

## **5. INTRODUCCIÓN**

Una de las áreas importantes en donde se utiliza la biotecnología, es en la industria, que se ve en la necesidad de emplear éstas nuevas técnicas y sustituir algunos de sus procesos tradicionales, con la finalidad de generar productos competitivos en el mercado y disminuir el problema de la contaminación.

Dentro de las industrias que pueden beneficiarse con estos avances tecnológicos, se encuentra la industria papelera, que además de que no obtiene el rendimiento esperado durante el proceso, es una de las industrias más contaminantes a nivel mundial, ya que genera sustancias tóxicas.

### **5.1 Industria Papelera**

La importancia del papel es el gran impacto sobre las actividades humanas ya que es la principal fuente de almacenamiento y diseminación de la información y al contrario de lo que sucede en otros sectores, el consumo de papel no muestra indicios de estar desvinculándose del crecimiento económico (1, 2), pues a pesar de que existen otras formas, como el almacenamiento de manera digital, la industria del papel no muestra indicios de desaparecer (3).

El papel es una lámina de material que está constituido por un entramado tridimensional de fibras de celulosa unidas por atracciones de tipo electrostático y una serie de sustancias minerales (talco, caolín, carbonato cálcico y óxido de titanio), colas compuestas a base de resina natural o sintética, almidón y colorante, cuya presencia mejora las propiedades del mismo haciéndolo más apto para el uso a que se destina. Es un producto natural, biodegradable y reciclable, sin embargo durante su manufactura se utilizan sustancias como hidróxido de sodio, bisulfito de sodio, compuestos clorados, peróxido de hidrógeno, ácidos, hidróxido de sodio, hipocloritos, etc., los cuales presentan un alto grado de toxicidad (3, 4,5).

Para la producción de papel y pulpa (material fibroso utilizado para la fabricación del papel), generalmente se requiere de madera, sin embargo algunos países entre ellos México utilizan material residual, el cual es convertido posteriormente a pulpa o pasta para finalmente convertirla en papel. Uno de éstos materiales de residuo es el bagazo de caña de azúcar.

## **5.2 Bagazo de caña de azúcar**

La caña de azúcar crece en climas tropicales y subtropicales. El bagazo es el residuo fibroso que queda de la caña después de ser exprimida y de pasar por el proceso de extracción. Por lo general el bagazo se utiliza en los ingenios azucareros como combustible, sin embargo para la industria papelera representa una de las materias primas más importantes (2).

El bagazo, subproducto de la industria azucarera, conserva una posición única entre las fibras no leñosas para la manufactura de papel, debido principalmente a su disponibilidad en grandes cantidades (2). Su notable ventaja sobre otras fibras de plantas no leñosas consiste en que el costo de su recolección, la extracción de su jugo y su limpieza, son a cargo del ingenio azucarero.

La temporada de procesamiento de la caña (“zafra”) dura usualmente de cuatro a seis meses, pero se extiende hasta nueve meses en Hawái, Perú y México. Puede reunirse y almacenarse una cantidad adecuada de bagazo durante la temporada, con el fin de lograr una operación continua en la fábrica de pulpa en tanto llega la zafra (2).

### **5.2.1 Propiedades físicas y químicas del bagazo.**

El bagazo completo está integrado por tres componentes principales:

- El recubrimiento, en el que se incluye la epidermis, la corteza y el periciclo.
- Los mazos de fibra vascular, entre los que figuran las células conductoras de pared delgada asociadas con fibras de pared relativamente delgada con estrecho lumen.
- El tejido básico (parénquima) o médula, con mazos de fibra distribuidos irregularmente.

La composición química de las diferentes fracciones del bagazo, incluyendo el bagazo entero, la fibra separada y la médula, se indican en la Tabla-1.

Tabla-1. Propiedades químicas de las fracciones del bagazo (2)

|                                    | <b>Entero</b> | <b>Fibra</b> | <b>Médula</b> |
|------------------------------------|---------------|--------------|---------------|
| Solubilidad en éter (%)            | 0.25          | 0.12         | 2.5           |
| Solubilidad en alcohol-benceno (%) | 4.1           | 1.8          | 2.8           |
| Solubilidad en agua caliente (%)   | 2.5           | 0.9          | 1.9           |
| Lignina (%)                        | 20.2          | 20.8         | 20.2          |
| Pentosas (%)                       | 26.7          | 27.9         | 28.4          |
| Hemicelulosa (%)                   | 76.6          | 77.8         | 77.7          |
| Alfa celulosa (%)                  | 38.1          | 42.4         | 34.8          |
| Ceniza (%)                         | 1.67          | 0.7          | 2.29          |

### 5.3 Componentes principales de la materia prima.

Un material de interés en las paredes celulares de la planta en la madera, es el material ligninocelulósico, el cual está formado por celulosas y hemicelulosas enlazadas mediante lignina, un polímero aromático altamente oxigenado, con un esqueleto de fenilpropano que se repite. Sobre ésta matriz se deposita una mezcla de compuestos de bajo peso molecular llamados extractivos (2,6).

#### a) Celulosa

Es el componente más simple encontrado en el material ligninocelulósico de las plantas, es el polímero más abundante en la biosfera. Está compuesto por un polímero de residuos de D-glucosa unidos por enlaces  $\beta$ -1,4, (Figura-1). Cada resto presenta una rotación de  $180^\circ$  respecto a los restos contiguos, estabilizada por puentes de hidrógeno intramoleculares (6). Debido a su estructura, las cadenas de celulosa se unen por puentes de hidrógeno intermoleculares formando agregados (microfibrillas). La celulosa y el almidón pueden ser hidrolizados para formar glucosa, pero sus estructuras son muy diferentes. La celulosa es una molécula que da estructura y soporte a la planta. Las cadenas de glucosa están arregladas de una manera que permite que se empaquen juntas formando un cristal que es impermeable al agua. Consecuentemente el polímero celulosa es insoluble y resistente a la hidrólisis. (2,6,7)

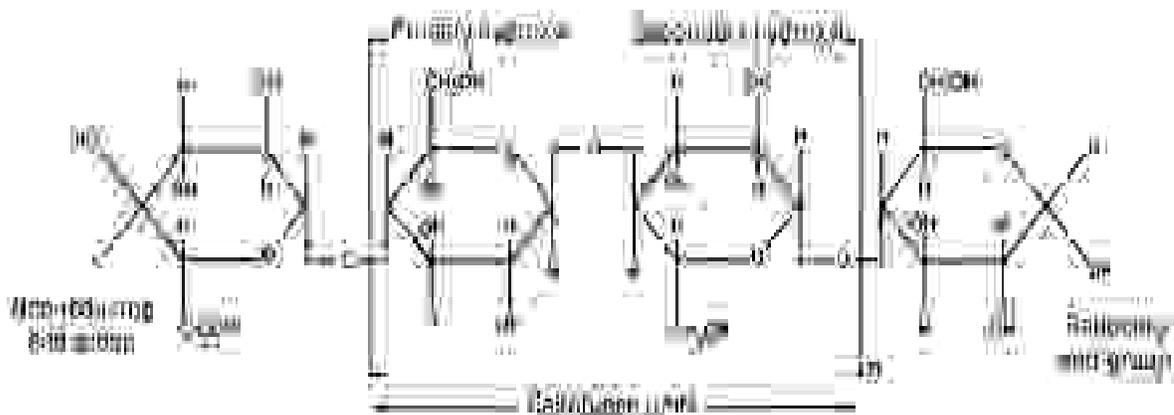


Fig. 1 Estructura química de la celulosa (1)

## **b) Hemicelulosa**

Las hemicelulosas forman cadenas cortas y son polímeros heterogéneos que contienen tanto hexosas (azúcares de 6 carbonos como glucosa, manosa y galactosa) como pentosas (azúcares de 5 carbonos como xilosa y arabinosa). Dependiendo de la especie de la planta, estos azúcares se asocian con ácidos urónicos formando estructuras poliméricas diversas, que pueden estar relacionadas cercanamente tanto con celulosa como con lignina (7, 8). Los tres polímeros principales son los xilanos, los mananos y los arabinogalactanos.

## **c) Lignina**

La lignina es un polímero complejo, tridimensional, globular, irregular, insoluble y de alto peso molecular ( $>10,000$ ), formado por unidades de fenilpropano cuyos enlaces son relativamente fáciles de hidrolizar por vía química o enzimática. Ésta molécula tiene diferentes tipos de uniones entre unidades aromáticas de fenilpropano (Figura-2).

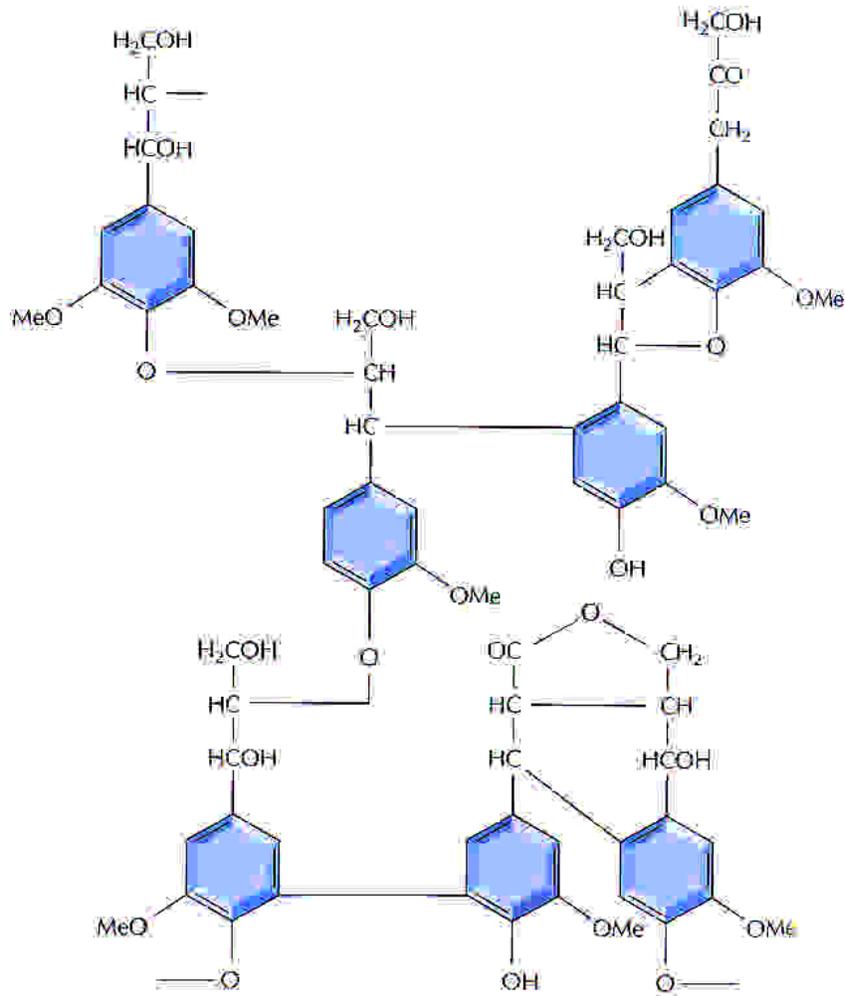


Fig. 2 Estructura de la lignina (7)

En las plantas, la lignina se encuentra químicamente unida a la hemicelulosa y rodeando a las fibras compuestas por celulosa. Es responsable de la rigidez de las plantas y de sus mecanismos de resistencia al estrés y a ataques microbianos (2,7). Es especialmente abundante (20-30% del peso de la pared) en células conductoras (vasos xilemáticos) y estructurales (fibras) con engrosamiento secundario (6).

En cuanto a su biosíntesis, se sabe que los precursores de la lignina se forman por conducto de la ruta correspondiente al ácido shiquímico. Éste ácido, formado por unión

del ácido fosfoenolpirúvico y eritrosa-4-fosfato, se convierte en el principal escalón de la biosíntesis de los aminoácidos L-tirosina y L-fenilalanina, que están formados por aminación reductiva. Las enzimas desaminantes convierten a continuación los dos aminoácidos en sus respectivas contrapartes de ácido shinámico (2, 9, 10).

La hidroxilación en etapas por hidroxilasa, y en su momento la metilación por o-metil-transferasas, transforma los ácidos shinámicos en los tres ácidos para hidroxishi-námicos conocidos como precursores de la lignina (Figura-3).

Para el productor de pulpa y de papel, la lignina es un componente de la madera que ocasiona la mayoría de los problemas que surgen durante la producción de pulpa. De no ser por la lignina no resultaría necesario aplicar reactivos fuertes alcalinos o ácidos para la deslignificación química de la madera a fin de obtener pulpa y productos de papel. La deslignificación es la meta más importante en la producción del papel (2).

#### **d) Extractivos**

Los extractivos son aquellas sustancias que se encuentran presentes en las diferentes fibras vegetales, pero que no son carbohidratos, tales como ácidos grasos, terpenos, fenoles y resinas. Muchos de estos compuestos son solubles en agua o disolventes orgánicos polares como metanol, etanol o acetona, por lo que se eliminan rápidamente en los procesos de extracción de celulosa. (2,8).

Una vez que se ha obtenido la materia prima, se continúa con el proceso de producción de papel, iniciando por la generación de la pasta.

## 5.4 Producción de pasta o pulpa

Para fabricar papel es necesario separar las fibras de celulosa, que están fuertemente unidas por lignina y producir la pasta o pulpa. Se debe eliminar la mayor parte de la lignina antes de aislarse las porciones más importantes de la hemicelulosa o de la celulosa (4,11).

La pasta es un producto intermedio en la manufactura del papel y cartón. Cuando la madera es la materia prima inicial, debe reducirse a un tamaño adecuado antes de pasar a la producción de pulpa. (2)

La producción de pulpa se logra por medios químicos o mecánicos, o mediante combinaciones de los dos procesos. En la producción mecánica de pulpa los integrantes químicos originales del material fibroso quedan inalterados, excepto por la eliminación de los solubles en agua. La producción química de la pulpa tiene como objetivo la eliminación selectiva de la lignina que une las fibras, con ataque mínimo a las hemicelulosas y las celulosas. Si el papel que va a producirse es blanco, continúa la purificación durante la etapa del blanqueo. Durante dicha etapa puede lograrse una purificación para la producción de pulpas químicas con alto contenido de alfacelulosa. (2).

Las propiedades de los productos terminales, papeles y cartones, dependerá de las propiedades de las pulpas utilizadas en su manufactura. Estas variarán a su vez con las especies de fibras distintas, maderas o de plantas no leñosas utilizadas, así como del proceso empleado en la obtención de la pulpa (2, 12). Los procesos comerciales existentes pueden clasificarse en procesos mecánicos, químicos y/o semiquímicos.

El proceso a la sosa, el primero entre los procesos químicos, ya no se utiliza en la industria. El proceso al sulfato o proceso Kraft fue el último que se inventó entre los procesos estrictamente químicos de obtención de pulpa, pero durante casi 100 años de existencia de producción de la pulpa ha llegado a dominar en diferentes partes del mundo, alcanzando un nivel de casi el 70% de la producción total de pulpa. Este proceso consiste en cocinar las virutas de madera o las fibras vegetales en una solución de hidróxido de sodio (NaOH) y de sulfuro de sodio (Na<sub>2</sub>S). El ataque alcalino causa la fragmentación de las moléculas de la lignina en segmentos fenólicos más pequeños. Las pulpas Kraft producen papel fuerte, de alta calidad y resistencia, a pesar de que la pulpa sin blanquear es caracterizada por un color marrón oscuro (1).

Las reacciones que ocurren son complejas. Esencialmente lo que sucede es que la lignina es atacada químicamente, formando fragmentos. Los fragmentos de lignina que se forman son iones fenolatos o carboxilatos. Sin embargo, también los carbohidratos como la celulosa y hemicelulosa son atacados. Durante el proceso, aproximadamente 80% de la lignina, 50% de las hemicelulosas y 10% de la celulosa son disueltos (1).

La estructura residual de la lignina en la pulpa Kraft es significativamente diferente de su estructura en la madera. Durante el pulpeo Kraft, los enlaces aril éter se rompen, los enlaces se condensan y se forman uniones entre polisacáridos (13). La pulpa Kraft tiene mucho menos contenido de lignina en comparación con la madera.

## **5.5 Blanqueo de la pasta.**

Con el objetivo de producir celulosa blanca pura, la pasta química es blanqueada con removedores de lignina. La pasta mecánica que contiene grandes cantidades de lignina, se aclara usualmente con peróxido de hidrógeno que cambia la estructura de la lignina y altera el color, pero no la elimina. En las tecnologías convencionales de blanqueo de la pasta química, la lignina se degrada con ayuda de gas cloro ( $\text{Cl}_2$ ). La pasta se blanquea luego en varias etapas que emplean dióxido de cloro ( $\text{ClO}_2$ ) e hipoclorito de sodio ( $\text{NaOCl}$ ). La industria del papel emplea anualmente alrededor de 3 millones de toneladas de cloro para blanquear la pasta (4). Como este gas es extremadamente reactivo, se combina con la materia orgánica de la pasta y produce miles de nuevos compuestos conocidos como organoclorados.

El empleo de cloro como agente blanqueador ha creado problemas de contaminación y de salud para trabajadores y consumidores. Del total de compuestos organoclorados formados durante el proceso de blanqueo y presentes en los efluentes de una fábrica de pasta (11), apenas se han identificado 300 (incluyendo dioxinas, furanos, clorofenoles y bencenos clorados).

Como se puede observar, cualquier mecanismo utilizado para la producción de papel, ocasiona que la principal materia prima (celulosa) sufra también algún tipo de ataque (1); además es importante hacer una consideración sobre el diseño y operación durante la producción, ya que se generan sustancias que afectan al ambiente y una de las finalidades de las nuevas tecnologías es preservar la calidad del entorno.

## 5.6 Impacto ambiental de los procesos productivos.

Desde los bosques hasta la disposición final, pasando por las industrias papeleras, el ciclo de vida del papel es responsable de la degradación del ambiente en diversos lugares del planeta (4,5).

El impacto sobre el medio ambiente de la fabricación de la pasta de papel depende de muchos factores, como la materia prima (tipo de madera, residuos vegetales, etc.), el método de obtención de la pulpa a partir de madera o materiales residuales (Kraft, sulfito, métodos mecánicos), el proceso de blanqueo de la pasta o pulpa (cloro, dióxido de cloro, oxígeno, ozono, sosa cáustica, peróxido de hidrógeno, tratamientos enzimáticos), los sistemas de depuración que tengan instalados o a la ubicación de las fábricas y las necesidades de transporte. Así las fabricas de pasta mecánica generan resinas ácidas altamente tóxicas que son difíciles de biodegradar y por tanto, necesitan un tratamiento biológico bastante sofisticado. Sin embargo, éstas fábricas aprovechan más la madera que las de pasta química y no tienen problemas de emisiones de sustancias azufradas y los malos olores y la lluvia ácida asociados a éstas (4). Las fábricas que emplean cloro o compuestos clorados producen residuos y vertidos contaminados con sustancias organocloradas de elevada toxicidad (Tabla-2).

Los principales impactos ambientales ligados a la producción de pasta de papel son: elevado consumo de energía, generación de residuos tanto tóxicos como inertes, vertido de aguas residuales, emisiones contaminantes a la atmósfera y el transporte (4).

Tabla 2. Compuestos encontrados en el agua residual de la empresa Kimberly Clark S.A. de C.V (14).

|                  |                  |
|------------------|------------------|
| <b>Compuesto</b> | <b>Compuesto</b> |
|------------------|------------------|

|                                       |                                       |
|---------------------------------------|---------------------------------------|
| 1. Cloroformo                         | 15. 4-etil-2-metoxifenol              |
| 2. Ac propanoico                      | 16. m-tert.butil-fenol                |
| 3. Ac butanoico                       | 17. Ac bencenpropanoico               |
| 4. Hexametilciclotrisiloaxano         | 18. 2,4,6-triclorofenol               |
| 5. Ac pentanoico                      | 19. Ac 3,4-dimetilbenzoico            |
| 6. 1,1,3-tricloro-2-propanona         | 20. Vainillina                        |
| 7. Fenol                              | 21. 2,4,6-trimetilbenzaldehido        |
| 8. Ac hexanoico                       | 22. 1-tridecanol                      |
| 9. 4-metilfenol                       | 23. 2,5-dicloro-4-metoxifenol         |
| 10. 2-metoxifenol                     | 24. 2,6-diclorobenzonitrilo           |
| 11. 3-etilfenol                       | 25. 2,5-dicloro-1,4-bencendiol        |
| 12. 2,4-diclorofenol                  | 26. 2,3-acetonida-1,4-diclorobutanona |
| 13. 2-metoxi-4-metilfenol             | 27. Benzofenona                       |
| 14. Ac. 3-(2-hidrofenil)-2-propanoico | 28. Etilfenoxibenceno                 |

Muchos de estos compuestos resisten la degradación natural y se acumulan a través del tiempo en el ambiente, afectan la vida acuática y se almacenan en los tejidos grasos, bioacumulándose a lo largo de la cadena alimentaria. Son una de las familias de sustancias más tóxicas que se conocen, ya que en general dañan a los sistemas endócrino, inmunológico y reproductor de los organismos.

Además, muchas de las sustancias organocloradas son cancerígenas y mutagénicas (11). En la investigación relacionada con la producción de pasta de papel, el proceso de blanqueo ha sido quizás uno de los más dinámicos, debido en parte, a exigencias medioambientales cada vez más estrictas y que han limitado progresivamente el vertido de compuestos organoclorados (15). Por esta causa, se ha eliminado progresivamente el uso de cloro gaseoso en el blanqueo, a la vez que se han introducido nuevos agentes como el oxígeno, el ozono y el agua oxigenada. Entre las

propuestas que hoy en día se investigan, encaminadas a reducir la carga contaminante del blanqueo de pasta al sulfato, cabe citar el pretratamiento de la pasta con enzimas ligninolíticas producidas por hongos basidiomicetos de pudrición blanca (15).

## **5.7 Empleo del substrato orgánico por los microorganismos.**

Todas las formas de vida, desde los microorganismos hasta los seres humanos toman del ambiente las sustancias que requieren para sintetizar su material celular, generar energía y efectuar un funcionamiento adecuado (16). Estas sustancias se denominan nutrientes o substratos y el consumo o degradación de los mismos, depende de los siguientes factores:

composición elemental, la estructura de las unidades básicas de repetición, los enlaces entre unidades de repetición, los nutrientes presentes en el ambiente, la comunidad microbiana presente y las condiciones abióticas como pH, potencial de óxido-reducción,  $O_2$ , condiciones osmóticas. Los principales substratos complejos que utilizan los microorganismos se resumen en la Tabla-3

Tabla 3. Características de los substratos orgánicos complejos que influyen en la descomposición y la degradabilidad.(17).

|               |                               |                     | Elementos presentes en gran cantidad |   |   |   |   | Degradación        |                    |
|---------------|-------------------------------|---------------------|--------------------------------------|---|---|---|---|--------------------|--------------------|
| Substrato     | Subunidad básica              | Enlaces             | C                                    | H | O | N | P | Con O <sub>2</sub> | Sin O <sub>2</sub> |
| Almidón       | Glucosa                       | (1-4), (1-6)        | +                                    | + | + | - | - | +                  | +                  |
| Celulosa      | Glucosa                       | (1-4)               | +                                    | + | + | - | - | +                  | +                  |
| Hemicelulosa  | Monosacáridos C6 y C5         | (1-4), (1-3), (1-4) | +                                    | + | + | - | - | +                  | +                  |
| Lignina       | Fenilpropano                  | Enlaces C-C, C-O    | +                                    | + | + | - | - | +                  | -                  |
| Quitina       | N-acetilglucosamina           | (1-4)               | +                                    | + | + | + | - | +                  | +                  |
| Proteínas     | Aminoácidos                   | Enlaces peptídicos  | +                                    | + | + | + | - | +                  | +                  |
| Hidrocarburos | Alifático, cíclico, aromático |                     | +                                    | + | - | - | - | +                  | +/-                |
| Lípidos       | Glicerol, ácidos grasos       | Ésteres             | +                                    | + | + | + | + | +                  | +                  |

La lignina es un caso especial en el que la biodegradabilidad depende de la disponibilidad de oxígeno. A menudo no existe una degradación sustancial porque la mayoría de los hongos filamentosos que degradan lignina, pueden actuar sólo en presencia de oxígeno (18).

## 5.8 Organismos degradadores de lignina y mecanismo de biodegradación.

Como se mencionó anteriormente, la pared celular de los tejidos vegetales está constituida por lignina, una sustancia difícil de degradar y que los hongos descomponen debido a que poseen enzimas que rompen dicha molécula y dependiendo de como los hongos la ataquen, se clasifican en hongos de pudrición blanca y hongos de pudrición parda (o de color café). Los hongos de pudrición blanca han sido ampliamente investigados como posibles organismos utilizados en la

biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y en la degradación del polímero lignina (19, 20).

Estos hongos no pueden utilizar directamente lignina como su fuente de carbono y energía, por ello dependen de azúcares más digeribles como los monómeros precursores de fenilpropano. La función primaria de la ligninólisis es exponer estos monómeros al ataque del hongo con ayuda de diferentes tipos de enzimas. En la mayoría de los hongos se ha visto que la ligninólisis ocurre durante el metabolismo secundario, es decir bajo limitación de nutrientes, lo que permite que el hongo sólo sintetice y secrete agentes ligninolíticos que comiencen a fragmentar el polímero (8).

Un ejemplo de estos hongos es *Phanerochaete chrysosporium*, que crece en cultivo líquido y se ha demostrado que secreta enzimas ligninolíticas extracelulares que tienen la habilidad de degradar numerosos compuestos aromáticos policíclicos (19, 21). *Ceriporiopsis subvermispora* es otro hongo filamentoso capaz de realizar la biodegradación de la lignina. Un ejemplo más es *Panus tigrinus*, microorganismo que ha sido estudiado debido a su capacidad de producir lacasas y peroxidasas que atacan a la lignina. *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Trametes subeotypus*, *Coriolopsis gallica* y *Heterobasidion annosum*, son algunos de los microorganismos estudiados debido a su capacidad ligninocelulítica (15).

Por otra parte se sabe que dos de las más conocidas peroxidasas (enzimas que atacan a la lignina) son secretadas por diversos hongos, entre ellos *Pleurotus eryngii*. Una de ellas es la enzima manganeso peroxidasa y la otra es la enzima lignina peroxidasa (22). Este hongo ha sido muy estudiado debido a su capacidad de degradar lignina selectivamente cuando crece en sustratos naturales y por lo tanto es un organismo considerado como modelo para estudios de biodegradación de lignina y con aplicaciones biotecnológicas (22).

La enzima manganeso peroxidasa (MnP), es una hemo proteína que cataliza la oxidación de  $Mn^{+2}$  a  $Mn^{+3}$  dependiente de  $H_2O_2$  (Figura-4). El  $Mn^{+3}$ , es quelado por diferentes ácidos orgánicos como glicolato u oxalato, y puede oxidar a 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 (22, 23, 24).

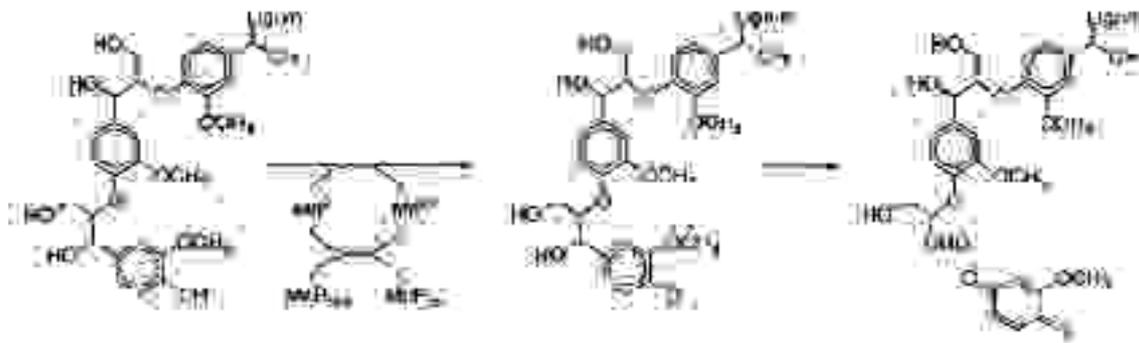
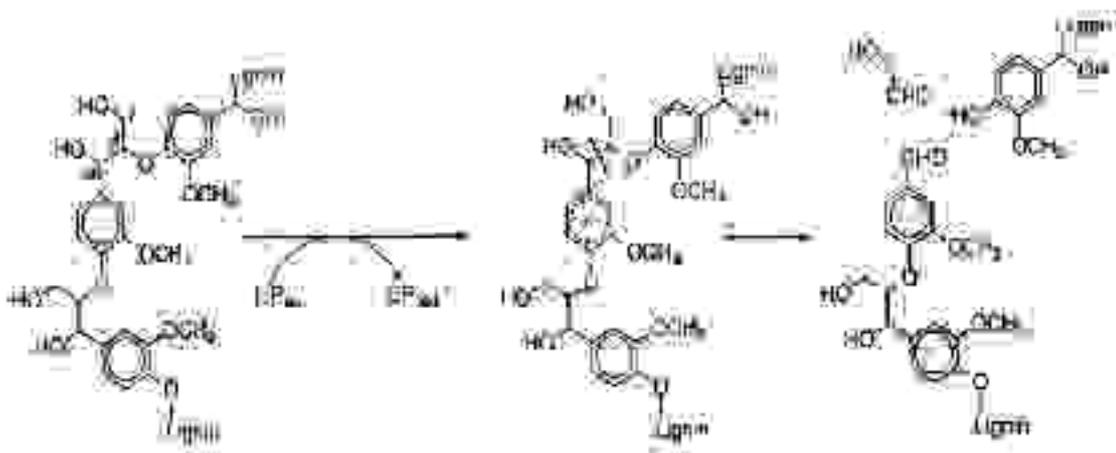


Fig. 4 Mecanismo de acción de MnP (8)

Por otra parte, la enzima lignin peroxidasa (LiP) fue la primera en descubrirse y se asemeja a otras peroxidases en que contiene al grupo hemo férrico y funciona siguiendo la vía catalítica típica en que LiP es oxidada por  $H_2O_2$  (Figura-5), generando un intermediario deficiente de electrones, el cual regresa a su estado de reposo inicial por medio de dos oxidaciones posteriores (4, 22).

En términos generales la degradación de la lignina es catalizada por un complejo enzimático extracelular que poseen algunos hongos. Los mayores componentes de este sistema incluye a la enzima lignin peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y a la enzima generadora de peróxido glicoxal oxidasa (GLOX). Bajo condiciones de limitación de nutrientes en el medio de cultivo, diversos hongos son capaces de secretarlas (25).



## 5.9 Aspectos moleculares de la degradación.

Diversos autores reportan el hecho de que las peroxidases de *Phanerochaete chrysosporium* son codificadas por familias de genes relacionados estructuralmente. Se han descubierto diez genes *lip* (19, 24, 25, 26), conocidos como *lipA*, *lipB*, *lipC*, *lipD*, *lipE*, *lipF*, *lipG*, *lipH*, *lipI* y *lipJ*. En 1992 cuatro subfamilias fueron propuestas, basadas en la estructura intron/exon de cinco conocidas secuencias *lip* en *P. chrysosporium*.

También se descubrieron tres genes *mnp* conocidos como *mnp1*, *mnp2* y *mnp3* y la enzima GLOX que es codificada por un sólo gen (*glx*), sin embargo el papel que desarrollan durante la degradación de lignina en los procesos comerciales y durante el mecanismo de pulpeo ha sido pobremente estudiado (25).

Numerosos estudios han demostrado la regulación diferencial de los genes *lip* y *mnp* en respuesta a las condiciones de cultivo. La técnica de RT-PCR, confirmada con la técnica Northern blot, muestran la diversa regulación de los genes *lipC* y *lipJ* bajo condiciones limitadas de nitrógeno en el medio de cultivo (19, 25, 26).

Los genes *mnp* de *P. chrysosporium* exhiben una compleja regulación cuando hay limitación de nutrientes, cierta concentración de manganeso, agitación del medio de cultivo, concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y estrés de tipo químico. El gen *mnp3* parece no estar regulado por manganeso, en cambio *mnp1* y *mnp2* responden fuertemente a una determinada concentración de manganeso y son regulados diferencialmente en respuesta a la agitación del medio de cultivo. La transcripción del gen *mnp* es regulada por Mn<sup>+2</sup> (21, 24), mientras que, la transcripción de algunos genes *lip* es regulada por la fuente de carbono que se adiciona al medio de cultivo (25).

## 5.10 Alternativas

En México el cultivo de *Pleurotus ostreatus* se visualiza como una alternativa para la solución de la contaminación por desechos orgánicos de origen industrial (27). El cultivo en medio sólido es el método usual de preparación de inóculo para este hongo y consiste en propagar el micelio en granos de cereales como *Triticum aestivum* o

*Sorghum vulgare*. Este proceso presenta algunos problemas como: un tiempo relativamente largo hasta la producción del inóculo secundario, contaminación frecuente por la manipulación del sustrato y dificultades en el control del proceso.

Una alternativa para evitar los problemas antes mencionados es la obtención del inóculo en cultivo líquido. El cultivo de *P. ostreatus* en sistema sumergido ha sido utilizado en la degradación de compuestos orgánicos como los hidrocarburos policíclicos aromáticos, aunque, poco se conoce de sus características de crecimiento bajo estas condiciones (28).

El cultivo sumergido de los hongos de pudrición blanca como *P. ostreatus* permite producir al mismo tiempo enzimas ligninolíticas importantes como la manganosa peroxidasa y la lacasa, que es una polifenol oxidasa capaz de oxidar polifenoles, fenoles sustituidos y diaminas (27, 28).

Sin embargo el problema de la degradación de lignina todavía no se ha resuelto, ya que como se menciona anteriormente, la producción de enzimas por parte de los hongos varía con respecto a las condiciones y nutrientes presentes en el medio de cultivo, además de que los hongos filamentosos crecen preferentemente en medio sólido y tardan hasta ocho días en desarrollarse, lo cual puede ser perjudicial para su aplicación en la industria.

## **5.11 Estudios relacionados con levaduras.**

Como se mencionó anteriormente, la descomposición de lignina la realizan principalmente basidiomicetos de pudrición blanca. Dichos hongos no tienen un sustrato específico y pueden oxidar a una gran variedad de componentes incluyendo contaminantes ambientales (29). Sin embargo existen otros microorganismos aislados de suelo que pueden tener una actividad similar. La habilidad de algunas especies de levaduras para biodegradar lignina ha recibido poca atención, en comparación con los hongos basidiomicetos (29).

Recientemente, se ha descrito que algunas especies de levaduras como *Candida ingeniosa*, *Rhodotorula graminis* y *Rhodotorula mucilaginosa* son organismos que degradan productos derivados de lignina (29).

Otros autores indican que *Trichosporon pullulans*, levadura aislada a partir de suelo, es un organismo capaz de crecer en un medio que contenga lignina y glucosa. Posee la habilidad de transformar la macromolécula de lignina y liberar algunas fracciones utilizables similares a las descritas cuando se realiza la biodegradación por parte de hongos de raíz blanca (29). En este estudio, se analizaron tanto el crecimiento de las cepas, como la actividad de las enzimas ligninasa y manganeso peroxidasa, demostrando que *T. pullulans* actúa como biodegradador de lignina.

Por otra parte, se sabe que *Rhodotorula rubra* es una levadura que forma parte de la microflora de algunos lagos y puede crecer en presencia de lignina pre-hidrolizada. Los cambios estructurales de dicho componente cuando ha sido tratado con la levadura, fueron determinados por espectroscopía IR (infrarrojo) e indican la degradación oxidativa y desmetilación de la lignina, demostrando que las levaduras pueden utilizar parcialmente a la lignina como fuente de carbono (30).

Existe otro trabajo en el cual se estudiaron a diversos hongos de pudrición blanca y levaduras de los géneros *Cryptomyces laurentii* y *Candida ciferrii*. En estos ensayos se demostró que todos los organismos incluyendo las levaduras presentaron la capacidad de disminuir la concentración de lignina de 1% a 0.23% en medio de cultivo líquido. Sin embargo no se reportan datos que indiquen cuál es la ruta metabólica que siguieron, o que clase de enzimas son las que se sintetizan durante dicha degradación.

También se tiene los reportes de Abhijeet P.B. y col., (31) en los que se describe la clonación y la expresión de lignina peroxidasas de *Phanerocheate chrysosporium* en *Pichia pastoris*, esto con la finalidad de reducir los costos de la producción enzimática mediante la eliminación de las fermentaciones fúngicas.

De igual forma, Arana y col., (32) plantean la utilización de levaduras recombinantes para la deslignificación de pasta al sulfato, ya que dentro de las aplicaciones biotecnológicas al blanqueo de pasta de papel se contempla la utilización de lacasas fúngicas como agentes para reducir el contenido de lignina, pero para que este proceso llegue a ser rentable se necesita una fuente de proteína de bajo costo. Como en muchas ocasiones la producción de esta enzima por las cepas silvestres de los hongos que las secretan habitualmente de forma natural es limitada, dichos autores proponen introducir algunos de los genes responsables de la síntesis de lacasas de hongos basidiomicetos en levaduras, con la finalidad de conseguir la producción de enzimas a mayor escala.

Sin embargo, aunque la lacasa de diferentes microorganismos se ha expresado en levaduras como *Sacharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* y *Pichia pastoris*, (33) no se ha conseguido un rendimiento suficiente como para ser rentable industrialmente. Se han estudiado diferentes propiedades de las lacasas encontrándose, por ejemplo, que *S. cerevisiae*, transformada con el gen lacasa de *Trametes versicolor*, es capaz de fermentar azúcares transformándolos en etanol sin que haya una inhibición del crecimiento por parte de los fenoles; o el caso de *Thichoderma reesei* transformada con el gen lacasa de *Phlebia radiata*, que es capaz de modificar la fracción soluble de una pasta kraft. Aunque, aún no existe una cepa con características para ser aplicada a procesos industriales (32).

## 5.12 Búsqueda de genes

Las levaduras son particularmente adecuadas para estudios genéticos, ya que tienen un número relativamente pequeño de genes (en comparación con otros eucariotas); son organismos unicelulares pequeños que pueden crecer en cultivo líquido y se desarrollan como células haploides (34). Una mutación en un solo gen de célula haploide de levadura produce un efecto observable, puesto que las células carecen de una segunda copia del gen para enmascarar la presencia de un gen anormal (34).

Existen diferentes técnicas para buscar un gen específico, entre ellas está por ejemplo la utilización de la bioinformática en Internet, en donde se pueden encontrar sitios que muestran una gran cantidad de herramientas para buscar secuencias de nucleótidos o aminoácidos en las bases de datos existentes. En particular, la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information), que proporciona acceso al GenBank, el cual contiene aproximadamente 11,500,000 secuencias de nucleótidos correspondientes a genes identificados en diversos organismos, o a

Entrez, que es un sistema de búsqueda que permite encontrar secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos para cualquier gen de cualquier organismo presente en la base de datos. Por otra parte si se desea saber qué secuencias de la base de datos son similares a la secuencia de interés, es posible utilizar un software denominado BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), que permite buscar similitudes de secuencias tanto nucleotídicas como aminoacídicas (35), permitiendo observar la secuencia altamente conservada del gen estudiado y así diseñar los *primers* con que se desean trabajar, ya que el mismo tipo de genes que se encuentran en un cromosoma de una especie determinada, puede encontrarse en otras especies (36).

Otra forma de realizar esta búsqueda es verificando la información publicada en artículos de investigación relacionados con el gen de interés, en los cuales ya se comprobó la eficiencia de los *primers* para posteriormente realizar la técnica de PCR. La técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), ha revolucionado la genética molecular haciendo posible estudiar y analizar a los genes, produciendo un gran número de copias de una secuencia específica de DNA. Una de las ventajas de esta metodología es que por su alta sensibilidad permite identificar con rapidez y eficiencia a un gen. Además el segmento de DNA que sirve de molde no requiere estar necesariamente en estado puro, sino que puede ser parte de mezclas complejas, puede ser por ejemplo DNA nuclear total (37).

El método se basa, en su forma más simple en la realización de tres reacciones sucesivas llevadas a cabo a distintas temperaturas. Una vez finalizada la reacción se habrá logrado fabricar, en pocas horas, gran cantidad de un fragmento génico con un alto grado de pureza (37).

Con estas bases, se pretende estudiar levaduras autóctonas que de forma natural degraden lignina y tratar de comprobar si tienen algunos genes descritos para el metabolismo de lignina en otros hongos.