

10. DISCUSIÓN

Diferentes autores han enfocado su atención hacia organismos degradadores de lignina. Dos grupos de hongos se distinguen entre los destructores de madera: los que causan la podredumbre parda que degradan celulosa y hemicelulosas dejando la lignina como residuo y los que provocan la podredumbre blanca que degradan lignina (8, 39). Entre estos últimos se encuentran por ejemplo *Stereum*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Ganoderma*, *Polyporus* y *Xylaria* (28, 39). Muchos estudios indican que son estos hongos filamentosos los que pueden excretar enzimas ligninolíticas y atacar a la lignina (15, 19, 24, 25). Sin embargo existen muy pocos reportes acerca de que organismos levaduriformes sean capaces de realizar la biodegradación.

En este estudio, se aislaron seis cepas de hongos levaduriformes capaces de degradar lignina. *Geotrichum spp* (LEV01), *Geotrichum spp* (LEV02), *Cryptomyces laurentii* (LEV04), *Cryptomyces laurentii* (LEV06), que es una de las levaduras que encontramos y que ya había sido reportada por Pérez (6) como un organismo degradador de lignina, cuando crece en medio mínimo con lignina al 1%, *Rhodotorula glutinis* (LEV05) y *Candida sake* (LEV07). *Cryptomyces laurentii* es una levadura del orden de los *Phacidiales*, la cual es considerada como organismo saprofito de plantas vasculares y maderas, según análisis de Dix y Webster (40) que desarrollaron con otras cepas de su género, y que ellos mismos atribuyeron como característica distintiva de los organismos fúngicos del género *Cryptomyces*.

Estas levaduras fueron aisladas de bagazo de caña de azúcar, material que tiene un alto contenido de lignina (2) y que es una de las materias primas utilizadas en la industria papelera (2).

Cabe destacar que durante el primer aislamiento se prepararon medios de cultivo con lignina al 1% como única fuente de carbono, en dichos medios crecieron inicialmente bacterias, levaduras y hongos, sin embargo después de la purificación de los organismos de interés y con la finalidad de realizar pruebas de degradación, las levaduras se sembraron en este medio, pero no fueron capaces de crecer. Creemos que este comportamiento se debe a que cuando se realizó el primoaislamiento se tomaron muestras de bagazo y se mantuvieron en agitación, para posteriormente preparar diluciones, por lo tanto, probablemente en éstas diluciones todavía existían restos de bagazo, cuyos componentes permitieron el crecimiento de las levaduras cuando sólo

contenía lignina como única fuente de carbono, sin embargo después de la purificación, al no existir restos de bagazo ya no hubo crecimiento y fue necesario agregar glucosa para permitir el desarrollo de las cepas estudiadas.

Otros factores a considerar son por ejemplo, que hongos y levaduras tienen tolerancia a pH ácido o preferencia por medios de cultivo con gran cantidad de azúcar fermentable (17), razón por la que cuando se agregó glucosa al medio de cultivo, si hubo crecimiento.

Dichas levaduras crecieron tanto en medio sólido como líquido. Para verificar como se iba desarrollando el microorganismo y como iba cambiando la concentración de lignina se hicieron cultivos en medio líquido, en los cuales se pudo comprobar la degradación.

Los resultados dieron los siguientes valores: LEV 01 40%, LEV 02 40%, LEV 04 50%, LEV 05 40%, LEV 06 50% y LEV 07 45% , en un tiempo aproximado de 18 a 20 días. Aunque la degradación se inició desde el momento que las levaduras fueron inoculadas al medio de cultivo. Es decir, existe mayor actividad cuando inicia el crecimiento y a medida que el tiempo va transcurriendo dicha actividad disminuye, probablemente porque la concentración de glucosa va disminuyendo hasta agotarse; indicando que la degradación de lignina requiere una fuente de carbono y energía como la glucosa para poderse llevar a cabo.

Estos resultados son parecidos a los reportados por Gutiérrez y col., en 1996 quienes analizaron sobrenadantes de cultivos donde crecieron diferentes especies de *Pleurotus* en un medio que contenía tanto glucosa como lignina y pudieron verificar que la concentración de lignina disminuyó después de 20 días de cultivo (41).

Con respecto a su crecimiento los resultados demuestran que las levaduras presentaron tiempos de duplicación que van de 2 a 4 días aproximadamente. Estos resultados indican que las levaduras requieren de un tiempo largo de duplicación, en comparación con las bacterias. Sabemos que los tiempos de duplicación cambian notablemente según la especie microbiana y las condiciones ambientales. Los valores varían desde menos de 10 minutos en unas pocas bacterias, hasta varios días, en algunos microorganismos eucariotas (17), como es el caso de las levaduras que se aislaron.

Por otra parte observamos que bajo las condiciones reportadas anteriormente, casi al mismo tiempo que el organismo termina su fase de crecimiento exponencial también

termina la degradación, lo cual indica que estas levaduras tienen la capacidad de degradar a la lignina cuando están realizando su metabolismo primario. A diferencia de algunos hongos filamentosos en los cuales se han identificado enzimas ligninolíticas cuando el organismo se encuentra realizando su metabolismo secundario (28).

Se observó también una capacidad diferente de degradación de lignina entre organismos de la misma especie, se piensa que se debe a los diferentes requerimientos que tengan los microorganismos para crecer. Una especie en particular puede presentar una flexibilidad metabólica y modificar sus procesos metabólicos adaptándose a los cambios ambientales (17). Esta variación puede también deberse a información genética extra a través de: virus que infectan a las levaduras, o plásmidos del tipo 2 μ m como el de *Sacharomyces cerevisiae*, o inclusive a mutaciones que se traduce en una mayor o menor actividad enzimática.

Además, pueden presentarse mutaciones propias de una cepa, ya que cuando se producen cambios en las secuencias de nucleótidos se tiene como consecuencia la alteración de los fenotipos. Un microorganismo puede mutar, de manera que no pueda sintetizar una molécula esencial para su crecimiento y la multiplicación (17). En ocasiones una mutación bloquea la síntesis de algunas enzimas y les impide por lo tanto desempeñar alguna función o actividad específica (17). Inclusive organismos de la misma especie pueden tener genes extras que les permite realizar actividades distintas.

En resumen, las diferencias que presentan los microorganismos en cuanto a sus requerimientos nutricionales y la capacidad para transformarlos, están determinadas, en parte, por los factores ambientales, así como por la constitución genética de los microorganismos y consecuentemente por las enzimas que poseen (16).

Algunos organismos tienen una batería reducida de enzimas, en tanto que otros son capaces de sintetizar una variedad amplia de sistemas enzimáticos. De este modo, cuanto mayor sea la variedad de enzimas que posee un microorganismo, mayor es la diversidad de materias primas que éste puede utilizar (16), por ejemplo, *Phanerochaete chrysosporium* y *Ceriporiopsis subvermispora*, ambos hongos filamentosos ampliamente utilizados en estudios de degradación a nivel de laboratorio, producen MnP, pero *P. chrysosporium* requiere estrictamente de Mn^{+2} para excretar a dicha enzima a diferencia de *C. subvermispora* que puede excretar manganeso peroxidasa sin la presencia de Mn^{+2} en el medio de cultivo (24). En la

mayoría de los hongos, MnP es producida como una familia de isoenzimas, las cuales pueden ser codificadas por genes relacionados estructuralmente. En el caso de *C. subvermispora* la presencia de las isoenzimas depende de las condiciones de crecimiento, por ejemplo en un cultivo líquido rico en sales, siete isoenzimas con peso molecular de 52.5 kDa han sido detectadas, mientras que cuando crecen en residuos de madera, este hongo produce sólo cuatro isoenzimas con un peso molecular de 62.5 kDa (24).

Resulta muy importante que dichas levaduras tengan la capacidad de fragmentar lignina aunque sea de manera parcial ya que podrían deslignificar selectivamente a la madera o residuos fibrosos como el bagazo, por medio de las enzimas que secretan y tener una aplicación potencial para remover lignina de materiales lignocelulósicos, facilitando el biopulpeo, el bioblanqueo y la destoxificación de contaminantes ambientales. Aunque todavía falta demostrar que estas levaduras no tienen actividad sobre la celulosa.

En otros estudios que se realizaron se observó que *Cryptomyces laurentii* degradó incluso más que *Pleurotus spp* y más que el consorcio formado entre *Cryptomyces laurentii* y *Geotrichum spp.*, esto demuestra que las levaduras que aquí se reportan pueden actuar por sí solas sobre la lignina y no necesitan de otros organismos para realizar dicha actividad, probablemente debido a que las levaduras sintetizan algunos compuestos que resulten tóxicos o dañinos para el hongo cuando se encuentran formando el consorcio inhibiendo o disminuyendo su actividad sobre la lignina.

En otra parte del estudio, resultó importante demostrar qué compuestos se formaron durante el metabolismo de los organismos. Para lo cual realizamos la técnica de microextracción en fase sólida (SPME) extrayendo a los compuestos generados durante el metabolismo de las cepas, que según lo reportado en la literatura, se trata de compuestos fenólicos. Esta técnica se aplica al análisis de compuestos como el benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos presentes en medio acuoso (42). Es una alternativa simple para la determinación de compuestos fenólicos, y se eligió porque justamente estas son las condiciones en las que se tuvieron a los compuestos que encontramos durante el presente estudio.

Durante el experimento se observó que los cultivos de donde proceden las muestras presentaban un pH = 2 por lo tanto una vez tomada la muestra para el análisis, se adicionaban gotas de NaOH a los matraces para mantener un pH = 5. Aunque para el análisis de los compuestos, el pH = 2 resultó conveniente ya que para desarrollar la

técnica, las muestras deben mantenerse a ese pH, permitiendo que los fenoles estén en un estado ácido no ionizado, además es importante saturarlas con NaCl para reducir la solubilidad de los fenoles en el agua (43).

Los resultados obtenidos de estos análisis confirmaron la degradación de lignina, ya que se encontraron compuestos, que proceden de la fragmentación de la lignina y aunque no pudieron determinarse a todos los metabolitos presentes, algunos que tuvieron mayor incidencia si pudieron identificarse.

Antes de tener la técnica estandarizada se realizaron diferentes ensayos, pues no existen reportes acerca de cómo deben medirse este tipo de muestras cuando se realiza por cromatografía de gases acoplado a masas, por lo tanto al inicio de los experimentos resultó un tanto difícil saber las condiciones bajo las cuales debían medirse.

En estudios preliminares se utilizó un estándar de fenoles clorados con la finalidad de comprobar que no se formaran compuestos organoclorados, como sucede en la industria, pues parte de este trabajo es demostrar que las cepas aisladas no producen esta clase de compuestos, ya que son sustancias contaminantes recalcitrantes.

Después del análisis, no se encontró ningún compuesto parecido al estándar de fenoles, pero si se encontraron sustancias como vainillina y fenol, hecho que dio la pauta para preparar los estándares de estos compuestos a una concentración de 2.5 ppm, demostrando su presencia en los medios de cultivo, así como determinar la concentración en la que se encontraban. Al final de estos experimentos se confirmó la presencia de vainillina (3-metoxi-4-hidroxibenzaldehído) en los sobrenadantes donde crecieron las levaduras 01, 02, 04, 05 y 07 y la presencia de fenol en los sobrenadantes donde crecieron las levaduras 01, 02, 05 y 07, y la concentración sólo pudo cuantificarse en los sobrenadantes de la cepa 07.

La presencia de estos compuestos en los caldos de cultivo demuestran la capacidad de las levaduras por utilizar a la lignina como fuente de carbono y convertirla en vainillina y fenol. Dori y col., reportaron que la vainillina, es un agente saborizante muy común que puede producirse a partir de la biodegradación de lignina (44, 45).

No se conoce la ruta metabólica exacta por medio de la cual se formó este metabolito, sin embargo, algunos autores reportan que diversos microorganismos pueden formar vainillina a partir de compuestos como el ácido ferúlico o la lignina, otros promueven la conversión de ácido vainíllico en vainillil alcohol, guaiacol, catecol y metoxihidroquinona, aunque los mecanismos químicos o bioquímicos por medio de

los cuales se realiza la conversión continúan siendo investigados (46). Uno de estos organismos es *Rhodotorula rubra*, que metaboliza eficientemente el ácido ferúlico en ácido vainílico y en vainillina, dependiendo del tiempo y las condiciones de incubación (46). Se sabe que el ácido ferúlico es extremadamente abundante en las plantas y el ácido vainílico es un producto obtenido por -oxidación del ácido ferúlico por especies de *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Polyporus*, *Rhodotorula* y *Streptomyces*. El ácido vainílico es un abundante precursor en la síntesis de vainillina (44, 45, 47).

Por otro lado, en la industria papelera, cuando se realiza el proceso de obtención de pulpa por el método sulfito, se forma sulfuro de vainillina cuando el alcohol vainílico se calienta con tiosulfato a pH 5 (1, 2).

Lo anterior demuestra que tanto por biodegradación, como por degradación con agentes químicos, la lignina puede transformarse en vainillina.

La identificación de vainillina y fenol como metabolitos confirman que las levaduras aquí estudiadas realizan diferentes vías metabólicas para la biotransformación de la lignina.

En cuanto a la presencia de fenol, queda demostrado que sí se forman compuestos aromáticos, ya que además del fenol también se observó la presencia del compuesto 2-metoxi-fenol, pero desafortunadamente no se contó con el estándar necesario para confirmar que se trata de dicho compuesto, aunque en los cromatogramas, apareció en repetidas ocasiones un pico representativo que según la biblioteca del equipo, indicaba que se trataba de este compuesto. Puede asumirse que se trata de este compuesto, ya que la lignina no es químicamente uniforme y tiene una estructura muy compleja. Los monómeros son todos derivados del fenilpropano y su complejidad resulta del gran número de diferentes enlaces que unen a los monómeros. Las diferencias en la composición de las ligninas se manifiestan en el contenido de grupos metoxi, por ejemplo 21% en árboles de hojas caducas, 16% en abeto y 14% en gramíneas (48).

Seguramente existen otros compuestos en los sobrenadantes donde crecieron las levaduras, pero no fue posible determinar a todos, por tal razón se sugiere que en estudios posteriores, se realicen más experimentos que confirmen de que compuestos se trata, así como verificar la ruta metabólica que siguen dichas levaduras.

En resumen, hasta esta parte del trabajo experimental, se comprobó que las levaduras silvestres estudiadas tienen actividad ligninolítica, hecho que resulta de gran importancia, ya que como se menciona anteriormente, pocos son los organismos levaduriformes que pueden desarrollar esta actividad. Además éstos estudios concuerdan con los realizados en *Trichosporon pullulans*, en los cuales se comprobó que ésta levadura realiza una degradación parcial de lignina cuando crece en un medio que contiene glucosa (29).

En otros reportes se menciona que levaduras como *Sacharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces lactis* pueden tener actividad ligninolítica pero no lo hacen de madera natural, sino cuando han sido transformadas con genes responsables de la síntesis de lacasas de hongos basidiomicetos (33).

Por otra parte, estos mecanismos de degradación nos llevaron a tratar de investigar desde el punto de vista molecular, cuales eran los genes que se activan durante dicha degradación.

Se tienen numerosos reportes que indican que son los genes *lip* y *mnp* los responsables de la degradación (19, 24, 25). Por lo tanto se realizó la extracción de DNA de cada uno de los microorganismos con la finalidad de amplificar alguno de estos genes, utilizando “*primers*” específicos reportados por Janse y col (25), quienes realizaron ensayos con *P. chrysosporium*, demostrando la expresión de los genes que codifican lignina peroxidasas, manganeso peroxidasas y glioxal oxidasas, cuando el microorganismo crece en madera. Además, Bogan y col., indican que la técnica de RT-PCR es un método adecuado para detectar todos los mRNAs correspondientes a todos los genes *lip* de *P. chrysosporium* (19). Por esta razón, primero realizamos la extracción de RNA, sin embargo tuvimos varios problemas para obtener el RNA de estas cepas y cuando se logró obtener y realizar la técnica de RT-PCR no obtuvimos ninguna amplificación, por esta razón se decidió extraer DNA cromosomal el cual también se utilizó como molde para la amplificación de los genes *lip* y *mnp*, pero tampoco se tuvieron resultados.

Creemos que los “*primers*” utilizados para este estudio, no son específicos para las levaduras que aislamos, ya que no se obtuvieron productos de PCR, y esto pudo deberse al hecho de que dichos “*primers*” no resultaron secuencias complementarias para el fragmento de DNA que se extrajo. Otra causa puede ser que los genes que se

buscaron, no estén presentes en las levaduras, aunque faltan estudios por realizar para demostrar este hecho.

Por lo tanto deben diseñarse otros *primers* que sean específicos para estos microorganismos, pues aunque los hongos filamentosos y los levaduriformes pertenecen al mismo reino, presentan diferencias en su organización genómica, y todos los estudios que se han realizado hasta la fecha para saber que genes participan en la degradación de lignina se derivan de ensayos realizados en hongos filamentosos. Cabe mencionar que estos resultados corresponden a la última parte en el desarrollo del presente trabajo, por lo tanto se sugiere que en investigaciones posteriores se confirme que genes son los que se encuentran implicados en la degradación, y se continúen estudiando a las levaduras, pues estos organismos son mas fáciles de manipular tanto genéticamente como en cultivo, debido principalmente a que requieren de menor tiempo de crecimiento ya que son organismos unicelulares pequeños y se pueden desarrollar como células haploides.

Además deben contemplarse dentro de las aplicaciones biotecnológicas al blanqueo de pasta de papel ya que demostraron su capacidad para reducir el contenido de lignina y a su vez reducir la eliminación de residuos tóxicos, pues finalmente dos de las razones por las que debemos aplicar las nuevas tecnologías es por la de preservar el ambiente y mejorar los procesos productivos.