen a los grupos de las fenoloxidasas y peroxidasas, entre las cuales es posible distinguir a la Lacasa (Lac), manganosperoxidasa (MnP) y lignin-peroxidasa (LiP).

#### **1.4.1. Lacasas.**

Las lacasas son enzimas que hacen parte del sistema enzimático ligninolítico producido por los hongos de podredumbre blanca. Es una fenol oxidasa con cobre que oxida anillos de lignina en ausencia de LiP. Estas enzimas extracelulares poseen un grupo Nglicosilato que presenta en su estructura dos monosacáridos: Manosa y Nacetilglucosamina; contiene además cadenas glicosídicas unidas a oxígeno y nitrógeno, cuya masa molecular aproximadamente se encuentra entre 60-390 kDa (Call, HP. 1997). Esta enzima requiere de peróxido de hidrógeno que oxida al ion hierro para aumentar el estado de oxidación en el cual la enzima es capaz de despolimerizar lignina y sus derivados para llevar a cabo su ciclo catalítico (Fig. 6); además reduce el oxígeno a agua y simultáneamente realiza la oxidación de un electrón y muchos sustratos aromáticos. Al mismo tiempo cataliza la remoción de un átomo de hidrogeno por un grupo hidroxilo de metoxi sustituyendo orto y para difenoles. La lacasa es también capaz de oxidar otros sustratos como aminas aromáticas, coloca aldehídos y compuestos no fenólicos con radicales libres (Zille, et al 2003).

Estructuralmente en el sitio activo la enzima posee cuatro átomos de cobre (como  $\text{Cu}^{+2}$  en el resto de la enzima) los cuales están distribuidos en tres sitios diferentes de su estructura (McGuirl, M 1999). Por lo anteriormente planteado es que la enzima requiere cobre y oxígeno para oxidar fenoles, polifenoles, aminas aromáticas y diferentes sustratos no fenólicos, lo que permite que se lleve a cabo la polimerización, dipolimerización, metilación y/o dimetilación de compuestos fenólicos (Claus, H. 2003).

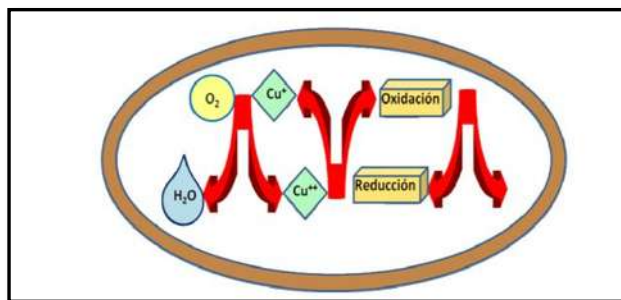
Con respecto al pH el óptimo de estas enzimas puede variar de 3 a 7 con un intermedio de 4.5 donde es completamente estable a una temperatura de 37°C por un mínimo de 5 días (Gayosso, M 2004). Se ha reportado que son enzimas capaces de oxidar principalmente sustancias recalcitrantes, como clorofenoles (Fahr, et al., 1999) e

hidrocarburos aromáticos polcíclicos, compuestos organofosforados, fenoles, y colorantes aromáticos.

Además, la producción de lacasa puede ser fuertemente inducida por la adición de elementos como cobre, manganeso, magnesio y mediadores como el ABTS (2,2'-azino-bis[3-etilbenziazolina-6-ácidosulfónico]), L-DOPA, siringaldazina, y 2, 6 DMP e intermediarios de la degradación de la lignina entre los que se encuentra el alcohol veratrílico (Gómez, C., et al 2005), en contraste se inactiva en presencia de zinc, calcio, hierro y tirosina (Zille, et al 2003).

Diferentes estudios llevados a cabo por Nyanhongoy *col*, 2002, han demostrado que la mayor actividad de lacasas y el nivel máximo de producción no es constante, este oscila entre 5 y 24 días de fermentación. Esto sugiere que existen varios factores que pueden afectar la actividad de las lacasas, como el tipo de cepa, el sustrato y el tiempo de fermentación. La actividad de lacasas en varias especies de *Trametes* relaciona con las condiciones de cultivo, y se destaca la fuente de carbonos, el pH del caldo de fermentación, la presencia de inductores y de materiales lignocelulósicos, crecimiento de la biomasa fúngica y tiempo de fermentación.

Las lacasas han tomado gran importancia a nivel industrial por tener diversas aplicaciones como delignificación de materiales lignocelulósicos, biorremediación de aguas papeleras y textiles.



**Figura 6.** Ciclo catalítico de lacasa (Lac).

### 1.4.2 Manganeso Peroxidasas (MnP).

La enzima manganeso peroxidasa MnP es una hemo proteína que cataliza la oxidación de  $Mn^{+2}$  a  $Mn^{+3}$  dependiente de peróxido ( $H_2O_2$ ) (Fig. 7), presenta un potencial de oxidación suficiente solamente para absorber electrones de estructuras fenólicas. El  $Mn^{+3}$  es quelado por diferentes ácidos orgánicos como glicolato, y puede oxidar una amplia variedad de compuestos fenólicos. La enzima es oxidada por  $H_2O_2$  para generar un intermediario deficiente de un par de electrones, conocido como componente I. Dicho componente puede ser oxidado ya sea por  $Mn^{+2}$  o por sustratos fenólicos, generando el componente II. El ciclo es completado cuando el componente II gana un electrón, produciendo que la enzima detenga su actividad (Gayosso, M 2004). En altas concentraciones de manganeso se genera una inhibición de la enzima, debido a que se generan grandes cantidades de peróxido de hidrogeno que rompen el ciclo catalítico de la enzima y afecta la cantidad de biomasa fúngica y el crecimiento micelial del hongo (Gómez, C., et al 2005). La actividad de la MnP es estimulada por la acción de lignina peroxidasas, presencia de  $CuSO_4$  y por sustratos como el lactato, el cual ayuda a la oxidación de  $Mn^{+2}$  a  $Mn^{+3}$ , igualmente el pH es un factor indispensable debido a que la enzima es inestable a pHs mayores a 7.5, en los cuales la determinación de la actividad es nula (Gómez, C., et al 2005).

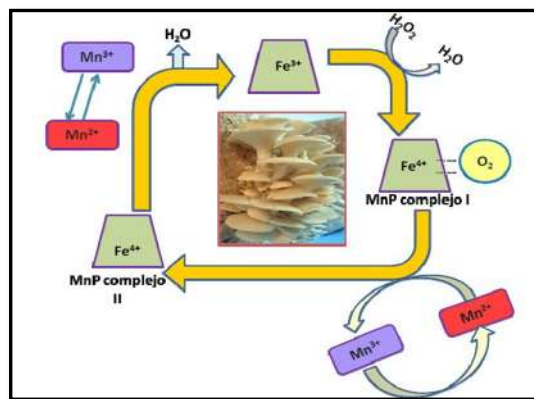


Figura 7. Ciclo catalítico de la Manganeso Peroxidasasa (MnP).

### 1.4.3 Lignin Peroxidasa(LiP).

Fue la primera enzima en descubrirse y se asemeja a otras peroxidadas en que contiene el grupo hemo férrico y funciona siguiendo la vía catalítica típica en que LiP es oxidada por  $H_2O_2$  generando un intermediario deficiente de electrones, el cual regresa a su estado natural de reposo inicial por medio de oxidaciones posteriores (Fernández, J. et al 2007). Es una glicoproteína monomérica que contiene 11% de carbohidratos, con pH óptimo entre 2.5 y 3, que cataliza la oxidación de la lignina y de otros compuestos que contengan estructuras homólogas a esta, la lignina peroxidasa por síntesis endógena de peróxido oxida compuestos aromáticos no fenólicos y cliva las cadenas laterales de aril propano y enlaces éter, abriendo el anillo aromático e hidroxilándolo. El ciclo catalítico de la LiP (Fig.8) comienza con la oxidación de la enzima a expensas del peróxido de hidrógeno originando la transformación de su centro activo en un compuesto intermediario (complejo I, o complejo radical +4). Este compuesto actúa como generador catiónico de radicales libres de Fe. Así, en presencia de un compuesto aromático (fenólico o no) donador de electrones, el compuesto I, es reducido a compuesto II (mediante ganancia de un electrón), a la vez que se genera un radical aromático. Tras una segunda reducción del compuesto II con un sustrato aromático se regenera la enzima nativa, cerrándose así el ciclo. No obstante, si existe un exceso de peróxido de hidrógeno en el medio, la LiP puede sufrir una inactivación irreversible, al transformarse su centro activo en el compuesto III.

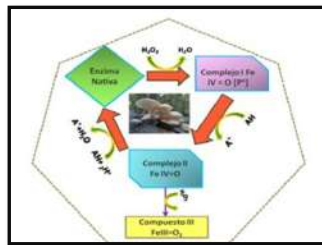


Figura 8. Ciclo catalítico de la Lignin Peroxidasa (LiP).

En términos generales, las enzimas o complejo ligninolítico pueden ser ordenadas según sus potenciales de oxidación así: LiP>MnP>Lacasas. LiP presenta un potencial

de oxidación suficientemente elevado para absorber electrones de estructuras aromáticas no fenólicas, dando origen a radicales catiónicos, los cuales sufren luego varias reacciones no enzimáticas incluyendo el rompimiento de uniones C-C y C-O. Todas las anteriores enzimas son expresadas por hongos de la podredumbre blanca como un proceso idiofásico (Tabla 1), el cual está ligado a la limitación de carbono y/o nitrógeno o sulfato en el medio y su síntesis es particularmente activa con altas tensiones de oxígeno.

**Tabla 3.** Actividad enzimática de los hongos de podredumbre blanca

ENZIMA	COFACTOR	REACCIONES
<b>Lignina Peroxidasa (LiP)</b>	$H_2O_2$	Oxidación de núcleos aromáticos no fenólicos hasta radicales catiónicos.
<b>Manganeso Peroxidasa (MnP)</b>	$H_2O_2, Mn^{+2}$	Oxidación de $Mn^{+2}$ a $Mn^{+3}$ el cual oxida fenoles a radicales fenóxilos.
<b>Lacasa (Lac)</b>	$O_2, Cu^{+2}$	Reduce $Cu^{+2}$ a $Cu^{+1}$ , Reduce $O_2$ a $H_2O_2$ . Oxidación de fenoles a radicales fenoxilo.

Fuente. (Pinzón, 2004)

### 1.5. Procesos Químicos para la obtención de celulosa.

Para la obtención de pulpa celulósica existen distintos procesos: mecánicos, semi-mecánicos, semi-químicos y químicos (Libby, 1967); en éste último grupo, a diferencia de los anteriores, la eliminación de hemicelulosas y lignina es mayor. En México en el año 2011 se produjeron 138,000 toneladas de celulosa mediante proceso químico a partir de madera (FAO, 2013). Dentro de los procesos químicos, el proceso al sulfato, también conocido como Proceso Kraft, es altamente utilizado a nivel industrial ya que se obtiene celulosa con mejores propiedades mecánicas y tiene perfectamente

establecido el proceso de recuperación de reactivos. En la Figura 4 se muestra el proceso Kraft (Diez, 2014).

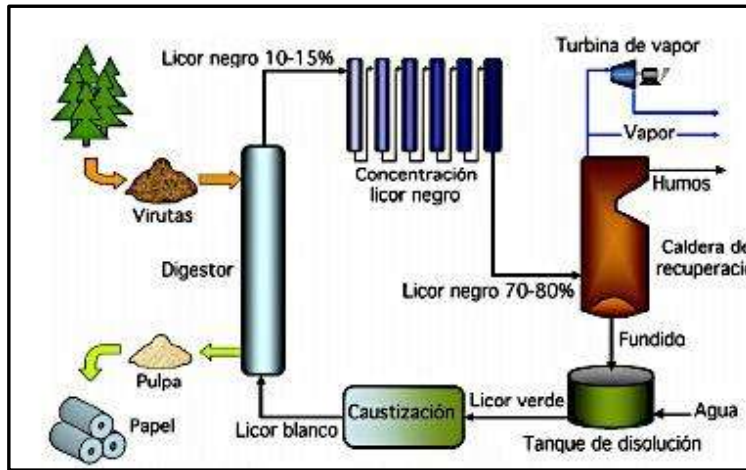


Figura 9. Proceso Kraft con recuperación de reactivos y energía.

### 1.5.1 Proceso Kraft.

El proceso Kraft o del Sulfato es actualmente el principal método para obtención de pulpa y papel obteniéndose grandes cantidades de lignina. Emplea hidróxido de Sodio y Sulfato de Sodio bajo condiciones altamente alcalinas para romper los enlaces éter de la lignina. El proceso de deslignificación ocurre en tres etapas: la primera a 150 °C y es controlada por la difusión, la segunda fase ocurre entre 150°C y 170°C y la tercera se lleva a cabo a temperaturas aún mayores. El porcentaje de deslignificación es del 90% en peso y ocurre en la segunda etapa, siendo posible la recuperación de lignina, al disminuir el pH del licor negro entre 2 a 3.5 con ácido mineral, preferentemente ácido sulfúrico, o dióxido de carbono según norma TAPPI T 222 om-02.

En México, la producción de pulpa lignocelulósica, a partir de madera, tuvo una cantidad promedio de 358.85 miles de toneladas al año en el periodo comprendido

entre 1983 a 1996 y ha reportado Greenpeace en 2006 que por cada tonelada de pulpa se tienen de forma aproximada 0.4 toneladas de lignina potencialmente recuperables.

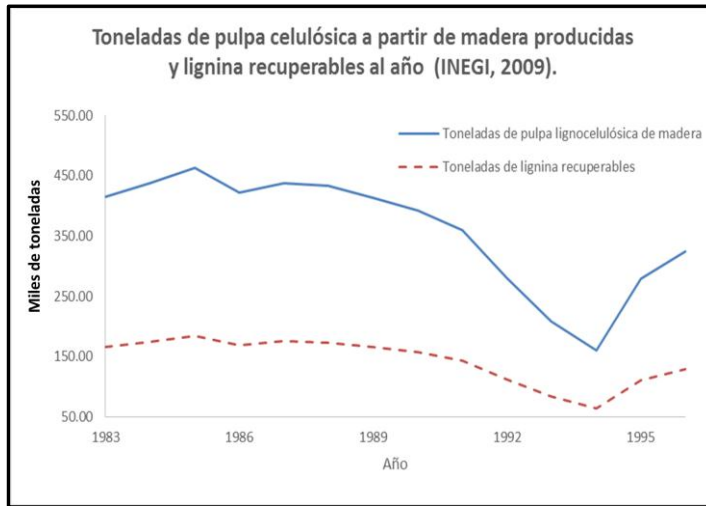


Figura 10. Producción de pasta lignocelulósica anual y aproximación de la lignina recuperable.

La lignina obtenida por este método presenta grupos alifáticos tiol, llamada lignina Kraft. Esta lignina es hidrofóbica y se requiere modificarla, debido a su alto contenido de azufre (1 al 2%), para mejorar su reactividad y ha sido empleada principalmente en generación de energía

### 1.7. Potenciales usos de la lignina y sus derivados

La lignina tiene un gran potencial para ser usada como fuente renovable de combustibles y compuestos aromáticos, sin embargo, las tecnologías que permitan su valorización han sido menos desarrolladas que aquellas para la utilización de los polisacáridos de la materia lignocelulósica. La conversión de lignina puede abrir una nueva ruta de producción de combustibles de bajo contenido de carbono y de

compuestos aromáticos provenientes de fuentes fósiles, de tal manera que impacte en la viabilidad económica de la planta (Azadi 2013).

Los productos derivados de la lignina pueden ser usados como combustibles, solventes, reactivos químicos y polímeros. De forma breve se exponen las potenciales aplicaciones de los compuestos derivados de la lignina como combustibles biorenovables y químicos aromáticos. (Azadi 2013).

## CAPÍTULO II. INTRODUCCION

### 2.1 Justificación

Tradicionalmente se ha utilizado cloro elemental para blanquear las pulpas de celulosa, pero a pesar de la gran eficacia de este fuerte oxidante, se debe evitar su uso debido a la formación de ligninas y fenoles clorados que se liberan a las aguas. Secuencias de blanqueo más respetuosas con el medio ambiente implican la sustitución del cloro por dióxido de cloro, en el caso del blanqueo “libre de cloro elemental” (ECF) y la eliminación completa de reactivos clorados a sustituir por peróxido de hidrógeno, oxígeno u ozono, entre otros en el caso del blanqueo “totalmente libre de cloro” (TCF). La introducción de estas tecnologías más respetuosas con el medio ambiente en la industria de la celulosa ha traído consigo una mayor dificultad para obtener elevados grados de blancura en la pasta debido a la lignina residual y a los compuestos derivados de la misma que son más difíciles de degradar en el blanqueo TCF.

Se han propuesto procesos biotecnológicos como una alternativa a las secuencias de blanqueo químico de pasta de celulosa Kraft, ya sea para una reducción en el uso de compuestos químicos o como un procedimiento capaz de llevar a cabo el blanqueo en una manera ecológica (blanqueo con hongos ligninolíticos y sus enzimas oxidativas).

Para el presente estudio se aislaron tres cepas de hongos salvajes de troncos de madera que fueron identificados por análisis filogenéticos como pertenecientes a *Phlebiopsis* sp., *Irpex lacteus* y *Trametes versicolor*. No se ha informado previamente a ninguna especie de *Phlebiopsis* para blanquear y deslignificar la pulpa Kraft, y *I. lacteus*

ha sido escasamente estudiado al respecto. Se utilizó un ensayo de fermentación de estado sólido con bajo suministro de nutrientes con el fin de evaluar el blanqueo de la pasta krafty la delignificación por las cepas estudiadas. Finalmente, se presenta y discute la inducción de actividades enzimáticas ligninolíticas (lacasa, peroxidasa Mn y peroxidasa de lignina) observadas en cultivos líquidos suplementados con pulpa kraft.

## **2.2. Hipótesis**

La delignificación de la madera de pino y eucalipto para la obtención de pulpa para papel puede realizarse de manera eficiente mediante el uso de enzimas ligninolíticas producidas por hongos, sin afectar la calidad del producto final.

## **2.3. Objetivo General**

Evaluar el potencial de cepas de hongos silvestres del estado de Michoacán para su aprovechamiento en el proceso de blanqueo de celulosa para la obtención de papel.

## **2.4. Objetivos específicos.**

- Establecer ensayos que permitan identificar cepas con potencial para el procesamiento de pulpa para la obtención de papel.
- Caracterizar las cepas mediante análisis filogenético.
- Determinar cuantitativamente la capacidad para producir enzimas ligninolíticas extracelulares por parte de las cepas seleccionadas.
- Evaluar la capacidad de las cepas seleccionadas para crecer y producir enzimas ligninolíticas extracelulares en medio basal, medio con pulpa de celulosa y en medio con CuSO<sub>4</sub>.
- Determinar el potencial de delignificación de pulpa de las cepas seleccionadas en diferentes condiciones de cultivo.
- Caracterizar las modificaciones químicas y estructurales de la fibra de celulosa ocasionadas por las cepas seleccionadas.
-

### CAPÍTULO III. CARACTERIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS EN CEPAS SILVESTRES FUNGICAS UTILIZADAS PARA BLANQUEAR LA PUNPA KRAFT.

#### 3.1 Introducción

La biotecnología aplicada a la fabricación de pasta y blanqueo en la industria del papel se ha desarrollado con el objetivo para reducir el impacto en el medio ambiente al mismo tiempo mantener la calidad de la pulpa (Martín-Sampedro et al., 2015; Kumar et al. 2016). En particular, etapas que involucran hongos con enzimas oxidativas: lacasa (Lac), Mn peroxidasa (MnP) y lignina peroxidasa (LiP) han mostrado resultados prometedores para el blanqueo de pulpa (Bajpai 2012; Upadhyay et al., 2016). Este enfoque biotecnológico se está utilizando actualmente con excelentes resultados en la pulpa y papel en la producción a nivel escala (Bajpai 2012). El uso de lignocelulolítico microbiano de las enzimas pueden mejorar el efecto blanqueador de reactivos químicos, lo que da como resultado reducir el consumo de reactivos y cantidades de energía requerida (Bajpai 2012; Martín-Sampedro et al. 2015). Enzimas oxidativas extracelulares que degradan lignina son producidas por bacterias y hongos (Hatakka y Hammel 2011; Cragg et al. 2015), y han sido estudiadas para su uso en pulpeo y blanqueo (Bajpai 2012); Los taxones Basidiomycota son particularmente importantes fuente de cepas fúngicas para estos procesos (Hatakka y Hammel 2011).

Los basidiomicetos de podredumbre blanca degradan eficientemente la lignina dentro de la pared celular de la planta usando enzimas extracelulares ligninolíticas, como Lac, MnP y LiP (Hatakka y Hammel 2011). Las principales especies / cepas fúngicas examinadas producir enzimas ligninolíticas extracelulares que se pueden usar en tratamiento de la madera y bioblanqueo de pasta Kraft; pertenecen a los géneros *Phanerochaete* y *Trametes*. Aunque las cepas de los géneros *Phlebia*, *Physisporinus*, *Pleurotus*, *Pycnoporus* y *Bjerkandera* (Hatakka y Hammel 2011), entre otros, también se han analizado, representan un pequeño porcentaje de hongos de podredumbre blanca (Berrin et al., 2012). Por otra parte, algunos estudios han identificado la variabilidad fisiológica y diferentes resultados de procesamiento en blanqueo y biocontrol entre las

cepas que pertenecen al mismo género o especie, incluso de taxones aparentemente bien estudiados (Levin et al., 2007; Berrin et al. 2012; Daassi et al. 2016). Además, la degradación de lignina por diferentes especies de hongos o cepas depende en la composición monomérica de esta compleja estructura (Skyba et al. 2013). Por lo tanto, en busca de nuevos hongos de diferentes áreas geográficas, nuevos tipos de madera, o diferentes estilos de vida permiten el descubrimiento de cepas con diferentes capacidades enzimáticas (Oses et al., 2006; Berrin et al. 2012; Daassi et al. 2016), que varían tanto cuantitativamente y cualitativamente en la afinidad y el procesamiento del sustrato (Levin et al., 2007; Liew et al., 2011; Martín-Sampedro et al. 2015). El objetivo del presente estudio fue identificar y caracterizar tres cepas fúngicas silvestres, y determinar su potencial de uso en el bioblanqueo de pulpa Kraft. Apoyar la evaluación del potencial biotecnológico de las cepas estudiadas, este trabajo combina enfoques no comúnmente encontrados en informes anteriores. Estos enfoques incluyen: (1) Hacer un robusto análisis filogenético de las cepas estudiadas basadas en Criterios Máximos de inferencia parsimoniosa y bayesiana, (2) Aplicando un proceso simple de cribado de fermentación en estado sólido (SSF) Ensayos en placas de Petri, (3) Análisis de las modificaciones de la de pulpa Kraft causadas por el tratamiento con hongos por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM) y (4) Determinación de actividades enzimáticas ligninolíticas basales e inducidas en el cepas estudiadas. Una de las cepas estudiadas pertenece a *Phlebiopsis* sp., Un género para el que ninguna especie ha sido previamente estudiada en el blanqueo y deslignificación de la pulpa Kraft. La otra cepa fue identificada como *Irpepex lacteus*, una cepa extraña. El tercer taxón de hongos estudiado es una cepa de *T. versicolor* que muestra una gran capacidad para secretar enzimas ligninolíticas en las condiciones del ensayo. Los resultados de este enfoque fueron comparados y discutidos para evaluar la contribución y caracterización de hongos para su uso en blanqueo de pulpa Kraft.

## **3.2 Materiales y métodos.**

### **3.2.1 Muestreo y procesamiento de pulpa**

La pulpa Kraft fue suministrada por Scribe™ en la ciudad de Morelia en el estado de Michoacán, México. En la fecha de muestreo (13 de enero de 2015), la madera utilizada en la planta de procesamiento era de pino (*Pinus* sp.) y eucalipto (*Eucalyptus* sp.) en proporción 50% - 50%. Después de la digestión Kraft, la pulpa mostraba un número kappa de 13.23 (Tappi T-264 om-88); normalmente, este proceso continúa con un paso de refinación, que se produce en diferentes secuencias de blanqueo conocidas como ácido y alcalinas. La pulpa se recolectó directamente en la planta en bolsas esterilizadas y almacenadas a temperatura ambiente hasta el procesamiento. Dentro de la misma semana de recolección, la pulpa era secado a 40 ° C en un horno y almacenado a temperatura ambiente hasta que fue utilizada para los bioensayos.

### **3.2.2. Cepas fúngicas**

Las tres cepas fúngicas CMU-TA01, CMU-84/13, y CMU-47/13 utilizadas en este trabajo fueron aisladas de diferentes ecosistemas en el estado de Michoacán, México y depositadas en la Colección de Cultivos de Cepas de Michoacán (CMU) del Laboratorio de Biotecnología y Conservación Microbiana de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

### **3.2.3. Medios Sólidos y Líquidos.**

Se utilizó agar papa dextrosa (APD, Difco™, EE.UU.) para mantener las cepas y para la producción de inóculos. Se utilizó un medio líquido papa dextrosa (PDB, Difco™, EE.UU.) en ensayos de inducción de actividad enzimática en presencia de pulpa Kraft. Todos los medios se prepararon según lo indicado por el proveedor y se esterilizaron en autoclave a 120 ° C y 15 libras / pulgada<sup>2</sup>.

### **3.2.4. Generación de Inóculos.**

Todas las cepas ensayadas se almacenaron en APD a 4 °C hasta su utilización. Los inóculos se generaron usando tapones cilíndricos de 6 mm extraídos con un barrenador de corcho desde el margen de la colonia de micelio en fase de crecimiento de registro y se inocularon en el centro de una placa Petri de APD de 90 mm. Las placas se incubaron en la oscuridad a 28 °C hasta la fase de medio log, y luego 6 mm de inóculo se tomó del margen de la colonia como se describe. Estos tapones miceliales se usaron para ensayos de medios sólidos y líquidos.

### **3.2.5. Extracción de ADN, ensayos de PCR y secuenciación**

El ADN genómico se extrajo de colonias de micelio que crecen en hojas de celofán superpuestas en medio APD en placas de Petri de 90 mm usando el sistema Fastprep 24 (MP Biomedicals, EE.UU.) con la Matriz A para la lisis celular de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se utilizó el par de cebadores ITS-1 e ITS-4 (White et al., 1990) para la amplificación de las regiones 1 y 2 (ITS1-5.8S- ITS2) del espaciador transcrito interno del grupo de genes rRNA. La mezcla de reacción utilizada para todas las amplificaciones contenía tampón Tris-HCl 10 mM pH 8,0, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 0,2 mM de cada dNTP, 1 μM de cada oligonucleótido, 0,5 U de polimerasa recombinante Taq (Invitrogen, EUA) y un total de 25 ng de ADN molde, y el volumen final se ajustó a 25 μl con H<sub>2</sub>O desionizada estéril. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Veriti (AppliedBiosystems, USA) con el siguiente esquema de amplificación: un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C durante 3 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 1 min, alineación a 55°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 2 min, con una extensión final a 72°C durante 10 min. Tanto la integridad del ADN aislado como los productos de amplificación se analizaron en geles de agarosa al 1% (p / v) teñidos con bromuro de etidio. Los productos de amplificación se purificaron y secuenciaron por Elim Biopharm (Hayward, CA, EE.UU.). Las secuencias ITS obtenidas de CMU-84/13, CMU-47/13 y CMU-TA01 se sometieron a GenBank con los números de acceso KY448286, KY448287 y KY448288, respectivamente.

### 3.2.6. Análisis Filogenético

Las secuencias de los ITS de las tres cepas se analizaron individualmente en la base de datos de la NCBI GenBank mediante el algoritmo BLASTn. Sólo se seleccionaron secuencias de especies bien identificadas que mostraban una similitud de 97% o más con las secuencias de las cepas caracterizadas para el análisis filogenético. Se descartaron las secuencias obtenidas con la búsqueda BLASTn a partir de muestras no cultivadas o sin asignación de especies. Basándose en los resultados obtenidos a partir del primer conjunto de secuencias para cada cepa, se recuperaron secuencias adicionales del mismo género o taxonómicamente relacionadas de GenBank. Estas secuencias adicionales fueron necesarias tanto para seleccionar grupos de salida y para aumentar el número de especies bien identificadas taxonómicamente relacionados con las cepas estudiadas, pero no se proporciona en la búsqueda BLASTn inicial. Estas secuencias adicionales permiten un análisis filogenético robusto.

Las secuencias fueron alineadas con SATé (Liu et al., 2009a) usando MAFFT (Kato et al., 2005) como la herramienta de alineación de secuencias externas y RaxML (Stamatakis 2006) como el estimador de árboles. Los alineamientos mejorados a mano se utilizaron para análisis de parsimonia máxima (MP) e inferencia bayesiana (BI) para inferir relaciones filogenéticas. Los análisis parsimónicos se realizaron en PAUP 4.0a150 (Swofford 2003) utilizando una búsqueda heurística con una opción de rama de intercambio TBR excluyendo vacíos y caracteres no informativos, dejando un total de 359, 88 y 49 posiciones en la matriz final para las cepas CMU -47 / 13, CMU-84/13 y CMU-TA01, respectivamente. El soporte del nodo se determinó para los valores de arranque con 1000 repeticiones. La inferencia bayesiana (BI) se realizó en MrBayes 3.2 (Ronquist et al., 2012), que realizó un muestreo para determinar el modelo más apropiado para la sustitución de nucleótidos durante la ejecución, por lo que no fue necesario determinar ese parámetro a priori con otros paquetes. Cuatro cadenas MCMC se ejecutaron simultáneamente a partir de árboles aleatorios para 10.000.000 generaciones. Los árboles fueron muestreados cada milésima generación para un total de 10.000 árboles. Los primeros 2.500 árboles fueron descartados como la fase de quemado de cada análisis. Las probabilidades posteriores se determinaron a partir de

un árbol de consenso de reglas mayoritarias generado con los restantes 7.500 árboles. Debido a que no se observaron incongruencias entre el árbol MP y la inferencia bayesiana, las diferentes matrices se combinaron para el árbol filogenético final. Los árboles fueron editados y visualizados con otras herramientas de software citadas.

### **3.2.7 Evaluación de diferentes compuestos aromáticos.**

Estos ensayos se llevaron a cabo en placas Petri (90 mm de diámetro) con medio APD y AEM suplementado con los colorantes Naranja de Metilo (azo), Índigo Carmín (indigoide) y Fucsina Ácida (trifenilmetano), todos a una concentración de 250 mg/L (Nyanhongo y col., 2002). La solución stock de cada uno de los colorantes se esterilizó por filtración a través de membranas Millipore de 0.45 µM de poro y se adicionó al medio de cultivo después de que éste se esterilizó por autoclave. También se empleó el sustrato guayacol a una concentración de 0.01 (Kiiskinen y col., 2004). El guayacol se disolvió por separado en 20 mL de H<sub>2</sub>O destilada y se adicionó al medio de cultivo al momento de la esterilización por autoclave. Las placas fueron inoculadas a partir de precultivos de los hongos de interés en fase logarítmica de crecimiento, los inóculos se obtuvieron del borde de la colonia con un sacabocados de 6 mm de diámetro. El inóculo se colocó en el centro de la placa y en todos los casos se incubó en oscuridad a 28° C. El crecimiento micelial se determinó cada 12 horas, mediante la medición del diámetro colonial durante 15 días. El grado de decoloración se determinó visualmente mediante la formación de un halo de decoloración alrededor del micelio en crecimiento; la oxidación del guayacol se registró por la formación de un halo café-rojizo en el medio de cultivo (Kiiskinen *et al.* 2004; Nyanhongo *et al.* 2002). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### **3.2.8 Tratamiento y análisis de pulpa Kraft.**

Para analizar el blanqueo de la pulpa por las cepas fúngicas, se diseñaron ensayos simples de fermentación de estado sólido utilizando tanto fibras de pulpa como obtenidas de la planta de procesamiento y como un grano fino obtenido por

fragmentación en una licuadora. En ensayos independientes, las fibras de pulpa intactas y fragmentadas (5 g) se extendieron para cubrir la superficie de una placa de Petri de 90 mm y se humedecieron con 10 ml de agua destilada esterilizada. Para los dos tamaños de partículas, se evaluó el blanqueo de hongos por las tres cepas de hongos tanto en ausencia como en presencia de una baja concentración (0,5% p / v) de dextrosa (Sigma-Aldrich, EE. UU.). La dextrosa se disolvió en el agua añadida para humedecer las fibras. Después de la inoculación en el centro de la placa con los enchufes cilíndricos de micelio de 6 mm (obtenidos como se describió anteriormente), las mezclas se incubaron a 28°C durante 15 días. Por lo tanto, se ensayaron tres cepas para el blanqueo de la pasta Kraft en cuatro condiciones diferentes (partícula de tamaño / dextrosa), generando 12 tratamientos diferentes (Tabla 4).

Tabla 4. Diseño experimental para blanqueo de pulpa Kraft en bioensayos

Tratamiento	CMU TA01	CMU 84-13	CMU 47-13	Total <sup>1</sup>
Pulpa Intacta	T01	T05	T09	
Pulpa Fragmentada	T02	T06	T10	
Pulpa Intacta + Glucosa 0.5% (w/v)	T03	T07	T11	
Pulpa Fragmentada + Glucosa 0.5% (w/v)	T04	T08	T12	
Total, por cepa <sup>1</sup>	4 (12)	4 (12)	4 (12)	12 (36)

<sup>1</sup> cada tratamiento fue evaluado por triplicado y el número en paréntesis representa el total de ensayos por cepa y para todas las cepas.

Los números kappa de la pulpa tratada se caracterizaron siguiendo el método de Tappi (Tappi T-264 om-88). El número kappa se define como el volumen de solución de

$\text{KMnO}_4$  (0.1 N) consumido por un gramo de pulpa libre de humedad en un medio ácido durante las siguientes reacciones, dependiendo de la acidez del medio.

Para la observación y medición se utilizó un microscopio de la marca Leica y el software LAS EZ Leica Application Suite. Versión 3.0.0 (Build: 6.29)

Las fibras de pulpa Kraft inoculadas con cepas fúngicas se tomaron muestras después de 7 y 15 días de crecimiento fúngico en la pulpa. Las muestras se recubrieron con cobre y se examinaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) utilizando un microscopio JEOL JSM-7600F operado a 20-30 keV.

### **3.2.9. Determinación de actividades enzimáticas ligninolíticas extracelulares fúngicas.**

Se determinó la actividad enzimática basal de Lac, MnP y LiP en 50 ml de medio PDB en matraces de 250 mL. Se indujo la actividad en condiciones similares, pero se agregó al medio formulado a base de PDB,  $150\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$ . Un tercer ensayo se formuló complementando con fibras de pulpa Kraft intactas al 2% (p / v). Los matraces se inocularon con tres inóculos de micelio de 6 mm de diámetro obtenidos como se describió previamente y se incubaron a  $28^\circ\text{C}$  con agitación a 120 rpm durante 15 días. Las actividades enzimáticas se determinaron cada 24 horas a partir de alícuotas del medio extracelular obtenidas en condiciones estériles. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

La determinación de la actividad extracelular de la enzima lacasa se realizó cuantificando la formación de 2, 2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato) radical (ABTS + 1), de acuerdo con (Nagai et al. 2002) usando  $100\mu\text{l}$  del sobrenadante del medio de cultivo centrifugado (1500 rpm durante 10 minutos) como fuente de enzima. La actividad enzimática se cuantificó espectrofotométricamente a 420 nm utilizando un  $\epsilon$  de  $36\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para ABTS. La actividad enzimática de LiP se determinó cuantificando la oxidación de alcohol veratrílico a veratraldehído según (Tien y Kirk 1988) con  $50\mu\text{l}$

de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 mM como iniciador y se centrifugaron 200 µl del sobrenadante del medio de cultivo de reacción enzimática como se describió previamente. La actividad enzimática se cuantificó espectrofotométricamente a 310 nm utilizando un  $\epsilon$  de 9.3 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> para veratraldehído. La actividad enzimática de MnP se determinó cuantificando la formación del complejo de manganeso-tartrato en presencia de 2,6-dimetoxifenol 10 mM según (Wariishi et al. 1992), con 50 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 mM como iniciador de la reacción enzimática y se centrifugaron 300 µl del sobrenadante del medio de cultivo como se describe anteriormente. La actividad enzimática se cuantificó espectrofotométricamente a 334 nm usando un  $\epsilon$  de 18.3 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> para tartrato de manganeso.

La actividad enzimática de 1U se define como la cantidad de enzima que oxida 1 µmol de sustrato por minuto. Todos los productos químicos para los ensayos de actividad enzimática se adquirieron en Sigma-Aldrich (EE. UU.), Y los escáneres espectrofotométricos se produjeron en un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (ThermoScientific, EE. UU.).

### **3.3 Resultados y discusión.**

#### **3.3.1 Análisis Filogenético.**

El análisis filogenético identificó la cepa CMU-84/13 como *Irpexlacteus* (Fig. 11a). La secuencia ITS de la cepa CMU-84/13 muestra altos valores de bootstrap / posterior (50.8 / 0.62) con secuencias de cepas *I. lacteus* de diferentes orígenes geográficos. La secuencia ITS de la cepa CMU-47/13, el análisis filogenético la identifica como *Phlebiopsis* sp. (Figura 11b). Es difícil asignar la cepa CMU-47/13 a una especie específica porque el árbol filogenético lo coloca en un clado independiente entre *P. gigantea* y *P. flavidoalba* (Fig. 11b); por lo tanto, aunque esta cepa puede estar asociada con la primera especie con un alto valor de bootstrap / posterior (51.2 / 0.84), se debe realizar un análisis adicional usando regiones genéticas adicionales para tener una identificación más precisa de la cepa. Finalmente, la cepa CMU-TA01 se agrupa

con las secuencias de diferentes aislamientos geográficos de *Trametesversicolor*, con valores de 56.9 y 0.95 para bootstrap y probabilidad posterior, respectivamente (Fig. 11c).

El análisis filogenético mostró que todas las cepas estudiadas pertenecen al orden Polyporales, un grupo complejo que incluye especies de pudrición blanca y pudrición marrón, para las cuales se han identificado seis clados principales (Floudas y Hibbett 2015). Las cepas analizadas se distribuyen dentro de dos de estos grupos; la cepa CMU-TA01 (complejo de *T. versicolor*) se encuentra dentro del clado Polyporoid Core, mientras que las cepas CMU-84/13 (*I. lacteus*) y CMU-47/13 (*Phlebiopsis* sp.) se encuentran dentro del clado Phlebioid. Este último grupo se subdividió en los subcláusulas Phlebia, Byssomerulius y Phanerochaete (Floudas y Hibbett 2015), y las cepas CMU-84/13 y CMU-47/13 pertenecen a estos últimos grupos, respectivamente.

Si bien el análisis filogenético proporciona un fuerte apoyo para la identificación de especies de la cepa CMU-84/13 (*I. lacteus*), no fue posible identificar especies inequívocas para la cepa CMU-47/13 (*Phlebiopsis* sp.). Un estudio reciente que utiliza cuatro genes de datos indica que lo que antes era el complejo de *T. versicolor* ahora está compuesto por la especie *T. versicolor*, *T. ochracea*, *T. pubescens* y *T. ectypa* (Carlson et al., 2014). Sin embargo, aunque la última especie tiene una distribución geográfica restringida y no se encuentra en México, las tres anteriores tienen una distribución amplia en los bosques templados del hemisferio norte, siendo *T. versicolor* el más común (Carlson et al., 2014). Además, *T. versicolor* y *T. ochracea* tienen una alta similitud de secuencia ITS (98-99%), y esta última especie nunca se recolectó en el bosque donde se obtuvieron las cepas utilizadas en este estudio. Por lo tanto, en conjunto, tanto los datos ecológicos como los moleculares favorecen la identificación de CMU-TA01 como *T. versicolor*.



Los árboles se generaron según los criterios de Parsimonia máxima (MP) y la inferencia bayesiana (BI) usando la región de ADNr ITS (ITS1-5.8S-ITS2). Solo se muestran árboles MP, porque los árboles BI son congruentes con este patrón de agrupación. Se muestra uno de 20 y de 4 árboles igualmente parsimoniosos para las cepas CMU-84/13 (panel a), CMU-47/13 (panel c), respectivamente, y el árbol individual obtenido para la cepa CMU-TA01 (panel b). Los valores de arranque (1000 repeticiones) / probabilidades posteriores bayesianas superiores a 50 / 0.5 se muestran cerca de cada nodo. Para cada secuencia recuperada de GenBank, el nombre de la especie va seguido de su número de acceso.

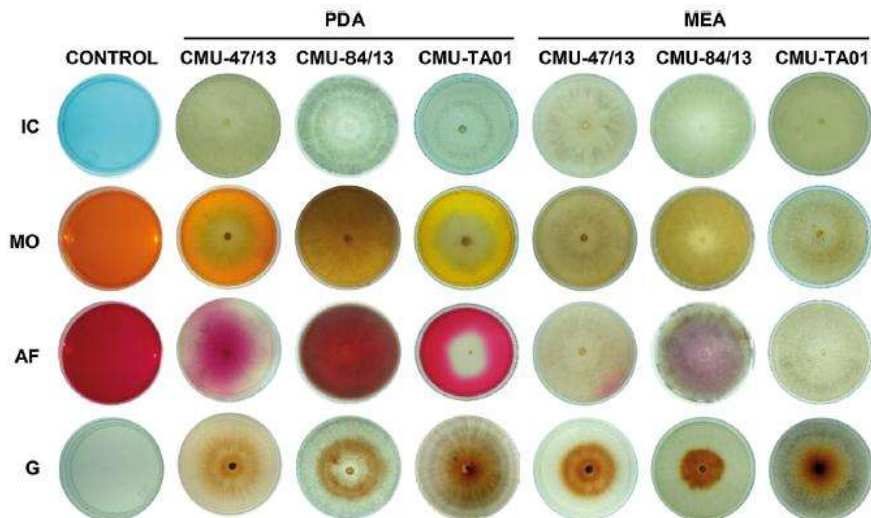
El análisis filogenético muestra que todas las cepas estudiadas están dentro del orden de Polyporales, un grupo complejo con aproximadamente 150 géneros y 40 familias que incluye tanto a la putrefacción blanca como a la putrefacción marrón; los primeros pueden decaer tanto la lignina como los compuestos celulósicos, y este último puede eliminar la celulosa y la hemicelulosa sin causar una degradación significativa de la lignina (Hibbett et al., 2014). El análisis filogenético de Polyporales ha identificado seis clados principales, incluyendo Phlebioid, Core Polyporoid, Residual Polyporoid, Cinereomyces, Tyromyces y Antrodia (Floudas y Hibbett, 2015; Justo y Hibbett, 2011). Las cepas analizadas se distribuyen dentro de dos de estos clados; la cepa CMU-TA01 (complejo de *T. versicolor*) se encuentra dentro del clado Polyporoid Core, mientras que las cepas CMU-84/13 (*I. lacteus*) y CMU-47/13 (*Phlebiopsis* sp.) se encuentran dentro del clado Phlebioid. Este último grupo se subdividió en los subcláusulas *Phlebia*, *Byssomerulius* y *Phanerochaete* (Floudas y Hibbett, 2015), y las cepas CMU-84/13 y CMU-47/13 pertenecen a estos últimos grupos, respectivamente.

Si bien el análisis filogenético proporciona un fuerte apoyo para la identificación de especies de la cepa CMU-84/13 (*I. lacteus*), no fue posible identificar especies inequívocas para la cepa CMU-47/13 (*Phlebiopsis* sp.). Aunque el análisis filogenético molecular asigna claramente la cepa CMU-TA01 dentro del complejo *T. versicolor*, la evidencia ecológica podría ayudar a respaldar su identificación al nivel de especie. Se ha documentado que el análisis de la secuencia ITS no puede resolver las especies dentro de los taxones altamente morfológicamente y secuencialmente similares anteriormente denominados complejo *T. versicolor* (Justo y Hibbett, 2011). Un estudio reciente que utiliza cuatro genes de datos indica que lo que antes era el complejo *T. versicolor* ahora está compuesto por la especie *T. versicolor*, *T. ochracea*, *T.*

pubescensy *T. ectypa* (Carlson et al., 2014). Sin embargo, mientras que la última especie tiene una distribución geográfica restringida y no se encuentra en México, las tres anteriores tienen una distribución amplia en los bosques templados del hemisferio norte, siendo *T. versicolor* el más común (Carlson et al., 2014). Además, *T. versicolor* y *T. ochracea* tienen una alta similitud de secuencia ITS (98-99%), y esta última especie nunca se recolectó en el bosque donde se obtuvieron las cepas utilizadas en este estudio. Por lo tanto, en conjunto, tanto los datos ecológicos como los moleculares favorecen la identificación de CMU-TA01 como *T. versicolor*.

### **3.3.2 Decoloración / oxidación de compuestos fenólicos por cepas fúngicas.**

Todas las cepas probadas fueron capaces de decolorar el índigo carmín, pero el naranja de metilo y la fucsina ácida fueron resistentes a la decoloración (Figura. 12). De las cepas examinadas, ninguna fue capaz de decolorar todos los colorantes fenólicos probados en ambos medios. Se encontraron mejores resultados con *Phlebiopsis* sp. (CMU-47/13) y *T. versicolor* (CMU-TA01), que fueron capaces de decolorar todos los compuestos ensayados en medio AEM, pero no en APD. Todas las cepas evaluadas fueron capaces de oxidar guayacol con diferentes grados de eficiencia (Figura. 12). La evidencia experimental previa demuestra que el MnP es la principal enzima (sobre Lac y LiP) implicada en la decoloración de los colorantes azoicos (Contreras et al. 2012; Yao et al. 2013), observación que concuerda con nuestros resultados y que sugiere que esta enzima tiene un papel principal para la deslignificación de pulpa Kraft (Figura 13). Esta observación indica que el uso de colorantes azoicos es adecuado para seleccionar hongos de deslignificación capaces de producir altos niveles de MnP.



**Figura 12** Decoloración / oxidación de compuestos fenólicos por cepas analizadas.

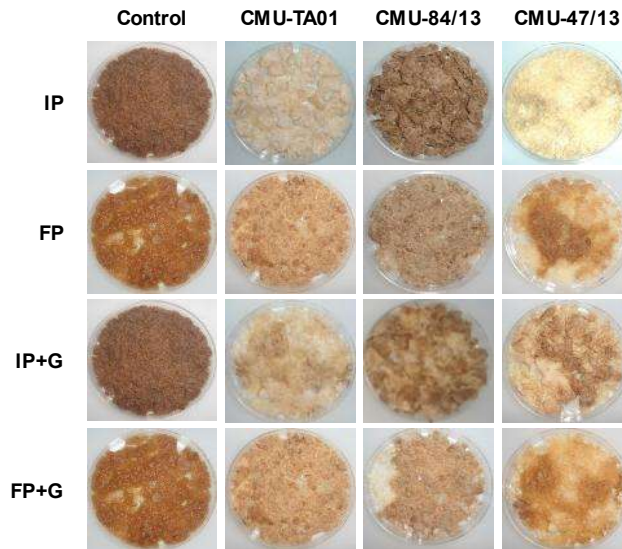
Los ensayos se realizaron en agar dextrosa de papa (PDA) y agar de extracto de malta (MEA) a 28 ° C durante 10 días. La clave CMU de las cepas fúngicas se muestra en la parte superior de cada columna. Las placas de control (C), sin inoculación de hongos, se muestran en la primera columna; el color inicial para cada compuesto fenólico fue el mismo para PDA y MEA, por lo que solo se mostró una placa de control para ambos medios. Los compuestos fenólicos probados son índigo carmín (IC), naranja de metilo (MO), ácido fucsina (AF) y guayacol (G)

Estudios anteriores han utilizado los ensayos de decoloración / oxidación de sustancias fenólicas en medios sólidos para seleccionar hongos para el blanqueo y pulpa de lignina. Por ejemplo, la capacidad de decolorar Poly R-478 y Azure B fue el criterio utilizado para seleccionar *Pycnoporussanguineus* para deslignificar la madera de *Pinustaeda* (Afrida et al., 2014), y se ha utilizado la oxidación de guayacol para producir coloración parduzca en los medios para seleccionar hongos ligninolíticos para tratar la pulpa kraft (Afrida et al., 2009). Índigo carmín fue decolorado eficientemente por las cepas en este estudio, mientras que el naranja metílico y la fucsina ácida fueron recalcitrantes a la decoloración, y todas las cepas probadas tuvieron una reacción de oxidación positiva con guaiacol. Debido a que la decoloración ácida de la fucsina se correlaciona con la alta actividad ligninolítica (ver más abajo), este compuesto, junto

con guaiacol, será una alternativa barata para la selección de cepas, en comparación con Azure B y Poly R-478.

### 3.3.3. Modificaciones de pulpa Kraft originadas por las cepas de hongos.

Con los ensayos simples de fermentación en estado sólido, fue posible observar que las cepas de hongos probadas blanquearon la pasta Kraft con diferentes grados de eficiencia dependiendo de las condiciones de incubación. Si bien las cepas no mostraron blanqueo significativo en los ensayos suplementados con dextrosa (0.5% p / v), los que crecieron en medios sin suministro de carbono mostraron los mejores resultados de blanqueo (Figura. 13). El tamaño de partícula no afectó la eficacia del blanqueo porque las fibras de pulpa fragmentadas se decoloraron con la misma eficacia que se observó en las fibras intactas (Figura. 13). La actividad de blanqueo más fuerte se obtuvo con *Phlebiopsis* sp. (CMU-47/13). El orden decreciente de la eficacia de blanqueo para los tratamientos fue T9 (CMU-47/13) > T1 (CMU-TA01) > T3 (CMU-TA01).



**Figura 13** Blanqueo de la pasta de papel por cepas fúngicas estudiadas.

El blanqueo se muestra en pulpa Kraft intacta de una planta de procesamiento (IP) y en pulpa fragmentada mezclada (FP) sola o con 0,5% (p / v) de dextrosa añadida (IP + G y FP + G). En la parte superior de cada columna se mostró la cepa del código CUM. Los cultivos se incubaron a 28 ° C durante 15 días.

El blanqueo se muestra en la pulpa Kraftintacta(IP) y en pulpa fragmentada (FP) solo o con 0,5% (p / v) de dextrosa añadida (IP + G y FP + G). En la parte superior de cada columna se muestra el código CMU. Los cultivos se incubaron a 28°C durante 15 días.El número kappa de la fibra de pulpa Kraft no tratada fue 13.23, y los tratamientos fúngicos dieron como resultado números kappa que varían de 10.41 en T05 con la cepa CMU-84/13 de *I. lacteus* a 6.83 en T09 con la cepa CMU-47/13 de *Phlebiopsis* sp.; T09 fue el mejor tratamiento general seguido de T01 y T03 con la cepa CMU-TA01 de *T. versicolor* (Tabla 5), y estos correspondieron a reducciones en el número kappa del 48%, 43% y 41%, respectivamente. El resto de los tratamientos con diferentes cepas no redujeron el número kappa en más del 40%, e *I. lacteus* tuvo su mejor resultado con un número kappa de 8.02 en T07, lo que representa una reducción del 39% del valor original (Tabla 5).

**Tabla 5** Numero Kappa de la pulpa Kraft después de tratamientos con cepas de hongos.

Tratamientos	Kappa No. <sup>a</sup>	% reducción <sup>b</sup>
Control	13.23 (0.132)	-
T01	7.53 (0.251)	43.08
T02	9.05 (0.046)	31.59
T03	7.78 (0.124)	41.19
T04	9.55 (0.114)	27.81
T05	10.41 (0.299)	21.31
T06	8.59 (0.144)	35.07
T07	8.02 (0.092)	39.38

T08	9.13 (0.075)	30.99
T09	6.83 (0.108)	48.37
T10	8.60 (0.090)	34.99
T11	8.25 (0.115)	37.64
T12	8.19 (0.096)	38.09

---

<sup>a</sup> El valor en paréntesis es  $\pm$  la desviación estándar obtenida por el análisis por triplicado <sup>b</sup> Valor del % de reducción en el número kappa con respecto al control.

La información sobre el blanqueo y la reducción del número de kappa de la pulpa Kraft tratados con *Phlebiopsis* sp. no había informado anteriormente y encontramos que este taxón podría ser tan eficiente para la reducción del número de kappa (48.3%, Tabla 5) como las especies de pudrición blanca bien estudiadas de los géneros *Trametes*, *Phanerochaete* y otros (Takano et al., 2001; Afrida et al. 2009). Incluso las reducciones de número kappa obtenidas con la cepa CMU-84/13 de *I. lacteus* fueron comparables a los valores reportados previamente reportados (Tabla 5). Este resultado refuerza el argumento a favor de la búsqueda de nuevas especies / cepas para biopulpeo y bioblanqueo, un enfoque que ha contribuido a encontrar cepas prometedoras para esta aplicación biotecnológica, incluso de taxones no ecológicamente asociados a la descomposición de la madera (Oses et al., 2006; Martín -Sampedro et al. 2015). La cepa CMU-84/13 blanquea la pulpa Kraft y reduce su número kappa aproximadamente un 39%. El único estudio previo realizado con *I. lacteus* mostró que una cepa fue capaz de reducir el 46% del número kappa de la pulpa Kraft de la madera de *A. mangium* (Afrida et al., 2009); sin embargo, la pulpa tratada con hongos se deslignificó con oxígeno, y el tiempo de tratamiento fue una semana más que en el presente trabajo

(Tabla 5). En el caso de especies de *T. versicolor*, los porcentajes informados de reducción del número de kappa para los ensayos de fermentación en estado sólido oscilan entre 9.7 y 49.6%, dependiendo del tipo de pulpa y si la pulpa había sido previamente tratada químicamente (Tabla 5). Cabe señalar que el estudio con *T. versicolor* que logró una mejor reducción del número de kappa que el obtenido en el presente trabajo (Tabla 5) utilizó un micronutriente y medios suplementados con vitaminas (Katagiri et al., 1995) y un mayor tiempo de incubación (Afrida et al. 2009). Curiosamente, la cepa estudiada de *L. lacteus* mostró una mayor reducción en el número kappa en condiciones de baja glucosa y pulpa intacta, mientras que *T. versicolor* y *Phlebiopsis* lo hizo en pulpa intacta sin agregar glucosa. Dichos resultados muestran que los hongos de pudrición blanca que evaluamos podrían deslignificar la pulpa Kraft con un procesamiento mínimo, sin condiciones nutritivas especiales y sin mediadores adicionales. En general, los datos previamente discutidos indican claramente que se necesitan más estudios para evaluar las condiciones óptimas para el blanqueo de la pulpa por las cepas estudiadas.

La tabla 6 muestra los resultados de los diferentes tamaños de fibra obtenidos al finalizar los ensayos de fermentación sólida presentados en la tabla 4, esta observación nos permite analizar que la fibra que presentó menor reducción en su tamaño es nuevamente T9 obteniendo un valor de 1.42mm una disminución con respecto al control de 0.36mm

Tabla 6 Longitud de la fibra de celulosa después del tratamiento con cepas fúngicas

Tratamientos	Longitud de la fibra de celulosa (mm) <sup>a</sup>
Control	1.78 (0.110)
Control Fragmentado	1.01 (0.079)
T01	1.35 (0.070)
T02	0.08 (0.086)
T03	1.30 (0.084)
T04	0.73 (0.058)
T05	1.24 (0.060)
T06	0.74 (0.053)

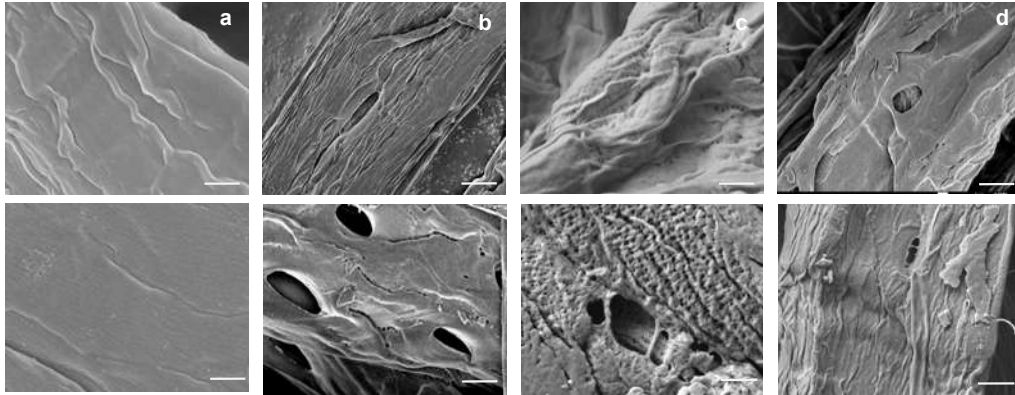
T07	1.17 (0.099)
T08	0.86 (0.072)
T09	1.42 (0.063)
T10	0.68 (0.066)
T11	1.348 (0.097)
T12	0.78 (0.093)

---

<sup>a</sup>Los valores entre paréntesis son  $\pm$ la desviación estándar obtenida de los análisis por triplicado.

---

Las observaciones microscópicas indican una extensa colonización de la superficie de la fibra Kraft de celulosa por los hongos estudiados. Las imágenes SEM muestran que los hongos inicialmente colonizan la fibra que causa la erosión; posteriormente, las áreas erosionadas se llenan con micelio. Las modificaciones de la superficie de la fibra se observan después de una semana de crecimiento fúngico con cambios estructurales, incluida la rugosidad y la estriación de la superficie de la fibra, por lo demás lisa (Figura. 14); otras modificaciones obvias incluyen la presencia de hendiduras y surcos distribuidos a través de la superficie de la fibra (Figura. 14). Para *Phlebiopsis* sp. (CMU-47/13), se observa un aflojamiento de la fibra (Figura. 14c). Las modificaciones estructurales de pulpa de Kraft similares a las descritas en este documento habían sido observadas previamente por SEM usando enzimas lignocelulolíticas. Se observó un aumento en la rugosidad y la estriación en la pulpa Kraft cuando se trató con la lacasa de *Aspergillus fumigatus* y su sistema mediador N-hidroxibenzotriazol (Vivekanand et al., 2008). La pulpa Kraft tratada con la lacasa comercial de *Aspergillus oryzae* y el mediador de siringol metílico se volvió áspera y con una mayor adhesión superficial (Liu et al., 2009b). Además, la pulpa fabricada con residuos de papel tratados con xilanas de un aislado silvestre de *Aspergillus niger* muestra ruptura y apariencia de los poros (Sridevi et al. 2016). Por lo tanto, las modificaciones estructurales de las fibras de pulpa Kraft que observamos son consistentes con las documentadas para mejorar las características de fibra para la producción de papel.



**Figura 14.** SEM de secciones de pulpa Kraft tratadas con cepas de hongos estudiadas.

Las fibras se incubaron a 28°C en 7 días de tratamiento (imágenes superiores) y en 15 días de tratamiento (imágenes inferiores) con las cepas CMU-84/13 (panel b), CMU-47/13 (panel c) y CMU-TA01 (panel d) (Panel a): fibra de control incubada a la misma temperatura sin inoculación fúngica. La aspereza, las hendiduras, los agujeros y la estría no presentes en la fibra de control son evidentes en las fibras tratadas con hongos. Bar = 1  $\mu$ m.

### **3.3.4. Determinación de actividades enzimáticas ligninolíticas extracelulares fúngicas.**

Las regiones reguladoras de genes que codifican enzimas ligninolíticas han sido analizadas en diferentes especies de hongos de podredumbre blanca, pero hay descripciones más detalladas a este respecto para Lac y MnP que para LiP (Janusz et al., 2013). En particular, se han descrito elementos tanto de respuesta metálica (MRE) como de respuesta xenobiótica (XRE) para las regiones reguladoras de los genes Lac y MnP; los primeros responden a los cationes divalentes, y los segundos inducirán niveles transcripcionales de Lac y MnP en respuesta a los compuestos fenólicos relacionados con la lignina. Además, el elemento represor de catabolito (CreA) se ha

encontrado en las regiones reguladoras de ambos genes y es responsable de bajas actividades enzimáticas en presencia de glucosa. Por lo tanto, en el presente trabajo, evaluamos la inducción de enzimas ligninolíticas en las cepas estudiadas para determinar sus respuestas respectivas a  $\text{Cu}_2^+$  y lignina Kraft. La cepa *T. versicolor* (CMU-TA01) fue la única que mostró actividad de tres enzimas ligninolíticas en todas las condiciones de cultivo ensayadas; *I. lacteus* (CMU-84/13) y *Phlebiopsis* sp. (CMU-47/13) no mostró actividad Lac y baja actividad LiP (Figura 15).

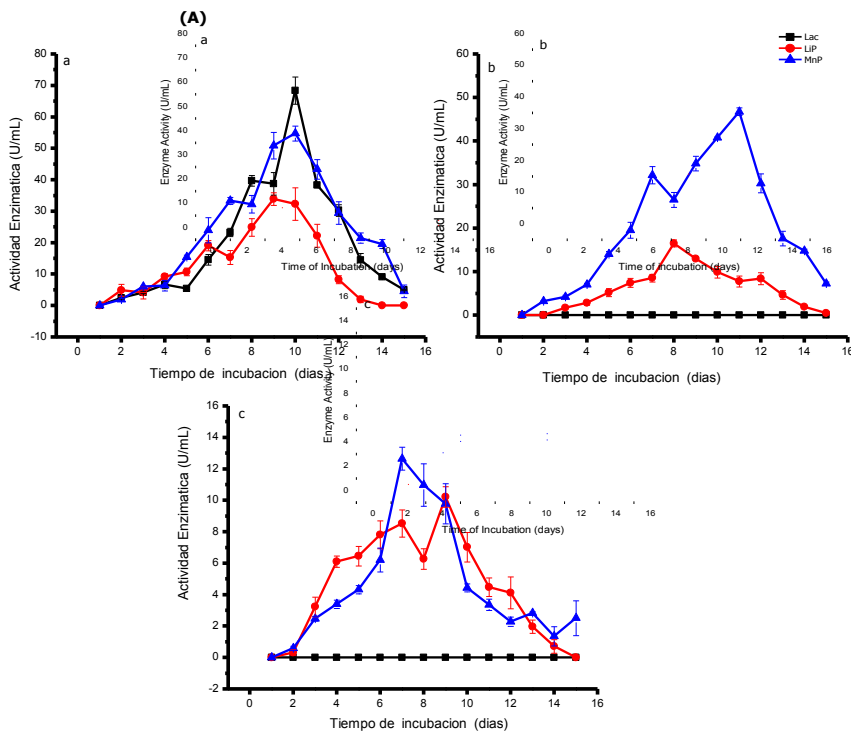


Figura 15. Actividades enzimáticas en medio Basal PDB.

*T. versicolor* también muestra los niveles más altos de todas las actividades ligninolíticas en la mayoría de las condiciones analizadas, que incluyen actividad basal ( $68.37 \pm 4.35$  U / mL) e inducida por  $\text{CuSO}_4$  ( $495.76 \pm 9.71$  U / mL), así como basal

(54.73 ± 2.34 U / mL) e inducida por CuSO<sub>4</sub> (130.08 ± 14.41 U / mL) (Figura 16) actividad de MnP(Tabla 7).

Tabla 7 Actividad enzimática basal e inducida (U/mL) en las cepas de hongos estudiadas

		Cepa de estudio		
Medio	Enzima	<i>T. versicolor</i> (CMU-TA01)	<i>Phlebiopsis</i> sp. (CMU-47/13)	<i>I. lacteus</i> (CMU-84/13)
PDB	Lac	<b>68.37</b> (±4.35)	<b>ND</b>	<b>ND</b>
	MnP	<b>54.73</b> (±2.34)	<b>46.75</b> (±0.87)	<b>12.65</b> (±0.73)
	LiP	<b>33.90</b> (±1.99)	<b>12.97</b> (±0.40)	<b>10.21</b> (±0.65)
PDB+CuSO <sub>4</sub>	Lac	<b>495.76</b> (±9.71)	<b>ND</b>	<b>ND</b>
	MnP	<b>130.08</b> (±14.41)	<b>103.44</b> (±3.24)	<b>18.65</b> (±1.82)
	LiP	<b>43.58</b> (±3.75)	<b>38.85</b> (±3.36)	<b>71.00</b> (±5.11)
PDB+KP	Lac	<b>99.94</b> (±4.58)	<b>ND</b>	<b>ND</b>
	MnP	<b>82.96</b> (±2.99)	<b>75.69</b> (±7.94)	<b>12.75</b> (±0.99)
	LiP	<b>39.06</b> (±4.66)	<b>22.83</b> (±1.05)	<b>8.99</b> (±1.27)

La cepa de *I. lacteus* fue el productor más pobre de las tres enzimas ligninolíticas en la mayoría de los ensayos de cultivo líquido, pero mostró la mayor actividad de LiP inducida por CuSO<sub>4</sub> (71.00 ± 5.11 U / mL). La adición de CuSO<sub>4</sub> a PDB aumenta significativamente la actividad de las enzimas ligninolíticas detectadas en cada una de las cepas estudiadas (Figura 17). En esta condición de cultivo, se produce un aumento máximo de la actividad Lac en la cepa *T. versicolor* (CMU-TA01) (7,25 veces); para MnP, el mayor aumento fue en la cepa *T. versicolor*(CMU-TA01) (2.37 veces), y para LiP, el mayor aumento fue para la cepa *I. lacteus* (CMU-84/13) (6.95 veces) (Tabla8).

Tabla 8. Incrementó en actividades enzimáticas con respecto a actividad basal de los hongos estudiados.

Medio	Enzima	Cepa de estudio		
		<i>T. versicolor</i> (CMU-TA01)	<i>Phlebiopsis</i> ssp. (CMU-47/13)	<i>I. lacteus</i>
PDB	Lac	<b>68.37</b>	<b>0</b>	
	MnP	<b>54.73</b>	<b>46.75</b>	
	LiP	<b>33.90</b>	<b>12.97</b>	
PDB+CuSO <sub>4</sub>	Lac	<b>495.76</b> (7.20)	<b>0</b>	<b>0</b>
	MnP	<b>130.08</b> (2.37)	<b>103.44</b> (2.21)	<b>18.65</b> (1.47)
	LiP	<b>43.58</b> (1.28)	<b>38.85</b> (2.99)	<b>71.00</b> (6.95)
PDB+KP	Lac	<b>99.94</b> (1.46)	<b>0</b>	<b>0</b>
	MnP	<b>82.96</b> (1.51)	<b>75.69</b> (1.61)	<b>12.75</b> (1.007)
	LiP	<b>39.06</b> (1.15)	<b>22.83</b> (1.76)	<b>8.99</b> (0.88)

La adición de pulpa Kraft al medio aumenta diferencialmente las actividades enzimáticas ligninolíticas, pero a una magnitud menor que CuSO<sub>4</sub>; Lac y MnP muestran incrementos significativos para *T. versicolor*, MnP y LiP para *Phlebiopsis*ssp., Y ninguno para *I. lacteus*(Figura 15, Tabla 7). Se ha informado que *Irpexlacteus* muestra tres actividades ligninolíticas distintas cuantificadas en este trabajo cuando se cultivan en medios líquidos (Rothschild et al., 2002; Kasinath et al., 2003). La ausencia de actividad de Lac extracelular que observamos en presencia de sustratos lignocelulósicos se informó previamente (Xu et al., 2009) y algunos estudios documentan niveles bajos o ninguna actividad de LiP y MnP extracelulares en presencia de sustratos lignocelulósicos (Afrida et al. 2014). En el único trabajo previo que informa actividades de enzimas ligninolíticas de *I. lacteus* cultivadas con pulpa Kraft, la cepa utilizada produjo una alta actividad enzimática deMnP, bajo nivel deLac y sin LiP (Afrida et al., 2014), de acuerdo con nuestros resultados. Aunque en *I. lacteus*,

MnP producido referencialmente sobre Lac y LiP, algunas condiciones de cultivo aumentan significativamente la actividad de LiP (Rothschild y otros 2002, Kasinath y otros 2003, Sklenar et al., 2010). Recientemente se informó que dos isoenzimas MnP expresadas de forma heteróloga de *I. lacteus* son capaces de oxidar de manera eficiente los compuestos del modelo de lignina no fenólica; los resultados obtenidos sugieren que esta especie fúngica usa la enzima de MnP como una molécula ácido orgánica que puede secretar, posiblemente malonato u oxalato, para degradar más lignina recalcitrante (Qin et al., 2017). Un análisis bioinformático de la región reguladora de los genes para ambas isoenzimas muestra la presencia de sitios de unión de CreA y XRE (Qin et al. 2017), lo que explica los bajos niveles de MnP en el medio PDB basal y el aumento de la actividad en AP suplementado con KP que observamos. Aunque no se informaron MRE por Qin et al. (2017) en la región reguladora de ambos genes MnP, realizamos una evaluación de las regiones de 1 kb que informaron y encontramos el motivo 50-TGCGCAAC-30 (posición -193 a -186) para lIMnP1 y 50-TGCACAA - 30 (posición -128 a -122) para los genes isoenzimados lIMnP2, que se asemeja al consenso 50-TGCRCNC-30 (R = A / G) descrito como MRE en la región reguladora del gen MnP de varios hongos de podredumbre blanca (Janusz et al. 2013).

Estos supuestos MRE podrían explicar el aumento significativo con respecto al medio de PDB basal de la actividad de MnP en la cepa CMU-84/13 en presencia de  $\text{CuSO}_4$ . No se realizó ningún análisis genómico en el genoma disponible para determinar el número de isoenzimas LiP y sus regiones reguladoras; esta información podría mejorar su producción experimental. Por lo tanto, aunque *I. lacteus* es el productor más pobre de enzimas ligninolíticas extracelulares de las tres cepas estudiadas, la genómica y otras herramientas ómicas podrían ayudar a mejorar su rendimiento en la biorremediación y el biopulpeo. La ausencia de Lac, baja actividad de LiP y alta actividad de MnP en *Phlebiopsis* sp. la cepa documentada en este estudio está respaldada por evidencia genómica reciente que muestra la ausencia de genes Lac en la especie relacionada *P. gigantea* pero la presencia de 3 y 7 genes para LiP y MnP, respectivamente (Hori et al., 2014). Cuando esta especie se incuba con biomasa de gramíneas, presenta patrones de actividad enzimática similares (Baker et al., 2015)

como los que se muestran aquí para *Phlebiopsis* en presencia de pulpa Kraft. Sin embargo, no se han realizado trabajos previos sobre la capacidad de las especies de *Phlebiopsis* para producir enzimas ligninolíticas en presencia de pulpa Kraft; por lo tanto, se necesita más investigación para explorar el potencial biotecnológico de estos taxones en el biopulpeo y el bi blanqueo. La presencia de  $\text{Cu}_2^+$  aumenta significativamente las actividades de Lac y MnP con respecto a PDB no complementado con este catión en *T. versicolor* (Lebrun et al., 2011). Por el contrario, el análisis de transcriptoma en presencia de madera de álamo ha mostrado una regulación positiva de ocho genes LiP, y una regulación negativa de un Lac y Gen MnP cada uno (Zhang et al. 2017).

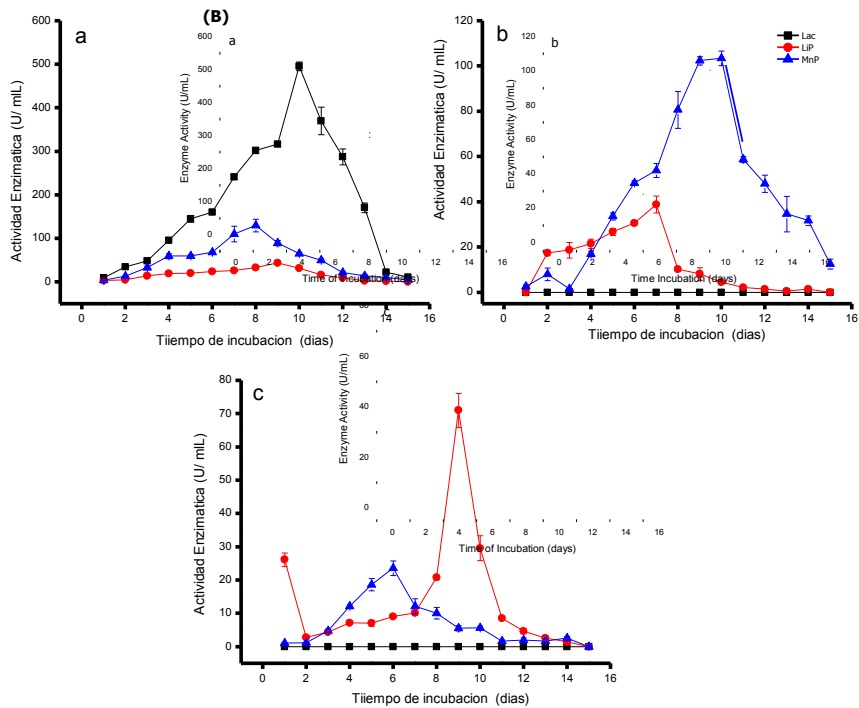


Figura 16. Actividades enzimáticas inducidas con  $\text{CuSO}_4$ .

Sin embargo, el análisis genómico ha documentado la presencia de 26 genes clase II de peroxidasa (relacionados con MnP y LiP) y 10 genes multicopper oxidasa (relación-Lac) en *T. versicolor* (Floudas et al., 2012), indicando claramente que las diferentes condiciones de cultivo en la presencia de celulosa y lignina Kraft debe usarse para aumentar el potencial ligninolítico en tales especies. *T. versicolor* secreta las enzimas LiP, MnP y Lac en presencia de sustratos de madera (Liew et al., 2011; Marti'nez-Morales et al., 2015), pero hay una pequeña investigación en la inducción de estas enzimas ligninolíticas cuando se cultivan en presencia de pulpa Kraft. Los estudios de fermentación en estado sólido de *T. versicolor* realizados en pulpa Kraft suplementada con nitrógeno limitado, pero medio rico en glucosa dieron como resultado un aumento en la actividad de MnP (Katagiri et al., 1995). Se ha documentado que el *T. versicolor* cultivado en pulpa Kraft alcanza actividades muy altas de Lac y MnP (Bermek et al., 2002). Brzonova et al. (2017) mostró que *T. versicolor* era capaz de crecer en medios líquidos que contienen únicamente pasta Kraft comercial, usando y modificando lignina, y que dicha modificación aumenta significativamente añadiendo dimetilsulfóxido (DMSO) al medio de cultivo para aumentar la solubilidad de la lignina. DMSO no inhibió el crecimiento micelial y mejoró las actividades Lac, MnP y LiP. Esta notable transformación de pulpa Kraft con excelente producción de enzimas ligninolíticas extracelulares se logró utilizando una estrategia nombrada por Brzonova et al. (2017) como condiciones casi inmovilizadas, que consisten en utilizar como agar inoculante bloques que contienen pre-crecimiento de micelio en medio sólido de lignina a baja velocidad de agitación. Tal trabajo previo, y los ensayos SSF que presentamos aquí, destacan que es importante realizar ensayos de blanqueo y deslignificación de pulpa Kraft utilizando enfoques experimentales renovados. Por lo tanto, parece que la optimización del blanqueo de pulpa Kraft para la aplicación de hongos de manera económica y eficiente para el tratamiento con lignina está lejos de ser completa

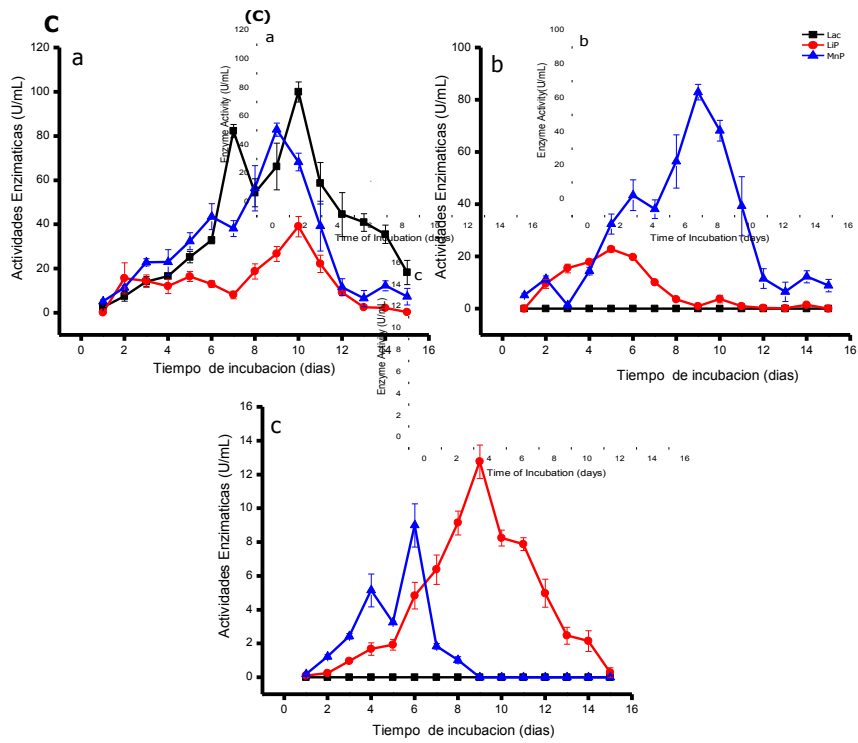


Figura 17. Actividades enzimáticas inducidas con Celulosa.

# CAPÍTULO IV. ANALISIS DE COMPUESTOS DE DEGRADACION.

## 4.1 Introducción

La búsqueda de nuevas materias primas para nuevos procesos que permitan el aprovechamiento de forma integral se engloba en el concepto de biorefinación (Holladay et al., 2007). De acuerdo a los sistemas que las integran las bio-refinerías pueden clasificarse por (IEA Bioenergy, 2010):

- Plataformas de desarrollo: “plataforma de azúcar”, “plataforma del gas de síntesis” etc....
- Productos: combustibles (bioetanol) o materiales (químicos como vainillina).
- Materia prima: puede tener como origen los residuos de la agricultura, residuos forestales y desechos industriales (corteza, aceites que han sido utilizados para cocer, licor negro producto de la cocción de madera etc.).
- Procesos de conversión: bioquímicos (fermentación), termoquímicos (pirólisis), químicos (esterificación) y mecánicos (fraccionar).

La lignina tiene un gran potencial para ser usada como fuente renovable de combustibles y compuestos aromáticos, sin embargo, las tecnologías que permitan su valorización han sido menos desarrolladas que aquellas para la utilización de los polisacáridos de la materia lignocelulósica. La conversión de lignina puede abrir una nueva ruta de producción de combustibles de bajo contenido de carbono y de compuestos aromáticos provenientes de fuentes fósiles, de tal manera que impacte en la viabilidad económica de la planta (Azadi et al., 2013).

Para lignina, el PacificNorthwestNationalLaboratory en 2009 y con el liderazgo de JE Holladay, JJ Bozell, JF White y D Jhonson, realizó un estudio de usos potenciales de la lignina en la biorefinación, principalmente se consideran tres líneas de desarrollo (Holladay et al., 2007):

- a) Energía, combustibles y gas de síntesis (syngas)

- b) Macromoléculas
- c) Compuestos aromáticos y diferentes monómeros

En la primera línea lo que se busca es romper totalmente su estructura polimérica, en la segunda se busca romper de forma selectiva los enlaces que unen de manera natural a las moléculas de gran tamaño que la forman y por último se tiene una posición intermedia entre la primera y segunda línea de desarrollo que busca obtener los compuestos aromáticos mediante la ruptura de la compleja estructura molecular (Holladay et al., 2007).

Se empleo la técnica de electroforesis capilar (EC) con el objetivo de analizar compuestos aromáticos de bajo peso molecular que son usados generalmente en una variedad de industrias como solvente o reactivo químico. De acuerdo con el uso de los aromáticos derivados de la lignina, se tiene dos escenarios:

- ✓ Producción de los compuestos aromáticos más comunes (benceno, tolueno, xileno) que son fácilmente incorporados a productos y procesos industriales ya existentes.
- ✓ Producción de fenoles alquilados con alto grado de similitud a los monolignoles que ocurre en lograr modificar los procesos industriales existentes para poder incorporar los monolignoles extraíbles de la lignina.

De tal forma es que la lignina puede ser utilizada como materia prima para la generación de nuevos productos mediante técnicas ya desarrolladas o novedosas.

## 4.2 Metodología

### 4.2.1. Evaluación de Extractos enzimáticos sobre Lignina y pulpa Kraft.

Se tomó 10 mL de 3 extractos enzimáticos seleccionados (TA Dia 9; *IrpexLacteus* Dia 10; *Phlebiopsis* Dia 10) por su alta actividad enzimática la cual se indujo con  $\text{CuSO}_4$  y se procedió a inocularlos en medios a base de lignina técnica y pulpa Kraft.

Se tomaron muestras cada 2 horas durante 72 horas, con el objetivo de confirmar la degradación de la lignina se analizaron dichas muestras por medio de la identificación

de los productos metabólicos, de estándares y las muestras tratadas por electroforesis Capilar.

#### **4.2.2. Electroforesis Capilar**

Para el análisis por electroforesis capilar se empleó un equipo P/ACE MDQ Beckman Coulter (Posgrado de Ciencias Médicas y Biológicas en UMSNH), con detector UV (190 – 380 nm), un capilar de sílice fundida de diámetro interno: 50  $\mu\text{m}$  y diámetro externo de 365  $\mu\text{m}$ , con longitud total de 50 cm y longitud al detector de 10 cm, respectivamente, y una fuente de poder con polaridad positiva. El tratamiento de los datos obtenidos utilizó el *software* 32 Karat. La solución *buffer* empleada fue de 40 Mm de  $\text{Na}_2\text{N}_4\text{O}_7$ , 10  $\text{H}_2\text{O}$  pH 9. La separación electroforética se realizó a 20 kV y 20°C durante 15 min. La detección se realizó a 210 nm. Empleando un detector de arreglo de diodos con una longitud de onda de 201nm, una temperatura controlada de 25°C y un campo eléctrico constante, en polaridad normal (+) e inversa (-). Para el acondicionamiento diario del capilar, al inicio de cada jornada, se realizó un lavado con agua (3 min), metanol (3 min), ácido clorhídrico (5 min) e hidróxido de sodio (15 min) y para el lavado entre corridas se empleó la misma solución *buffer* descrita anteriormente (5 min).

### **4.3. Resultados**

#### **4.3.1. Identificación de compuestos de degradación por medio de Electroforesis capilar**

Se analizaron los tiempos de retención de cuatro estándares grado reactivo (Tabla 9) bajo las condiciones del ensayo como primer acercamiento al desarrollo del método de identificación.

**Tabla 9** Tiempo de retención en electroforesis Capilar de estándares

Estándar	Formula Química	Peso Molecular (g/mol)	Tiempo de retención (min)
Guayacol	$C_7H_8O_2$	124.14	4.16
Alcohol Sinapilico	$C_{11}H_{14}O_4$	210.23	4.36
Vainillina	$C_8H_8O_3$	152.15	7.86
Acido 4-Hidroxibenzoico	$C_7H_6O_3$	138.12	11.29

Se analizaron los extractos enzimáticos sobre los sustratos seleccionados Celulosa Kraft (CS) Lignina Kraft (L) tomando muestra cada 4 horas los resultados se muestran en la tabla 10

**Tabla 10** Análisis de Muestras en electroforesis Capilar

Muestra	Tiempo de retención en (min)	Compuesto encontrado
1. CSIRP 1	Pico 1: 2.06 Pico 2: 5.23	N.D
2. CSIRP 3	Pico 1: 2.00 Pico 2: 5.49	N.D
3. CSIRP 6	Pico 1: 3.66 Pico 2: 3.85 Pico 3: 4.26	Alcohol Sinapilico
4. CSTA1	Pico 1: 1.22 Pico 2: 6.63 Pico 3: 6.69 Pico 4: 16.08 Pico 5: 16.19	N.D
5. CSTA3	Pico 1: 2.06 Pico 2: 5.12 Pico 3: 5.36 Pico 4: 6.07	N.D
6. CSTA6	Pico 1: 2.12 Pico 2: 5.14 Pico 3: 5.43	N.D

<b>7. CS47131</b>	Pico 1: 2.06 Pico 2: 5.27	N.D
<b>8. CS47133</b>	Pico 1: 1.56 Pico 2: 6.50 Pico 3: 16.62	N.D
<b>9. CS47136</b>	Pico 1: 1.87 Pico 2: 4.78 Pico 3: 5.51 Pico 4: 5.92	N.D
<b>10. LIRP1</b>	Pico 1: 2.15 Pico 2: 4.26 Pico 3: 4.86 Pico 4: 6.50	Alcohol Sinapilico
<b>11. LIRP3</b>	Pico 1: 2.10 Pico 2: 4.32 Pico 3: 4.91 Pico 4: 6.57	Alcohol Sinapilico
<b>12. LIRP6</b>	Pico 1: 2.06 Pico 2: 4.39 Pico 3: 6.70	Alcohol Sinapilico
<b>13. LTA1</b>	Pico 1: 4.35	Alcohol Sinapilico
<b>14. LTA3</b>	Pico 1: 4.39	Alcohol Sinapilico
<b>15. LTA3</b>	Pico 1: 4.36	Alcohol Sinapilico
<b>16. L47131</b>	Pico 1: 4.37	Alcohol Sinapilico
<b>17. L47133</b>	Pico 1: 4.39	Alcohol Sinapilico
<b>18. L47136</b>	Pico 1: 4.37	Alcohol Sinapilico

\*N.D. No determinado

## REFERENCIAS

- Addleman K, Archibald F (1993) Kraft pulp bleaching and delignification by dikaryons and monokaryons of *Trametes versicolor*. *Appl Environ Microbiol*59(1):266-273
- Adler, E. (1977). Lignin Chemistry: Past, present and future. *Wood Science and Technology* , 169-218.
- Afrida S, Tamai Y, Watanabe T, Osaki M (2009) Screening of white rot fungi for biobleaching of *Acacia* oxygen-delignified kraft pulp. *World J MicrobiolBiotechnol*25(4):639-647
- Afrida S, Tamai Y, Watanabe T, Osaki M (2014) Biobleaching of *Acacia*kraft pulp with extracellular enzymes secreted by *Irpexlacteus* KB-1.1 and *Lentinustigrinus* LP-7 using low-cost media. *World J MicrobiolBiotechnol*30(8):2263-2271
- Arantes V, Milagres AM, Filley TR, Goodell, B (2011) Lignocellulosic polysaccharides and lignin degradation by wood decay fungi: the relevance of nonenzymatic Fenton-based reactions. *J IndMicrobiolBiotechnol* 38(4):541-555
- Aro, N., Pakula, T., y Penttila, M. (2005) Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiol. Rev.*, **29**:719-739.
- Aust, S.D. (1990). Degradation of enviromentalpollutans by *Phanerochaetechrysosporium*. *Microb. Ecol.*, 20:197-209.
- Azadi, P., Inderwildi, O. R., Farnood, R., King, D. A., 2013. Liquid fuels, hydrogen and chemicals from lignin: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 21, 506 – 523.
- Baker PW, Charlton A, Hale MD (2015) Increased delignification by white rot fungi after pressure refining *Miscanthus*. *Bioresour Technol* 189:81-86
- Berrin JG, Navarro D, Couturier M, Olivé C, Grisel S, Haon M et al (2012) Exploring natural fungal biodiversity from tropical and temperate forests to improve biomass conversion. *Appl Environ Microbiol* 78(18):6483–6490
- Blanchette, R. A. (1995). Degradation of the lignocellulose complex in wood. *Can. J. Bot.*, **73**: S999-S1010.
- Bourbonnais R, Paice MG (1992) Demethylation and delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor* laccase in the presence of 2, 2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *Appl Environ Microbiol*36(6):823-827
- Brunow, G. (2001) Methods to reveal the structure of lignin. En: Hofrichter, M. ySteinbüchel, A. (Eds). *Biopolymers*. Wiley-VCH. Weinheim
- Call, HP. 1997. History, overview and applications of mediated ligninolytic systems, especially laccasemediator-systems (Lignozym-Process). *Journal of Biotechnology*.53:163-202.
- Carlson AL, Justo A, Hibbett DS (2014) Species delimitation in *Trametes*: a comparison of ITS, RPB1, RPB2 and TEF1 gene phylogenies. *Mycologia*106(4):735–745
- Claus, H. 2003. Laccases and their ocurrence in prokaryotes. *Archives Microbiology*.179: 145-150.
- Diez, P. F. (2014). *Libros sobre Ingeniería Energética*. Retrieved from [Biblioteca sobre Ingeniería Energética: es.pfernandezdiez.es](http://Biblioteca sobre Ingeniería Energética: es.pfernandezdiez.es)

- Doherty William O.S., Mousavioun Payam, Fellows, Christopher M. 2010. Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. *Industrial Crops and Products*. 33, 259 – 276.
- FAO. (2013, Enero 8). *FAOSTAT*. Retrieved from <http://faostat.fao.org/site/628/default.aspx>
- Fahr, K., Wetzstein, H. and Grey, R. 1999. Degradation of 2,4-dichlorophenol and pentachlorophenol by two brown rot fungi. *FEMS MicrobiolLetters*. 175:127-32.
- Fernández, J. and Henao, L. 2007. Evaluación de tres hongos basidiomicetos inmovilizados en *luffaCylindricay* fotocatalisis con TiO<sub>2</sub> Para la remoción del Negro reactivo 5. *Microbiólogo industrial*. Pontifica Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Depto. Microbiología. Bogotá. 154p.
- Fengel, D., & G, W. (1989) *Wood: Chemistry, ultraestructure, reacciones*. Berlin-New York: Walter de Gruyter.
- Floudas D, Binder M, Riley R, Barry K, Blanchette RA, Henrissat B, Martínez AT et al (2012) The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science* 336(6089):1715-1719
- Floudas D, Hibbett DS (2015) Revisiting the taxonomy of *Phanerochaete* (Polyporales, Basidiomycota) using a four gene dataset and extensive ITS sampling. *Fungal Biol* 119(8):679-719
- Freudenberg, K., & Neish, A. (1968) *The Constitution and Biosynthesis of lignin*. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Garmaroody ER, Resalati H, Fardim P (2012) Modification of kraft pulp fibers by fungal pre-treatment of Iranian hornbeam chips. *IntBiodeteriorBiodegrad* 70:20-26
- Gayosso, M., Leal, E. and Rodríguez, R. 2004. Evaluación de la actividad enzimática de *Pleurotostreatusen* presencia de bifenilos policlorados. *Revista Iberoamericana*. 23:76-81.
- Gómez, C., Martínez, M., Mosquera, D., Pedroza, A., Rodríguez, R. and Rosas, J. 2005. Estudio del efecto de dos inductores y un protector enzimático sobre la actividad de las enzimas manganeso peroxidasa y lacasa producidas por *Trametesversicolor* y su efecto en la decoloración de efluentes de la industria papelera. *UniversitasScientiarum*. 10: (2) 37-45.
- Hatakka A, Hammel KE (2010) Fungal biodegradation of lignocelluloses. In: Hofrichter M (ed) *The Mycota X, Industrial Applications*, 2nd edn. Springer, Berlin, pp 319-340
- Higuchi, T. (1985). *Biosynthesis and biodegradation of wood components*. Academic Press, Orlando.
- Hibbett DS, Bauer R, Binder M, Giachini AJ, Hosaka K, Justo A, Larsson E, et al (2014) In McLaughlin DJ, Spatafora JW (eds) *The Mycota VII Part A, Agaricomycetes, Systematics and Evolution*, 2nd edn. Springer, Berlin, pp 373-429
- Hori C, Ishida T, Igarashi K, Samejima M, Suzuki H, Master E, Larrondo LF (2014) Analysis of the *Phlebiopsisgigantea* genome, transcriptome and secretome provides insight into its pioneer colonization strategies of wood. *PLoS Genet* 10(12):e1004759

Holladay, J., Bozell, J., White, J., & Johnson, D. (2007). Top Value Added Chemicals from Biomass Volume II Results of Screening for Potential Candidates from Biorefinery Lignin. Oak Ridge TN: Pacific Northwest National Laboratory.

Huelsenbeck JP, Larget B, Alfaro ME. 2004. Bayesian phylogenetic model selection using reversible jump Markov chain Monte Carlo. *MolBiolEvol* 21:1123–1133

Justo A, Hibbett DS (2011) Phylogenetic classification of *Trametes* (Basidiomycota, Polyporales) based on a five-marker dataset. *Taxon* 60:1567-1583

IEA Bioenergy. (2010). IEA Bioenergy Task 42 Biorefinery. Retrieved Junio 30, 2012, from [http://www.biorefinery.nl/fileadmin/biorefinery/docs/Brochure\\_Totaal\\_definitief\\_HR\\_opt.pdf](http://www.biorefinery.nl/fileadmin/biorefinery/docs/Brochure_Totaal_definitief_HR_opt.pdf)

Katagiri N, Tsutsumi Y, Nishida T (1995) Correlation of brightening with cumulative enzyme activity related to lignin biodegradation during biobleaching of kraft pulp by white rot fungi in the solid-state fermentation system. *Appl Environ Microbiol* 61(2):617-622

Katoh K, Kuma K, Toh H, Miyata T. 2005. MAFFT 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Res* 33:511-518

Khonzue P, Laothanachareon T, Rattanaphan N, Tinnasulanon P, Apawasin S, Paemane A, et al (2011) Optimization of xylanase production from *Aspergillus niger* for biobleaching of eucalyptus pulp. *BiosciBiotechnolBiochem* 75(6):129-1134

Kiiskinen LL, Rättö M, Kruus K (2004) Screening for novel laccase-producing microbes. *J ApplMicrobiol* 97(3):640-646

Levin L, Villalba L, Da Re V, Forchiassin F, Papinutti L (2007) Comparative studies of loblolly pine biodegradation and enzyme production by Argentinean white rot fungi focused on biopulping processes. *Process Biochem* 42(6):995-1002

Liew CY, Husaini A, Hussain H, Muid S, Liew KC, Roslan HA (2011) Lignin biodegradation and ligninolytic enzyme studies during biopulping of *Acacia mangium* wood chips by tropical white rot fungi. *World J MicrobiolBiotechnol* 27(6):1457-1468

Linde D, Ruiz-Dueñas FJ, Fernández-Fueyo E, Guallar V, Hammel KE, Pogni R, Martínez AT (2015) Basidiomycete DyPs: Genomic diversity, structural–functional aspects, reaction mechanism and environmental significance. *Arch BiochemBiophys* 574:66-74

Liu K, Raghavan S, Nelesen S, Linder CR, Warnow T (2009a) Rapid and accurate large-scale coestimation of sequence alignments and phylogenetic trees. *Science* 324:1561-1564

Liu N, Shi S, Gao Y, Qin M (2009b) Fiber modification of kraft pulp with laccase in presence of methyl syringate. *Enzyme Microb Technol* 44(2):89-95

Machii Y, Hirai H, Nishida T (2004) Lignin peroxidase is involved in the biobleaching of manganese-less oxygen-delignified hardwood kraft pulp by white-rot fungi in the solid-fermentation system. *FEMS Microbiol Lett* 233(2):283-287

McGuirl, M. and Dooley, D.M. 1999. Copper-containing oxidases. *Curr Opin Chem Biol.* 3:138-44.

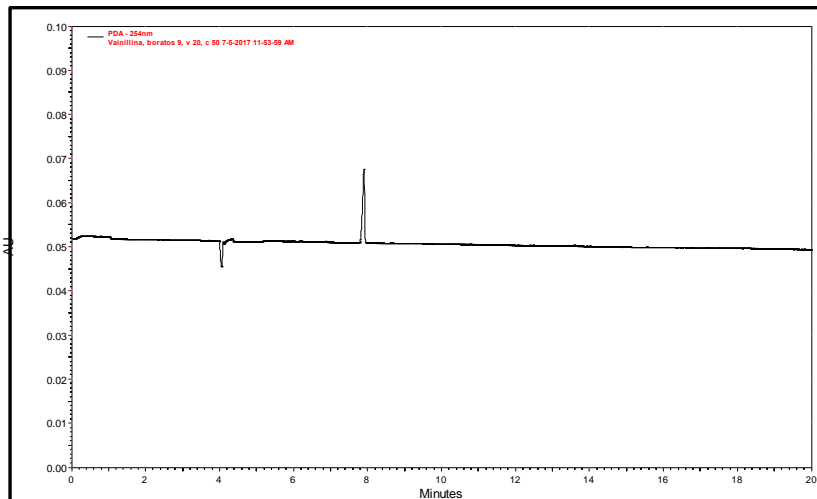
- Martínez-Morales F, Bertrand B, Nava AAP, Tinoco R, Acosta-Urdapilleta L, Trejo-Hernández MR (2015) Production, purification and biochemical characterization of two laccase isoforms produced by *Trametes versicolor* grown on oak sawdust. *Biotechnol Lett* 37(2):391-396
- Masarin F, Norambuena M, Ramires HO, Demuner BJ, Pavan PC, Ferraz A (2016) Manganese peroxidase and biomimetic systems applied to in vitro lignin degradation in *Eucalyptus grandis* milled wood and kraft pulps. *J Chem Technol Biotechnol* 91(5):1422-1430
- Menon, Vishnu. Rao, Mala. (2012) Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals and biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*. 1 – 29.
- Moldes D, Vidal T (2012) Laccase for biobleaching of eucalypt kraft pulp by means of a modified industrial bleaching sequence. *Biotechnol Prog* 28(5):1225-1231
- Nagai M, Sato T, Watanabe H, Saito K, Kawata M, Enei H (2002) Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes* and decolorization of chemically different dyes. *Appl Microbiol Biotechnol* 60(3):327-335
- Nyanhongo GS, Gomes J, Gübitz GM, Zvaunya R, Read J, Steiner W (2002) Decolorization of textile dyes by laccases from a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Water Res* 36(6):1449-1456
- Paice MG, Jurasek L, Ho C, Bourbonnais R, Archibald F (1989) Direct biological bleaching of hardwood kraft pulp with the fungus *Coriolus versicolor*. *TAPPI J* 72:217-221
- Paice MG, Reid ID, Bourbonnais R, Archibald FS, Jurasek L (1993) Manganese peroxidase, produced by *Trametes versicolor* during pulp bleaching, demethylates and delignifies kraft pulp. *Appl Environ Microbiol* 59(1):260-265
- Pinzón, C. 2004. Implementación de un biorreactor de lecho fijo operado con pulsaciones de aire y oxígeno empleando *Pleurotostreatus* inmovilizado en espuma de poliuretano para reducir el color de efluentes provenientes de la industria papelera. Tesis de maestría de microbiología industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Depto. Microbiología. Bogotá. 211 p.
- Rambaut A. (2014). FigTree 1.4.2. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. Accessed 1 Nov 2016
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol* 61(3):539-542
- Roy BP, Archibald F (1993) Effects of kraft pulp and lignin on *Trametes versicolor* carbon metabolism. *Appl Environ Microbiol* 59(6):1855-1863
- Salvachúa D, Martínez AT, Tien M, Lopez-Lucendo MF, García F, de Los Ríos V, Martínez MJ, Prieto A (2013) Differential proteomic analysis of the secretome of *Irpex lacteus* and other white-rot fungi during wheat straw pretreatment. *Biotechnol Biofuels* 6:115
- Sakakibara, A., & Sano, Y. (2000). Chemistry of Lignin. In D. N.-S. Hon, & S. Nabuo, Wood and Cellulosic Chemistry (pp. 109-110). New York: MARCEK DEKKER.
- Sjöström, E. (1981). Wood Chemistry Fundamental and Applications. New York: Academic Press.

- Skyba O, Douglas CJ, Mansfield SD (2013) Syringyl-rich lignin renders poplars more resistant to degradation by wood decay fungi. *Appl Environ Microbiol* 79(8):2560-2571
- Stamatakis A (2006) RAxML-VI-HPc: maximum likelihood based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22:2688–2690
- Swofford DL (2003) PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony. Version 4. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates. [https://people.sc.fsu.edu/~dswofford/paup\\_test/](https://people.sc.fsu.edu/~dswofford/paup_test/) Accessed 3 Oct 2016
- Tian XF, Fang Z, Guo F (2012) Impact and prospective of fungal pre-treatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Biofuels Bioprod Biorefining* 6(3):335-350
- Tien M, Kirk TK (1988) Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Meth Enzymol* 161:238-249
- Torres CE, Negro C, Fuente E, Blanco A (2012) Enzymatic approaches in paper industry for pulp refining and biofilm control. *Appl Microbiol Biotechnol* 96(2):327-344
- Vivekanand V, Dwivedi P, Sharma A, Sabharwal N, Singh RP (2008) Enhanced delignification of mixed wood pulp by *Aspergillus fumigatus* laccase mediator system. *World J Microbiol Biotechnol* 24(12):2799-2804
- Wariishi H, Valli K, Gold MH (1992) Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators. *J Biol Chem* 267(33):23688-23695
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, California, pp 315–322
- Wolfaardt F, Taljaard J, Jacobs A, Male J, Rabie C (2004) Assessment of wood-inhabiting basidiomycetes for biokraft pulping of softwood chips. *Bioresour Technol* 95:25-30
- Woolridge EM (2014) Mixed enzyme systems for delignification of lignocellulosic biomass. *Catalysts* 4(1):1-35
- Xu C, Ma F, Zhang X (2009) Lignocellulose degradation and enzyme production by *Irpex lacteus* CD2 during solid-state fermentation of corn stover. *J Biosci Bioeng* 108:372-375
- Zakzeski, J., Bruijninx P. C. A., Jongerius, A. L., Weckhuysen, B. M., 2010. The catalytic valorization of lignin for the production of renewable chemicals. *Chemical Reviews*. 110, 3552 – 3599.
- Zerva A, Zervakis GI, Christakopoulos P, Topakas E (2016) Degradation of olive mill wastewater by the induced extracellular ligninolytic enzymes of two wood-rot fungi. *J Environ Manage* Doi:10.1016/j.jenvman.2016.02.042
- Zille, A., Tzanov, T., Gubit, G. and Cavaco, A. 2003. Immobilized laccase for decolourization of Reactive Black 5 dyeing effluent. *Biotechnology Letters*. 25: 1473– 1477.

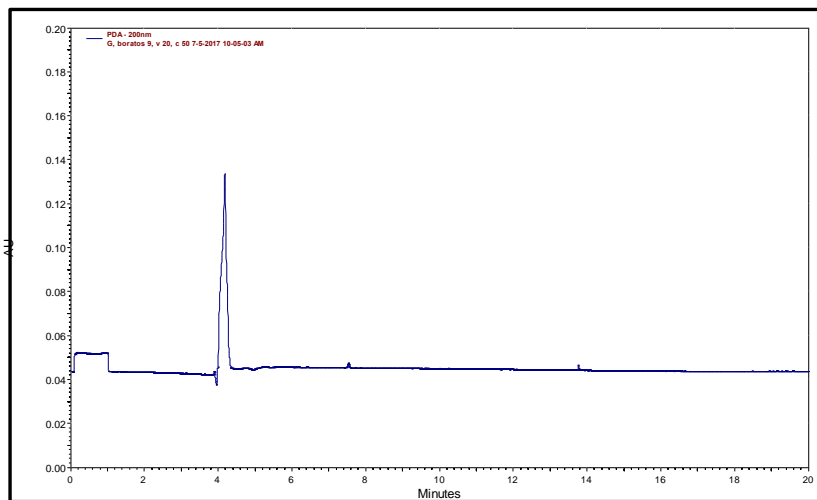
# APÉNDICE

## Apéndice A: Cromatogramas de Electroforesis Capilar

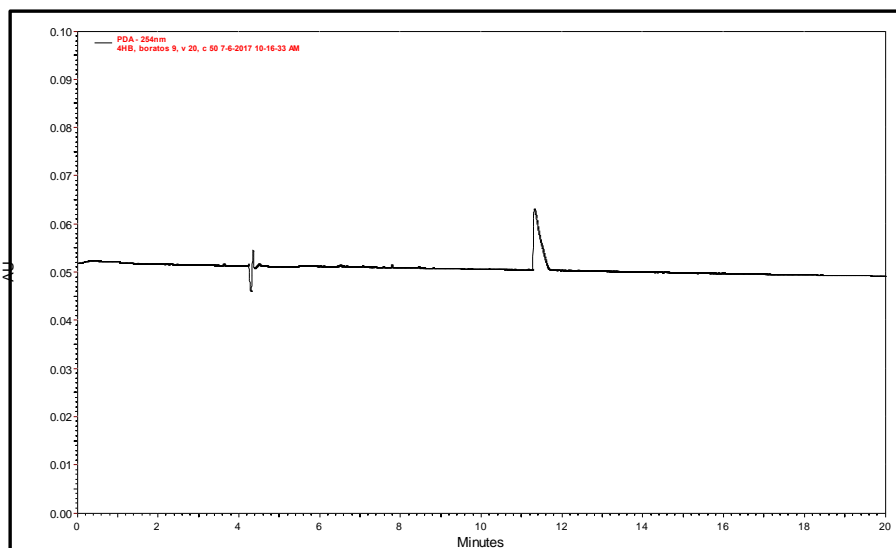
- Vainillina; Tiempo de retención: 7.86



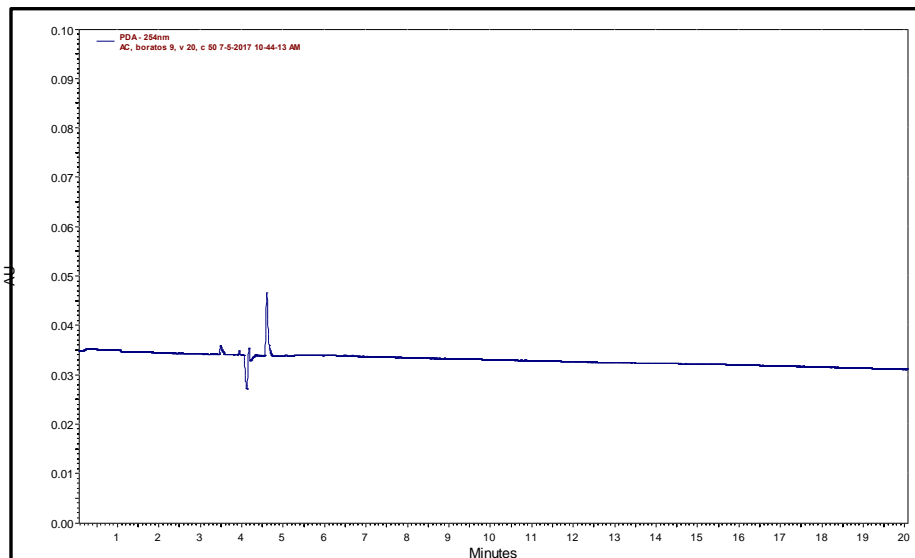
- Guayacol; Tiempo de retención: 4.15 min.



- Acido 4-Hidroxibenzoico; Tiempo de retención: 11.29 min.



- Alcohol Sinapilico; Tiempo de retención: 4.54 min.

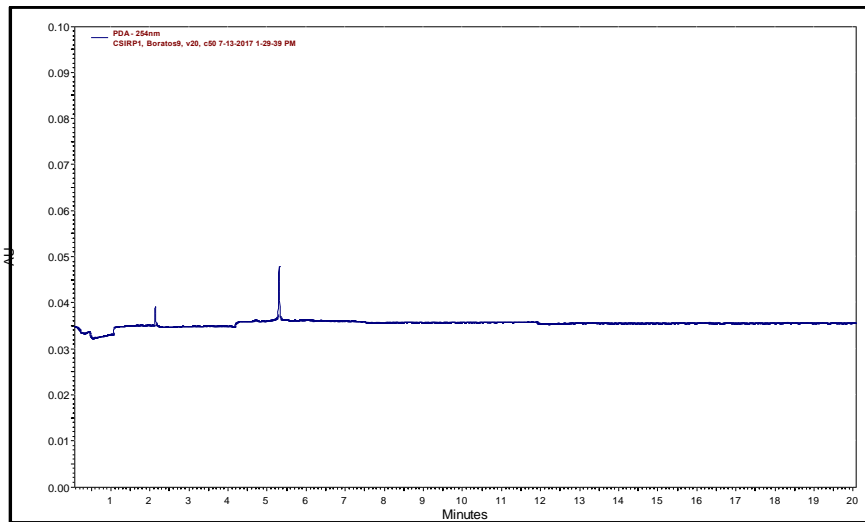


### CSIRP 1

Tiempo de retencion pico 1; 2.06

Tiempo de retencion pico 2: 5.23 min

Longitud de onda: 254

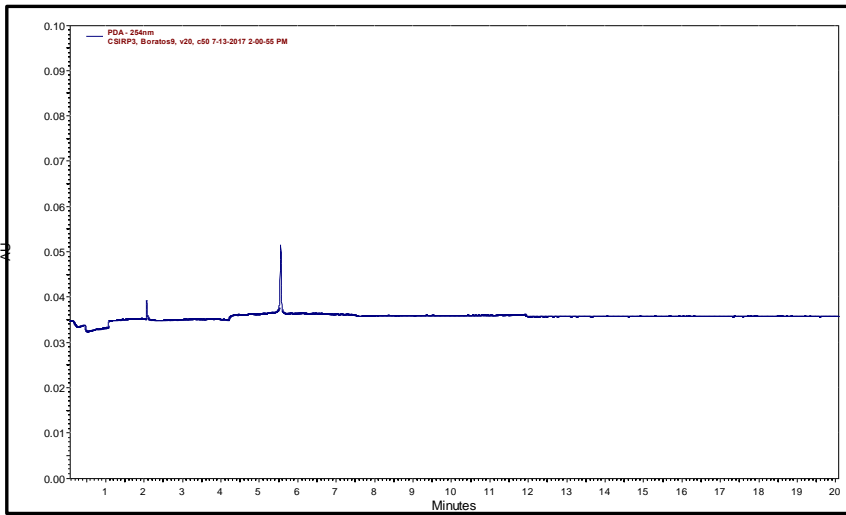


### CSIRP 3

Tiempo de retención pico 1; 2.00

Tiempo de retención pico 2: 5.49 min

Longitud de onda: 254



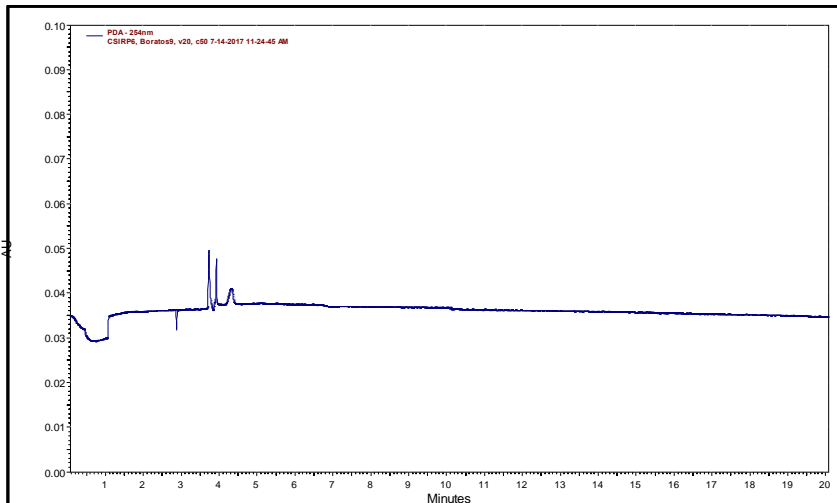
### CSIRP 6

Tiempo de retención pico 1; 3.66 min.

Tiempo de retención pico 2: 3.85 min.

Tiempo de retención pico 3; 4.26 min.

Longitud de onda: 254



## CSTA1

Tiempo de retención pico 1: 1.22 min.

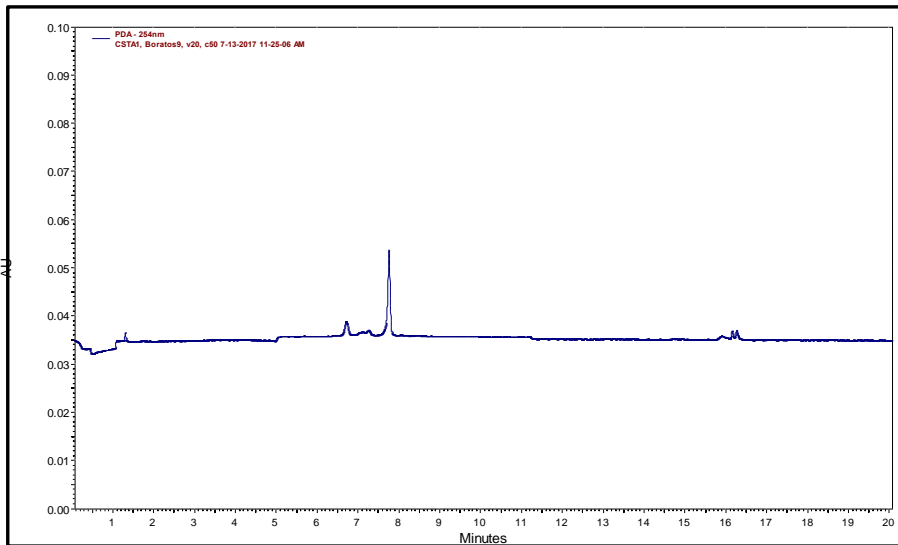
Tiempo de retención pico 2: 6.63 min.

Tiempo de retención pico 3; 6.69 min.

Tiempo de retención pico 4: 16.08 min.

Tiempo de retención pico 5: 16.19 min.

Longitud de onda: 254



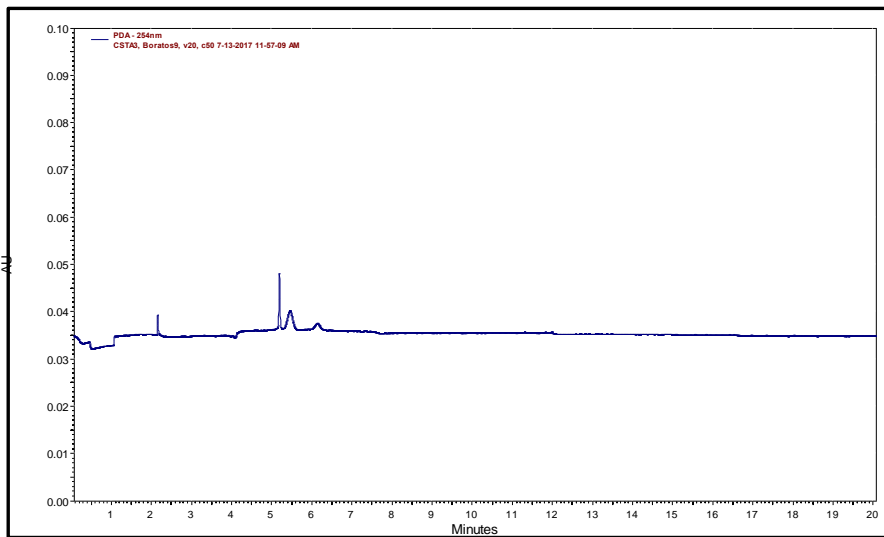
## CSTA3

Tiempo de retención pico 1: 2.06 min.

Tiempo de retención pico 2: 5.12 min.

Tiempo de retención pico 3; 5.36 min.

Tiempo de retención pico 4: 6.07 min.

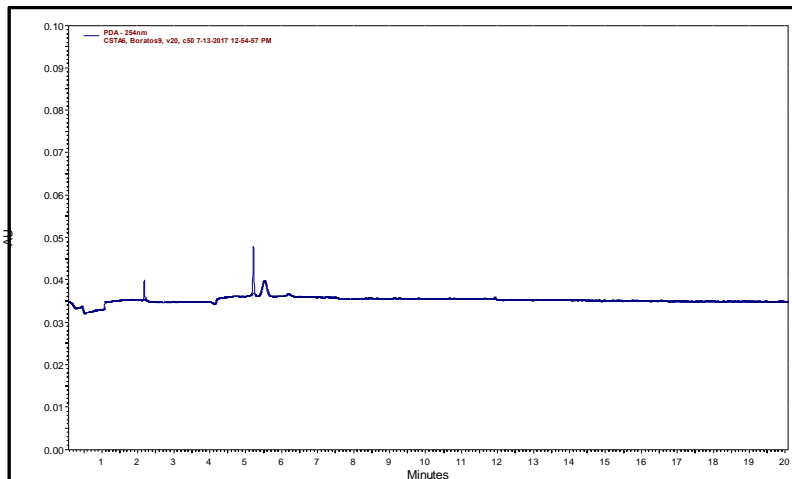


### CSTA1

Tiempo de retención pico 1: 2.12 min.

Tiempo de retención pico 2: 5.14 min.

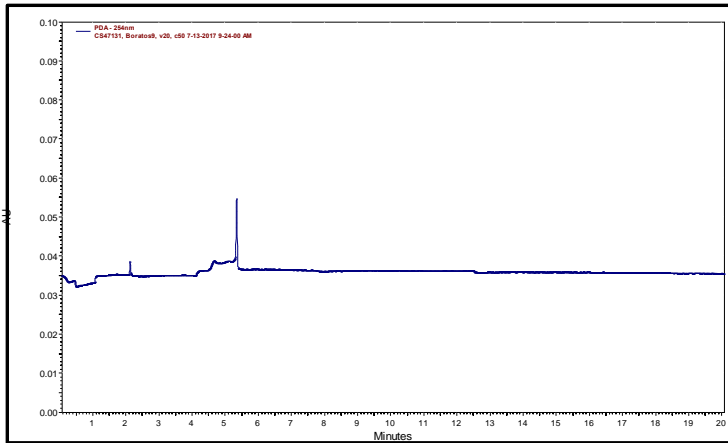
Tiempo de retención pico 3; 5.43 min.



### CS47131

Tiempo de retención pico 1: 2.06 min.

Tiempo de retención pico 2: 5.27 min.

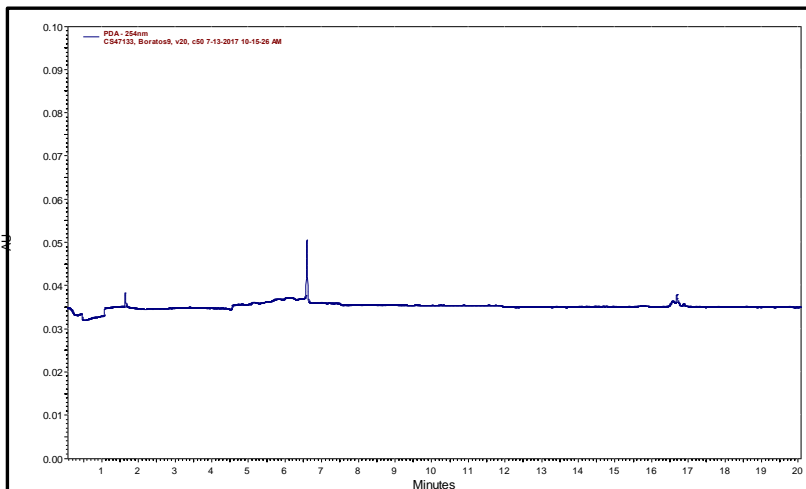


### CS47133

Tiempo de retención pico 1: 1.56 min.

Tiempo de retención pico 2: 6.50 min.

Tiempo de retención pico 3: 16.62 min.



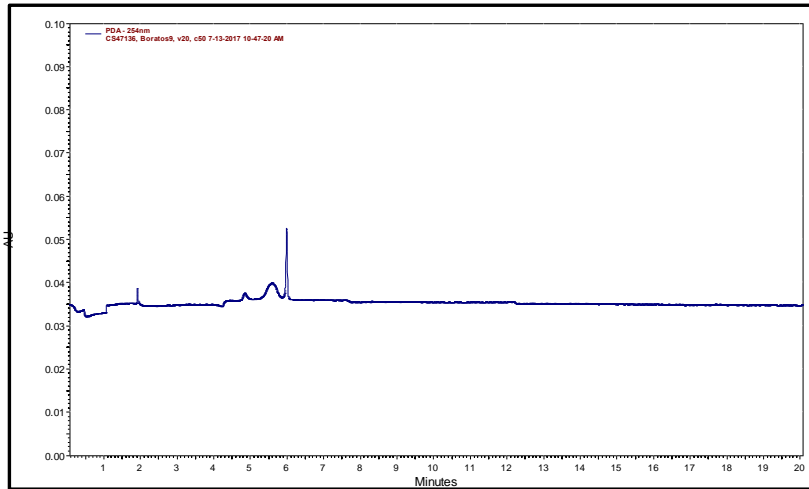
## CS47136

Tiempo de retención pico 1: 1.87 min.

Tiempo de retención pico 2: 4.78 min.

Tiempo de retención pico 3: 5.51 min.

Tiempo de retención pico 4: 5.92 min.



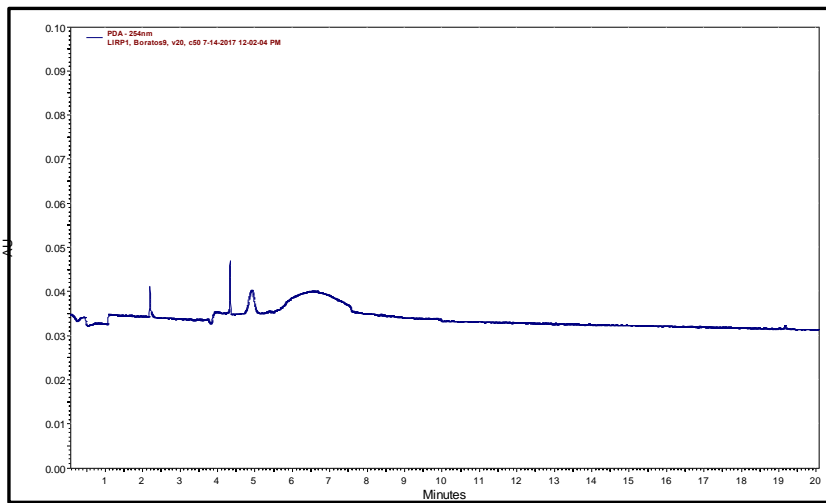
## LIRP1

Tiempo de retención pico 1: 2.15 min.

Tiempo de retención pico 2: 4.26 min.

Tiempo de retención pico 3: 4.86 min.

Tiempo de retención pico 4: 6.50 min.



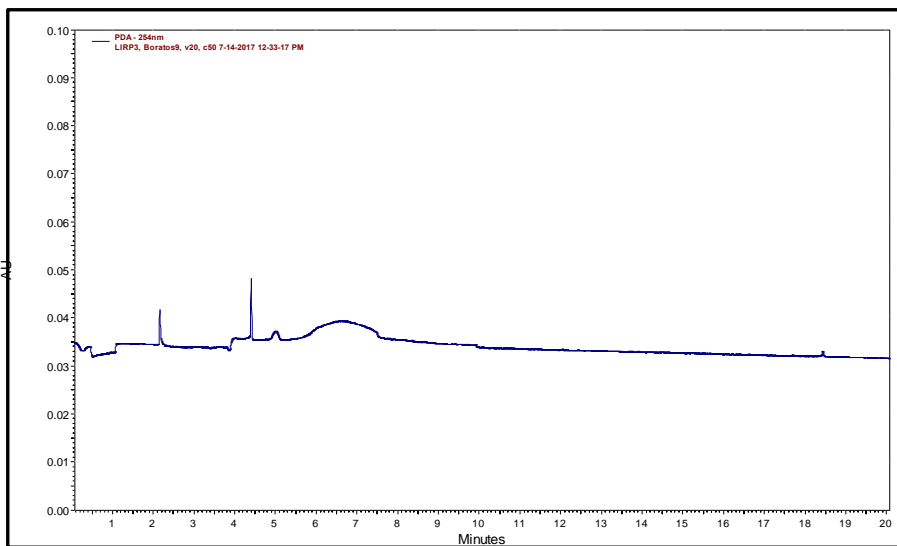
### LIRP3

Tiempo de retención pico 1: 2.10 min.

Tiempo de retención pico 2: 4.32 min.

Tiempo de retención pico 3: 4.91 min.

Tiempo de retención pico 4: 6.57 min.

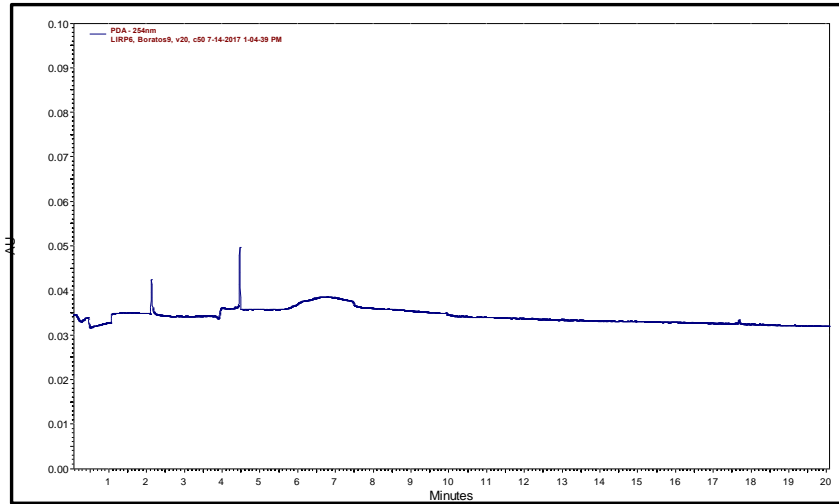


## LIRP6

Tiempo de retención pico 1: 2.06 min.

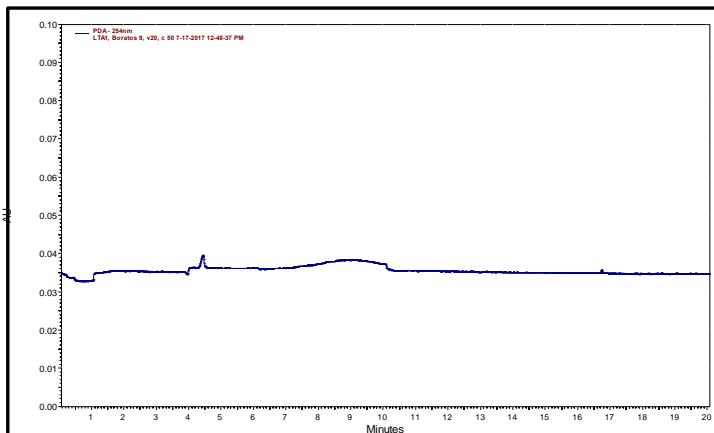
Tiempo de retención pico 2: 4.39 min.

Tiempo de retención pico 3: 6.70 min.



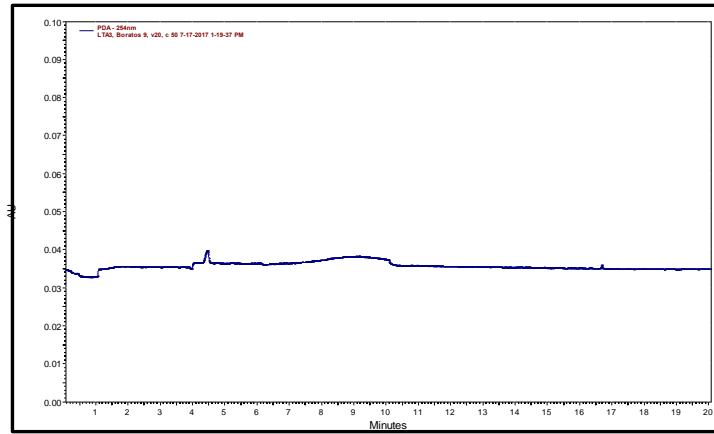
## LTA1

Tiempo de retención pico 1: 4.35 min.



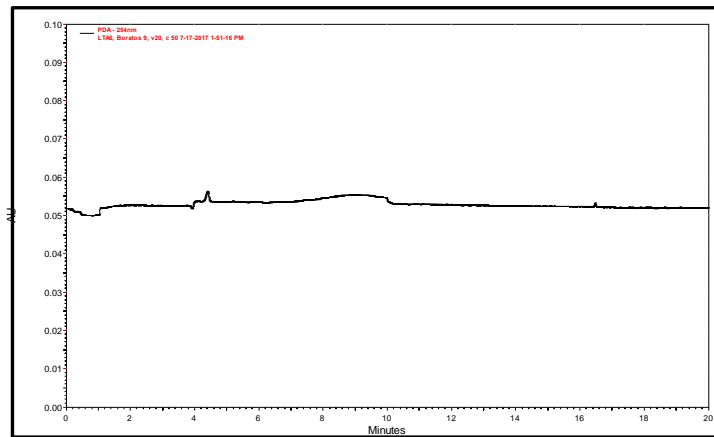
### LTA3

Tiempo de retención pico 1: 4.39 min.



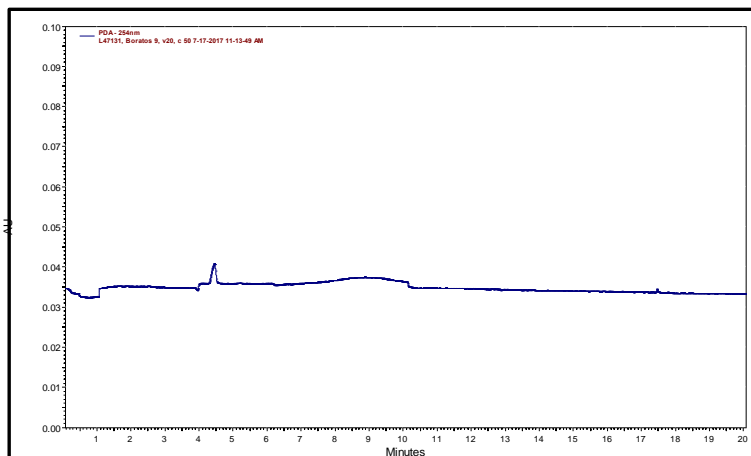
### LTA6

Tiempo de retención pico 1: 4.36 min.



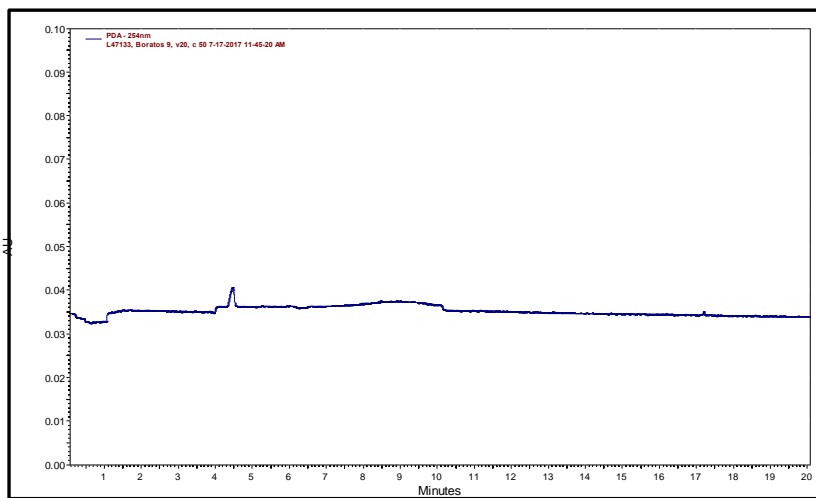
## L47131

Tiempo de retención pico 1: 4.37 min.



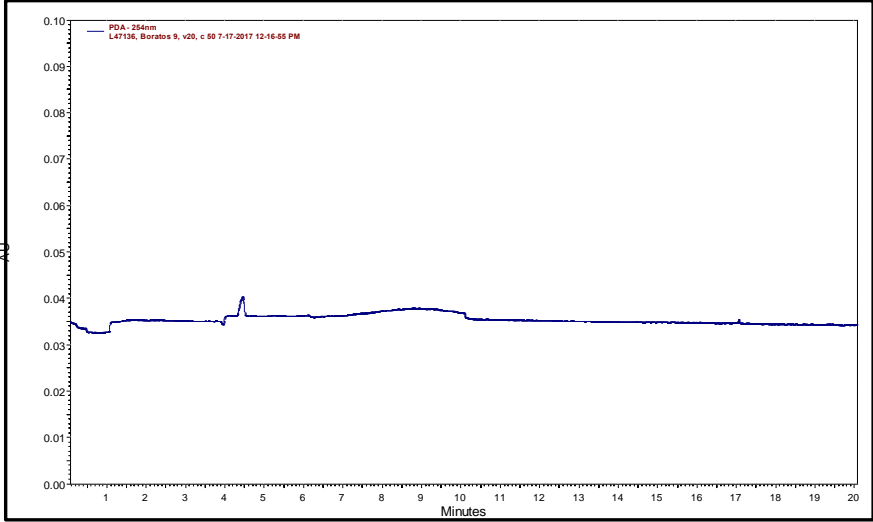
## L47133

Tiempo de retención pico 1: 4.39 min.



**L47136**

Tiempo de retención pico 1: 4.37 min.





## Characterization of ligninolytic enzyme production in white-rot wild fungal strains suitable for kraft pulp bleaching

Rosa María Damián-Robles<sup>1</sup> · Agustín Jaime Castro-Montoya<sup>1</sup> · Jaime Saucedo-Luna<sup>1</sup> ·  
Ma. Soledad Vázquez-Garcidueñas<sup>2</sup> · Marina Arredondo-Santoyo<sup>3</sup> ·  
Gerardo Vázquez-Marrufo<sup>3</sup>

Received: 8 June 2017 / Accepted: 7 September 2017  
© Springer-Verlag GmbH Germany 2017

**Abstract** Fungal strains identified by phylogenetic analysis of the ITS rDNA region as *Trametes versicolor* (CMU-TA01), *Irpex lacteus* (CMU-84/13), and *Phlebiopsis* sp. (CMU-47/13) are able to grow on and bleach kraft pulp (KP) in a simple solid-state fermentation (SSF) assay

Incubation in PDB + KP shows significant increases in Lac and MnP for *T. versicolor*, MnP and LiP for *Phlebiopsis* sp., and none for *I. lacteus*. SSF assays in Petri plates are a valuable tool to select fungi that are able to delignify KP. Here, delignification by *Phlebiopsis* sp. of