

8. METODOLOGÍA

8.1 Aislamiento.

Las muestras de bagazo de caña de azúcar fueron recolectadas en la empresa Kimberly Clark, S.A de C.V en la ciudad de Orizaba, Ver. La importancia de elegir esta empresa radica en que es una industria altamente productiva para el país, además de la cercanía que tiene con la ciudad de Puebla.

Para el aislamiento se realizó la siguiente metodología. Se molió perfectamente la muestra y se pesó 1 g de la misma, posteriormente se depositó en un tubo de ensaye con 1 mL de agua destilada estéril, se agitó y se hicieron diluciones que van desde 10^{-2} hasta 10^{-7} .

Después de realizar éste procedimiento, se sembraron 3 cajas petri por dilución en medio mínimo con lignina como única fuente de carbono (Anexo-1).

8.2 Purificación.

Para evitar el crecimiento de bacterias y hongos filamentosos se sembraron las diluciones en medio Sabouroud (Anexo-2) y otras con medio papa dextrosa (Anexo-3) adicionadas con tetraciclina ($50 \mu\text{L}/\text{mL}$).

8.3 Identificación.

Una vez obtenidas las levaduras, se procedió a hacer la identificación de las mismas, por dos métodos:

8.3.1 Análisis de la morfología micro y macroscópica.

A cada una de las cepas aisladas, se les realizó la tinción de Gram para observarlas en el microscopio y analizar su morfología. Además se observaron en el medio de cultivo sólido para verificar su forma macroscópica.

8.3.2 Pruebas bioquímicas en galeras mini API

De igual forma que en la prueba anterior, a cada una de las levaduras se les realizaron pruebas bioquímicas en galeras mini API ID 32 C, que es un sistema de identificación de levaduras compuesto por test de asimilación estandarizados y miniaturizados que se compone de 32 cúpulas que contienen cada una un substrato carbonado deshidratado, los cuales se enlistan a continuación:

ABREVIATURA	NOMBRE	ABREVIATURA	NOMBRE
GAL	Galactosa	GLY	Glicerol
ACT	Actidiona = cicloheximida	RHA	Ramnosa
SAC	Sacarosa	PLE	Palatinosa
NAG	N-acetil glucosamina	ERY	Eritritol
LAT	DL lactato	MEL	Melibiosa
ARA	Arabinosa	GRT	Glucuronato
CEL	Celobiosa	MLZ	Melecitosa
RAF	Rafinosa	GNT	Gluconato
MAL	Maltosa	LVT	Levulina Te
TRE	Trealosa	MAN	Manitol
2KG	2-ceto-gluconato	LAC	Lactosa
MDG	-metl-D-glucosidasa	INO	Inositol
SOR	Sorbitol	GLU	Glucosa
XYL	Xilosa	SBE	Sorbosa
RIB	Ribosa	GLN	Glucosamina

Esta técnica consiste en obtener un cultivo puro y fresco de la cepa que se desea analizar, después se toma una asada de la muestra y se diluye en una solución salina. Posteriormente se colocan 100 µL de la muestra diluida en los pozos o galeras que

contiene la prueba y se incuban durante 48 horas a 37°C, procurando un ambiente húmedo para evitar la deshidratación de las galeras. Después del tiempo indicado se colocan en el equipo mini API y se toma la lectura correspondiente la cual indica a que género y especie pertenecen los microorganismos estudiados.

8.4 Curva de crecimiento y evaluación de la capacidad degradadora de lignina

Para verificar tanto el crecimiento de los organismos aislados como su capacidad de degradar lignina, se preparó medio mínimo adicionado con lignina al 0.2 % (8) en dos formas:

- Medio sólido en caja petri
- Medio líquido en matraces erlenmeyer de 250 mL

Se sembraron las diferentes levaduras bajo las siguientes condiciones de crecimiento: pH = 5, temperatura ambiente y agitación a 150 rpm para el caso de los matraces.

En el medio sólido sólo se esperó el crecimiento correspondiente y el cambio de coloración del medio de cultivo.

8.4.1 Curva de crecimiento

Para evaluar el crecimiento de las cepas, se tomaron diariamente 100 µL de medio de cultivo de cada uno de los matraces donde se sembraron a las levaduras, se colocaron en tubos Eppendorf que contenían 900 µL de agua estéril, se mezclaron y a partir de estos, se realizaron diluciones hasta 10^{-7} . Posteriormente cada dilución se sembró en

caja petri con medio sólido YEPD (método de cuenta viable). Cada caja se incubó a 37 °C y una vez obtenido el crecimiento se contaron las levaduras.

8.4.2 Degradación de lignina

Para analizar la degradación en medio líquido se observaron diariamente los matraces con el fin de verificar el cambio de coloración del medio de cultivo, y se tomaron muestras de los matraces (5 mL) cada tercer día durante 39 días. Dichas muestras se centrifugaron por 5 minutos a 13,000 rpm, con el fin de extraer la masa celular y obtener únicamente el caldo de cultivo.

Para determinar la concentración de lignina en los matraces se preparó una curva de calibración, ya que las lecturas correspondientes de cada muestra corresponden al valor de absorbancia y lo que se deseaba saber era como iba cambiando la concentración de lignina en el medio de cultivo una vez que las levaduras realizaban la degradación del polímero.

Las muestras que se midieron para dicha curva fueron del medio de cultivo (medio mínimo) sin microorganismo preparado bajo las mismas condiciones que para el utilizado en los cultivos con las cepas (lignina 0.2%, glucosa 1%, pH =5, agitación 150 rpm). Las lecturas se realizaron a 560 nm según lo reportado en estudios anteriores (8).

Cada muestra se analizó en un espectrómetro Varian (modelo CARY 100) midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 560 nm (8), para determinar posteriormente la concentración de lignina (mediante curva de calibración) presente en cada matraz.

8.5 Determinación de los metabolitos que se produjeron durante la degradación.

Para la determinación de los metabolitos que se formaron durante la degradación, se realizó la técnica de microextracción en fase sólida utilizando un cromatógrafo de gases Varian Star 3400 CX acoplado a un espectrómetro de masas modelo Varian Saturn 2000.

Cabe mencionar que como se tienen reportes acerca de que en la industria papelera la degradación de lignina, genera compuestos fenólicos (2, 28), se procedió a realizar la técnica antes mencionada para buscar dichos compuestos, utilizando un estándar de fenoles (marca SUPELCO), a una concentración de 2 ppm.

Por lo tanto se corrieron dos programas diferentes dependiendo de las sustancias que se deseaban determinar.

8.5.1 Algunos Compuestos fenólicos

La temperatura de la columna fue de 40°C por tres minutos y después se incrementó a 240°C a una velocidad de 20°C por minuto. La temperatura del inyector se mantuvo a 280°C y la línea de transferencia a 240°. Utilizando para dicha determinación una fibra de poliacrilato de 85µm de espesor. El tiempo de extracción fue de 20 minutos y el tiempo de desorción fue de 3 minutos a una temperatura de 240°C.

8.5.2 Vainillina y Fenol

La temperatura de la columna fue de 60°C por tres minutos y después se incrementó a 240°C a una velocidad de 20°C por minuto. La temperatura del inyector se mantuvo a 280°C y la línea de transferencia a 240°. El tiempo de extracción fue de 30 minutos y el tiempo de desorción fue de 3 minutos a una temperatura de 240°C.

La columna utilizada fue una columna capilar de 30 m de largo por 0.25 mm de diámetro interno por 0.25µ de película. En ambos casos la preparación de la muestra consistió en tomar 3 mL de cada caldo y se colocaron en un vial con 0.75 g de cloruro de sodio (NaCl). La mezcla se mantuvo en agitación durante la extracción.

8.6 Extracción de ácidos nucleicos.

Con el fin de posteriormente amplificar el gen implicado en la degradación de lignina, se extrajo el DNA, utilizando el protocolo de Evans (38):

- A partir de un cultivo en medio líquido YEPD (Anexo-4) de las diferentes levaduras (agitación de 150 rpm, temperatura ambiente y 48 horas de incubación) se tomaron 3 mL y se colocaron en un tubo Eppendorf estéril tratado con agua

DEPC. Se centrifugó la muestra a 13000 rpm durante 5 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y se obtuvo la masa celular correspondiente.

- Una vez obtenida la masa celular, se realizó un lavado con Buffer LET (Anexo-5). Esto consiste en agregar 1 mL del buffer al tubo que contiene el paquete celular, se agita vigorosamente en vortex y se centrifuga a 13000 rpm durante 5 minutos a 4°C.
- Se desechó el sobrenadante y se repitió el lavado al menos dos veces.
- Se resuspendió el paquete celular en 100 µL de fenol y 200 µL de buffer LET a 4°C usando vortex para mezclarlos.
- Se adicionaron perlas de vidrio y se agitó la mezcla vigorosamente por un minuto.
- La mezcla se llevó a temperatura ambiente y se adicionaron 100 µL de cloroformo, 100 µL de agua DEPC, y 30 µL de buffer TNES 10X (Anexo-6) precalentado a 55°C se agitó en vortex durante 2 minutos. Se centrifugó la muestra a 10000 rpm por 2 minutos.
- Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo Eppendorf estéril conteniendo previamente 150 µL de fenol y 150 µL de cloroformo (tener cuidado para evadir la interfase). Se agitó la mezcla en vortex por 30 segundos y posteriormente se centrifugó a 10000 rpm por 2 minutos.
- Se repitió la extracción fenol:cloroformo al menos 2 veces hasta que desapareció la interfase.
- Se transfirió la fase acuosa a un tubo Eppendorf que contenía 800 µL de éter, se mezcló por 20 segundos y se centrifugó a 10000 rpm por 5 segundos.
- Se descargó la fase del éter, y se adicionó 0.1 volumen de acetato de potasio 3 M y 1 mL de etanol absoluto. Se almacenó la muestra a -20°C durante toda la noche.
- Para verificar que se haya efectuado la extracción se realizó la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1.2 %, utilizando como marcadores de peso molecular a y .

8.7 Amplificación de los genes

Para verificar que algunos de los genes implicados en la degradación de lignina están presentes en las levaduras que se aislaron, se realizó la técnica de PCR. La elección de los “*primers*” se llevó a cabo revisando la literatura, se buscaron los genes implicados

en la degradación de lignina y se tomaron los “*primers*” ya reportados por Janse y col. (25), los cuales fueron específicos en el microorganismo *P. chrysosporium*, dichos *primers* corresponden a los genes *lipF* y *mnp3* (Tabla-4).

Tabla-4. Secuencia de los “*primers*” utilizados para la amplificación

Nombre	Secuencia
<i>lip F</i>	5´ TGCCCTTGAGTCTCAAGG 3´ ACGCGAGAGATGATCTGG
<i>mnp3</i>	5´TCCGACGGTACCAAGGTCAAC 3´ AGCGGCAGCGGCGACGCGAC

La amplificación se llevó a cabo con el DNA de cada una de las levaduras que fueron capaces de degradar lignina.. Una vez que se obtuvieron los “*primers*”, estos se reconstituyeron con TE (Anexo-7) y se mantuvieron a -70°C , para usos posteriores. El protocolo de amplificación es el siguiente:

En un tubo para PCR estéril se preparó la mezcla con un volumen final de 50 μL , la cual contiene: 25.6 μL de agua estéril, 5 μL de buffer 10X, 4 μL de MgCl_2 25 mM, 5 μL de dNTPs 2 mM, 5 μL de primers 3 μM , 5 μL de la muestra de DNA y al final 0.4 μL (2U) de Taq DNA polimerasa.

Se realizó pre-PCR bajo el siguiente programa de temperaturas: 94°C por 6 minutos, 54°C por 2 minutos y 72°C por 40 minutos. La amplificación del DNA se realizó con el siguiente perfil de temperaturas: 94°C durante 1 minuto (temperatura de desnaturalización), 54°C durante 2 minutos (temperatura de hibridación) y 72°C por 5 minutos (temperatura de elongación). Este programa se repitió durante 35 ciclos de amplificación. Al final de éste la temperatura se mantuvo a 72°C por 15 minutos y después descendió a 4°C . Finalmente la muestra se almacenó a -20°C .

Para confirmar la amplificación de los fragmentos (gen *lipF* 257 bp y gen *mnp3* 227 bp), se realizó la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, utilizando como marcadores de peso molecular a y .