

Tesis Doctoral

Relevamiento de cepas argentinas de hongos ligninolíticos para su aplicación en procesos biotecnológicos ligados a la industria celulósico-papelera

Da Re, Cristina Verónica

2016-04-15

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Da Re, Cristina Verónica. (2016-04-15). Relevamiento de cepas argentinas de hongos ligninolíticos para su aplicación en procesos biotecnológicos ligados a la industria celulósico-papelera. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Da Re, Cristina Verónica. "Relevamiento de cepas argentinas de hongos ligninolíticos para su aplicación en procesos biotecnológicos ligados a la industria celulósico-papelera". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-04-15.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

**Relevamiento de cepas argentinas de hongos ligninolíticos para
su aplicación
en procesos biotecnológicos ligados a la industria celulósico-
papelera**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área: **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Cristina Verónica Da Re

Directores de Tesis: Dra. Laura Noemí Levin
Dr. Victor Leandro Papinutti

Consejera de Estudios: Dra. Laura Noemí Levin

Lugar de trabajo: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental.
Laboratorio de Micología Experimental.

Buenos Aires 2016

Relevamiento de cepas argentinas de hongos ligninolíticos para su aplicación en procesos biotecnológicos ligados a la industria celulósico-papelera

Los materiales lignocelulósicos dan origen a múltiples industrias, siendo la fabricación de pulpa y papel una actividad económica de importancia global. Estudios previos demostraron que las enzimas de hongos ligninolíticos podrían resultar útiles en distintas etapas del procesamiento de la madera, así como en la biorremediación de los efluentes. El presente trabajo se centró en el relevamiento y la caracterización enzimática de 35 cepas de hongos causantes de pudrición blanca de la República Argentina y en su posible utilización en tres etapas específicas de la producción de pulpa y papel: biopulpado, bioblanqueo y degradación del licor negro. Los resultados de esta investigación permitieron identificar una cepa con potencial para el biopulpado de madera de *Pinus taeda*. *Pycnoporus sanguineus* no sólo fue capaz de reducir el contenido de lignina un 11% en 14 días de tratamiento, sino que también produjo cambios estructurales notables en la lignina y la hemicelulosa, incrementando la porosidad 15%. Además de la modificación química causada por delignificación selectiva, los cambios físicos producidos, como el aumento del tamaño de poro, afectan directamente la penetración de productos químicos de cocción, reduciendo el consumo de energía en el proceso. En referencia al bioblanqueo, se lograron resultados promisorios mediante una secuencia sencilla, totalmente libre de cloro, que involucró sobrenadantes de cultivo de *Trametes trogii* y *Coriolus antarcticus*, y posterior blanqueo con peróxido de hidrógeno. La misma funcionó aun en condiciones moderadas (28 °C) lo que permite minimizar el consumo de energía y la pérdida de pulpa. La utilización de crudos enzimáticos evita el costo elevado de la purificación enzimática y el uso de mediadores adicionales. Entre las cepas investigadas para su posible uso en el tratamiento del licor negro, *Lenzites elegans* fue capaz de lograr buenos porcentajes de decoloración, y sólo requirió para ello de la disminución del pH del efluente con el agregado de ácido cítrico. *Irpex lacteus* también resultó capaz de decolorarlo, pero fue necesario un dializado previo. Como resultado de esta investigación, se identificaron nuevas cepas de hongos ligninolíticos con potencial en biopulpado, bioblanqueo y decoloración del licor negro y se analizaron condiciones a ser tenidas en cuenta a la hora de utilizar a estos organismos o sus enzimas en dichos procesos.

Palabras claves: hongos causantes de pudrición blanca, enzimas ligninolíticas, biopulpado, bioblanqueo, decoloración licor negro

Screening of Argentinean ligninolytic fungal strains for their biotechnological application in the pulp and paper industry

Lignocellulosic materials give rise to multiple industries, being the pulp and paper an economic activity of global importance.

Previous studies demonstrated that fungal ligninolytic enzymes may be useful in various stages of wood processing and effluents bioremediation.

This work focuses on the screening and enzymatic characterization of 35 strains of Argentinean white-rot fungi and their possible use in three specific stages of pulp and paper elaboration: biopulping, biobleaching and black liquor degradation.

As a result of this research a strain with potential for biopulping *Pinus taeda* wood was identified. *Pycnoporus sanguineus* was not only able to reduce the lignin content 11% in 14 days of treatment, but also caused significant structural changes in lignin and hemicellulose, increasing the porosity of treated wood 15%. In addition to the chemical modification caused by selective delignification, the produced physical changes such as increased pore size, directly affect the penetration of cooking chemicals, reducing energy consumption in the process.

Promising results were achieved through a totally chlorine free biobleaching sequence, involving culture supernatants of *Trametes trogii* and *Coriolus antarcticus* and a subsequent step of hydrogen peroxide bleaching. This sequence was functional even under mild conditions (28 ° C), thus minimizing power consumption and pulp loss. Using crude enzyme avoids the high cost of enzyme purification and the need of additional mediators.

Among the strains investigated for their potential use in the treatment of black liquor, *Lenzites elegans* was able to attain good levels of decolorization, and only required lowering the pH of the effluent with citric acid addition. An important decolorization was also achieved by *Irpex lacteus* but only after the dialyzation of the effluent.

As a result of this research, new strains of ligninolytic fungi with potential for biopulping, biobleaching and black liquor decolorization were identified, and several parameters that may affect the use of these organisms or their enzymes in the pulp and paper industry, were optimized.

Key words: white-rot fungi, ligninolytic enzymes, biopulping, biobleaching, black liquor decolorization

Agradecimientos:

Al vital y casi infinito acompañamiento de mis directores Laura y Leandro. En especial a la larga lucha de Laura para ir avanzando sobre cuestiones concretas, sin ella esta tesis hoy no estaría aquí. A la visión alternativa de casi todas las cosas de Leandro que tantas veces me ayudó. A la Doctora Flavia Forchiassin, por haberme abierto las puertas del laboratorio 8 y por introducirme en el maravilloso mundo de los hongos. A la doctora Patricia Pardo, por darme la oportunidad inicial de conocer el trabajo en un laboratorio y terminar siendo mi amiga. A todos los integrantes de los laboratorios 8 y 9 por toda la ayuda brindada generosamente, Isabel, Luis, Nora, Ema, Marcela, Eugenia, Mayra, Fran.

A mis padres, Marita y Mario y a mis abuelos Angélica y Lorenzo por la incondicionalidad en el amor. A mis hermanos Viviana y Javier, por la historia compartida. A los amigos de toda la vida y a los más recientes Susana, Mirtha, Sandra y Sandra, Gabi, Sonia, Dario, Marcela, Liliana, Silvia por el acompañamiento y el apoyo constante. Párrafo aparte para Darío Andrada, sin su talento enorme no hubiera tenido jamás pósters tan lindos como los que tuve. A mis acompañantes permanentes: Octavio, Calixta, Kirey, Tsunami, Rosendo y Jengibre que pasaron tantas horas junto a la compu.

Y un agradecimiento profundo para los trabajadores y trabajadoras de nuestra patria que nunca pudieron acceder a la universidad y sin embargo la construyeron y la sostienen. Ningún logro grande o minúsculo se construye en soledad. A todos ellos mi infinito reconocimiento y mi inquebrantable deseo de llegar a ser digna de ellos.

A los sueños queridos.

Índice

1: Introducción

						Página		
Pared celular	Generalidades					1		
	Estructura y composición de la pared celular de vegetales					2		
	Componentes de la pared celular en la madera	Celulosa, hemicelulosas y sustancias pécticas					5	
		Lignina					6	
		Otros componentes de la pared celular					9	
Tipos de pudrición	Hongos causantes de pudrición castaña					12		
	Hongos causantes de pudrición blanca					16		
	Hongos causantes de pudrición blanda					17		
Enzimas involucradas en la degradación de los componentes de la pared celular						18		
	Degradación enzimática de la lignina					19		
		Lacasa					21	
		Peroxidasas modificadoras de lignina						23
			Lignin peroxidasa					24
			Manganeso peroxidasa					25
			Peroxidasa versátil					25
		Peroxidasa decolorante de tintes					26	
	Degradación	Endo-1,4-β-					28	

	enzimática de la celulosa	glucanasas					
		Exoglucanasas				28	
		β -glucosidasas				28	
		Otras enzimas que intervienen en la degradación de la celulosa				28	
		Celobiosa dehidrogenasa				30	
		Degradación enzimática de hemicelulosas	Enzimas xilanolíticas				31
Industria	Aspectos generales					32	
	Etapas de la fabricación de pulpa y papel	Preparación de la madera					35
		Cocción					36
		Blanqueo					37
		Secado y embalado					38
		Recuperación de energía y reactivos					39
		Control de emisiones aéreas y olor					39
	Manejo de residuos sólidos					40	
Usos biotecnológicos potenciales de los hongos degradadores de la madera						41	

2: Objetivos

	Página
Objetivos generales	43
Objetivos específicos	43

3. Biopulpado

						Página		
Introducción						44		
Materiales y Métodos	Organismos					48		
	Relevamiento de la capacidad ligninolítica en placa					48		
	Experimentos de degradación de la madera	Condiciones de cultivo para los experimentos con condiciones de esterilidad					48	
		Extracción					49	
		Ensayos enzimáticos					49	
		Análisis de la composición de la madera	Composición química					50
			Porosidad					51
			Análisis de Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)					51
		Resultados	Relevamiento de la capacidad ligninolítica en placa					52
	Experimentos de degradación de la madera					55		
Conclusiones						63		

4 Bioblanqueo

						Página	
Estudios preliminares y selección de <i>Trametes trogii</i> (BAFC 463) para secuencia de bioblanqueo	Introducción					65	
	Materiales y métodos	Organismos					68
		Medio y condiciones de cultivo					68
		Tratamiento enzimático realizado sobre la pulpa Kraft de <i>Pinus taeda</i>					68
		Blanqueo					68
		Efecto de los mediadores					69
		Evaluación de las propiedades de la pulpa					69
		Estimación de las actividades enzimáticas y de la concentración de H ₂ O ₂					69
	Resultados y discusión						70
Optimización de los parámetros del proceso de bioblanqueo usando <i>T. trogii</i>						75	
	Materiales y métodos	Organismo, medio y condiciones de cultivo					77
		Tratamiento enzimático de la pulpa Kraft industrial					77
		Tratamiento con peróxido					77
		Evaluación de las propiedades de la pulpa					77
		Determinación de las actividades enzimáticas					79
		Diseño experimental y análisis estadístico					79
	Resultados	Influencia de la temperatura de incubación y tiempo de tratamiento en la etapa enzimática					80
		Experimentos preliminares sobre el					81

		impacto de la consistencia de la pasta, pH del buffer y de la dosis de peróxido de hidrógeno				
		Modelado				82
	Conclusión					91
Bioblanqueo con sobrenadantes de cultivo de <i>Coriolus antarcticus</i> (BAFC 266)	Organismo, medio y condiciones de cultivo					93
	Tratamiento enzimático de la pulpa Kraft					93
	Blanqueo					94
	Resultados y discusión					94
Conclusiones						97

5- Decoloración del Licor Negro

						Página
	Introducción					99
Decoloración de licor negro dializado	Materiales y métodos	Organismos				101
		Decoloración del licor negro				102
		Decoloración en placas con medios agarizados				102
		Decoloración en medio líquido				102
		Decoloración bajo condiciones de fermentación en estado sólido				103

		Estimación de la decoloración del licor negro				103
		Actividades enzimáticas				104
	Resultados	Decoloración en placas de Petri con medio agarizado				104
		Decoloración en medio líquido				106
		Decoloración bajo condiciones de fermentación en estado sólido				106
		Actividades ligninolíticas				108
	Discusión					110
Evaluación de la capacidad de decolorar licor negro no dializado	Materiales y métodos	Organismos				114
		Decoloración en placa con medios agarizados				114
		Decoloración en medio líquido				115
		Resultados y discusión				115

	Página
6. Discusión final y conclusiones	125
7. Referencias	127

1. Introducción

La celulosa y la lignina constituyen los principales componentes orgánicos de la materia vegetal, siendo la lignina la biomolécula aromática más abundante del planeta. Por este motivo, la biomasa presente en los materiales lignocelulósicos, representa una gran cantidad de energía disponible en los ecosistemas, sin embargo acceder a ella no es una tarea sencilla.

Entre los organismos capaces de enfrentar este desafío se encuentran tanto hongos como bacterias, siendo los primeros los más notables y eficientes descomponedores de madera en los ambientes aeroterrestres. La primera dificultad reside en el hecho de que la madera tiene un bajo contenido en nitrógeno lo que la vuelve un recurso excepcionalmente difícil de descomponer. (C: N de abedul es de 55 y el sicómoro 401). El nitrógeno es el factor limitante para el crecimiento de los hongos ya que resulta indispensable para la síntesis enzimática y la producción de proteínas estructurales (Schwarze, 2007). Además, la madera contiene compuestos potencialmente fungotóxicos, que se depositan en las zonas de interface hongo- hospedador. En las gimnospermas la madera puede contener una serie de compuestos fenólicos, tales como terpenos, estilbenos, flavonoides y tropolones. El más tóxico de los tropolones es el hinokitiol que actúa como un agente quelante que secuestra iones férricos impidiendo el inicio de las reacciones tipo Fenton (Diouf et al., 2002).

Algunos hongos ligninolíticos pueden degradar estos compuestos, pero las distintas especies fúngicas difieren en sus capacidades para atacar a estas moléculas. Además, la disponibilidad de oxígeno, también es heterogénea, pudiendo ser mayor en algunas partes de la madera que en otras, lo que es particularmente importante en función tanto del crecimiento del propio hongo como por la actividad de algunas de sus enzimas.



Estructura y composición de la pared celular de vegetales

Durante la maduración de las células leñosas, todas las capas de la pared junto con la laminilla media son, en mayor o menor medida, impregnadas con lignina. La lignificación es especialmente pronunciada en la laminilla media, donde puede superar el 80% en las regiones localizadas entre las esquinas de las fibras (Schwarze, 2007).

Tomando la pared celular como un todo, la composición típica es de aproximadamente (peso seco de la madera) 50% de celulosa, 25% lignina, hemicelulosa 20-25%, 1-4% de pectina. Generalmente el contenido de lignina de la madera en gimnospermas es mayor que la de la madera en angiospermas. Aumentando la complejidad, esta heterogeneidad es tanto macroscópica como microscópica. Macroscópicamente los descomponedores deben enfrentarse a la altísima diversidad del mundo vegetal, en el que distintas especies vegetales presentan distinta composición de las ligninas y hemicelulosas. Microscópica o localmente, a la desigual distribución de tejidos y a las diversas capas de la pared celular y a las diferentes composiciones químicas de algunos de sus constituyentes como la lignina, la pectina y las hemicelulosas. Todo esto podría haber actuado como una fuerte presión de selección sobre la diversidad de las enzimas fúngicas implicadas en el biodeterioro así como sobre su reducida especificidad.

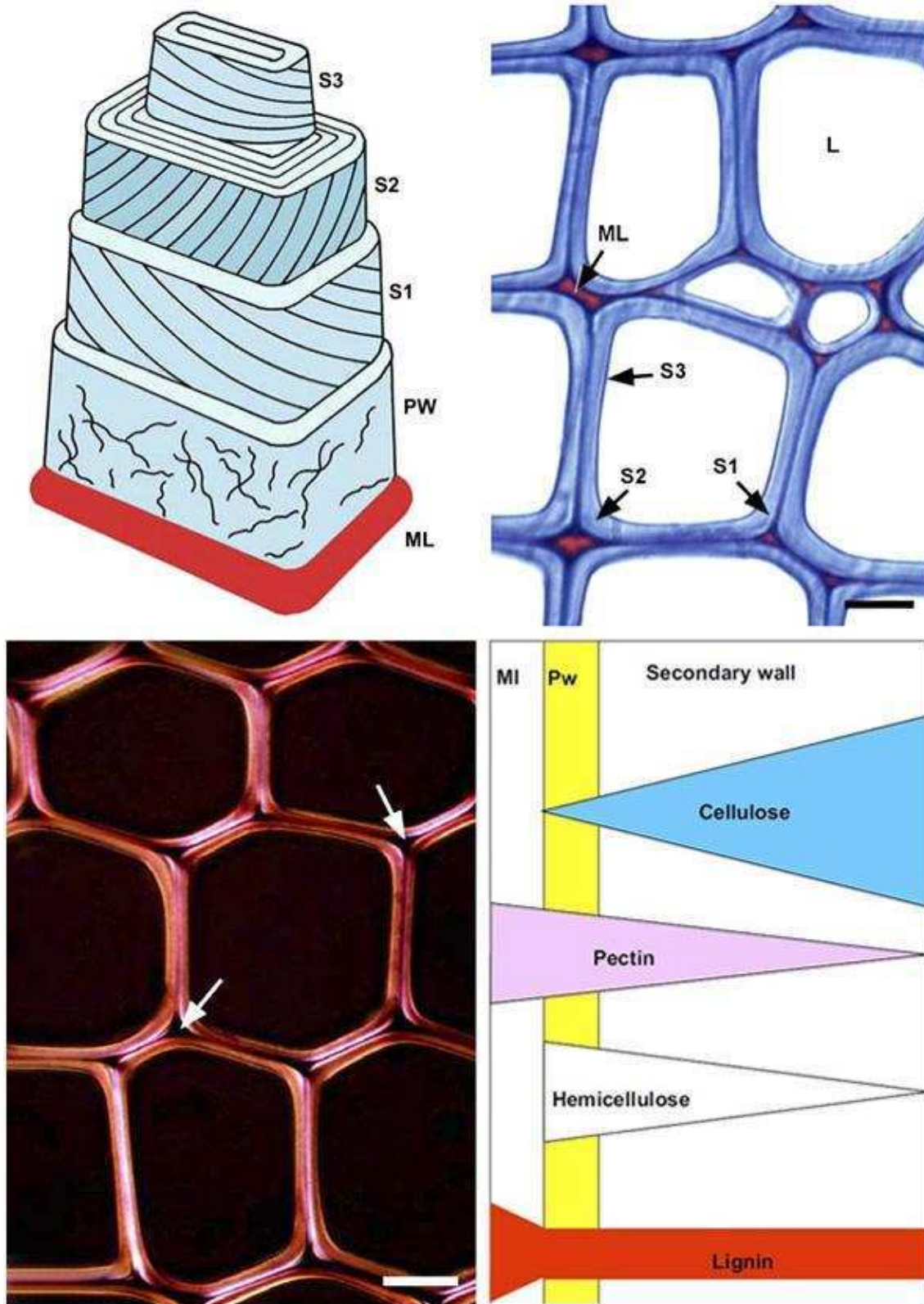


Figura (I1) Arriba a la izquierda: Modelo de la pared celular convencional que distingue cinco capas de la pared celular. Laminilla media (ML), pared primaria (PW) y pared secundaria de tres capas (S): externa (S1), media (S2) y la interna (S3). Arriba a la derecha: la sección transversal (ST) de traqueidas de madera temprana. L lumen. Bar, 10 mm. Abajo a la izquierda: Sección transversal de madera temprana vista entre Nicotianes cruzados. Abajo a la derecha: distribución relativa de los componentes de la pared.

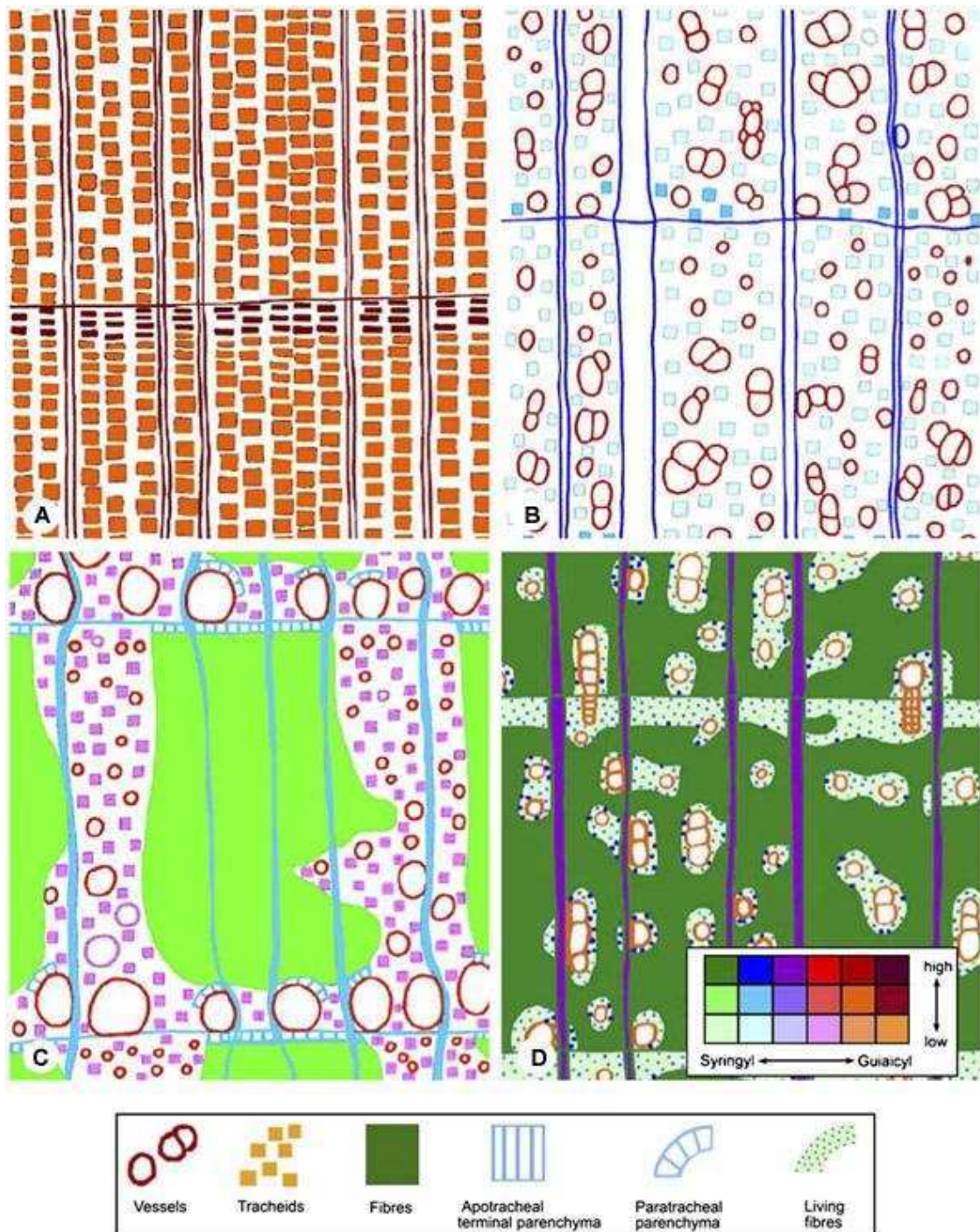


Figura I 2: Composición de la lignina. Etapas evolutivas en el desarrollo de sistemas vasculares en los árboles. (a). Etapa 1: traqueidas sin vasos por ejemplo Abeto rojo. (b) Etapa 2 traqueidas con vasos por ejemplo, haya. (c) Etapa 3: traqueidas, vasos y fibras, ejemplo, roble. (d) Etapa 4, fibras sicómoro. Nota: Muchos autores utilizan el término fibro- traqueidas para describir a las traqueidas en árboles de hoja caduca. Espectro de colores representa la composición monomérica de la lignina dentro de las células de la madera de cada etapa evolutiva.

Más íntimamente, La pared celular del tallo leñoso está organizada en capas de diferentes espesores y proporciones de celulosa, hemicelulosa y lignina; (Brändström, 2001) (Fig. I. 1). La pared celular propiamente dicha consta de una delgada pared primaria, a la que se añade posteriormente una pared secundaria mucho más gruesa formada por tres capas, la S1, la S2 y la S3. La distribución de las moléculas que componen las paredes celulares, varía enormemente dependiendo de la especie analizada, e incluso entre tallo joven y tallo maduro (Fig. I.2 a, b,c y d).

Las paredes de las células adyacentes están vinculadas entre sí por la laminilla media, formada principalmente por lignina, sustancias pécticas y calcio (Fig. I1 b, c, d).

Componentes de la pared celular en la madera:

El principal componente estructural de las paredes celulares en la madera joven es la **celulosa**, un polisacárido de glucosa sin ninguna ramificación lateral. Esto origina una estructura cristalina, que tiene la propiedad óptica de ser birrefringente cuando se la observa con Nicols cruzados (Fig. I. 1 c). Por lo general, la celulosa cristalina altamente organizada resulta dominante mientras que una pequeña fracción se encuentra en estado amorfo no organizado que es mucho más susceptible a degradación (Kuhad et al., 1997). Dentro de la pared celular, la celulosa existe como un sistema de fibrillas de 3-4 nm de diámetro, arreglados en unidades estructurales mayores. Las microfibrillas de celulosa están enrolladas helicoidalmente en ángulos diferentes en las distintas capas de la pared celular.

Posiblemente, estas diferentes disposiciones helicoidales contribuyan a la resistencia mecánica de la madera. Las moléculas de celulosa están rodeadas por la **lignina y hemicelulosas**. Las principales **hemicelulosas** presentes en coníferas son galactoglucomanano, glucomanano y arabinoglucuronxilano.

En la laminilla media, se encuentran las **sustancias pécticas** compuestas principalmente por ácido poligalacturónico que junto con los iones Ca^{2+} forma pectato de calcio (Fengel and Wegener, 1983).

Estas **sustancias pécticas** son heteropolisacáridos ramificados de alto peso molecular cuya cadena principal está formada por ácidos galacturónicos con uniones α 1,4 asociada a azúcares neutros. Los grupos carboxilo de los residuos de ácido galacturónico pueden estar parcialmente esterificados con metanol. El grado de esterificación, la proporción de los sacáridos neutros en las

cadena laterales, y el grado de polimerización, son los principales motivos de la heterogeneidad de las sustancias pécticas en el mundo natural (Fig I 4 y6).

Lignina

Se trata de un polímero aromático complejo, amorfo, tridimensional, insoluble en agua y soluble en soluciones alcalinas, compuesto por unidades de fenilpropano, que se sintetiza a partir de la polimerización oxidativa de los alcoholes *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico. La polimerización de la lignina se inicia por la oxidación enzimática de los precursores a fenoxiradicales (por abstracción de un electrón). Estos radicales libres pueden reaccionar unos con otros en una gran variedad de formas lo que conduce a que la lignina no tenga una estructura única. En fibras y traqueidas, la delgada laminilla media tiene el más alto contenido de lignina, mientras que la mayor parte de ésta se encuentra en las capas de la gruesa pared secundaria imbricada con las fibrillas de celulosa y las hemicelulosas (Eriksson et al., 1990a). La lignina cumple un importante rol mecánico siendo indispensable para el sostén de las plantas vasculares y al mismo tiempo contribuye con el transporte de agua al ser un componente importante del xilema. Además brinda protección a las plantas frente al ataque de los microorganismos al disminuir la accesibilidad a la celulosa y las hemicelulosas formando un fuerte entramado con ellas (Fig I. 3).

La composición de la lignina es muy variable según las especies. Además de la clasificación por tipo de plantas que la poseen (lignina de angiospermas, gimnospermas y de herbáceas) (Fig. I. 2) químicamente se la puede dividir en dos grandes grupos: ligninas guayacil y guayacilo-siringil ligninas)(Fig I. 5).

Ligninas guayacilo son predominantemente productos de polimerización de alcohol coniferílico mientras ligninas guayacilo-siringil se componen de partes diferentes guayacil de núcleos aromáticos y siringil, junto con las pequeñas cantidades de unidades de *p*-hidroxifenilo (Fengel and Wegener, 1989)

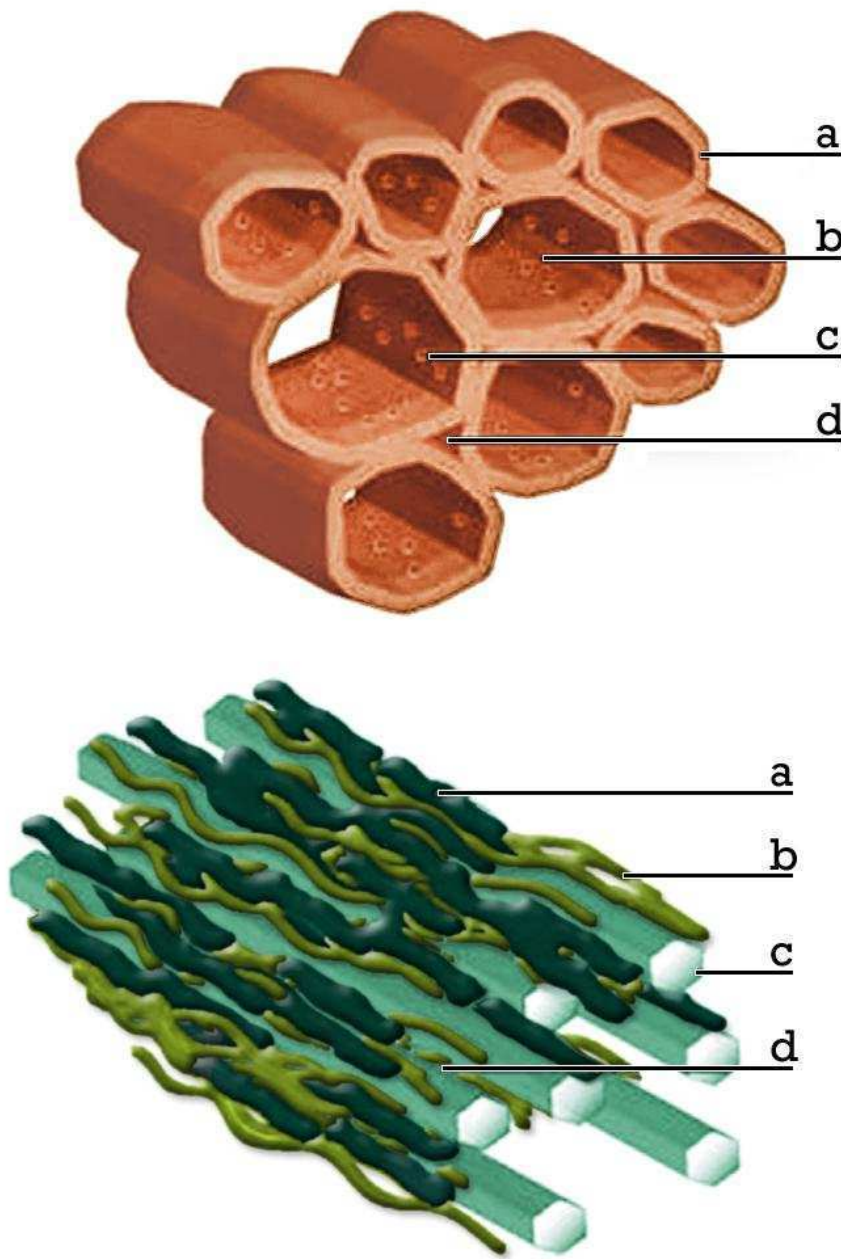


Figura I 3: Representación de varias escalas de la porosidad del lumen de células hasta los nanoporos entre microfibrillas recubiertas.

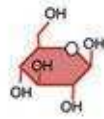
Imagen superior: a-Pared celular; b- Lumen; c-Poro; d- Espacio intercelular.

Imagen inferior: a- Lignina; b-Hemicelulosa; c- Celulosa; d- Espacio del nano-poro.

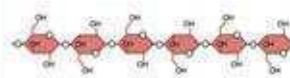
Tomado de (Viamajala et al., 2010). Modificado por Darío Andrada.

Celulosa

Glucose



Cellulose

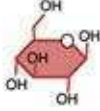


Cellulose microfibril

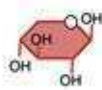


Hemicelulosa

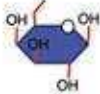
Glucose



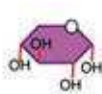
Xylose



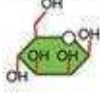
Galactose



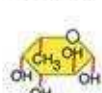
Arabinose



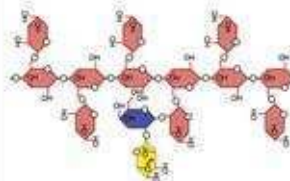
Mannose



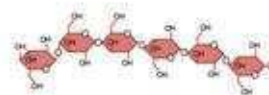
Fucose



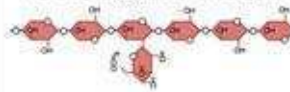
Fucoside xyloglucan



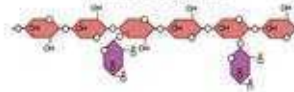
Mixed-linkage glucan



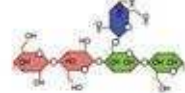
4-O-methylglucuronoxylan



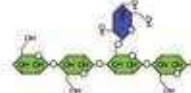
Arabinoxylan



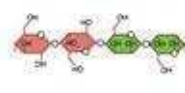
Glucogalactomannan



Galactomannan

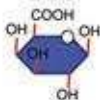


Glucomannan

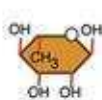


Pectinas

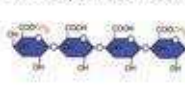
Galacturonic acid



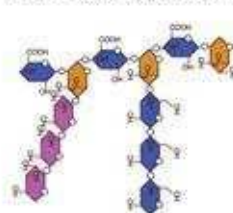
Rhamnose



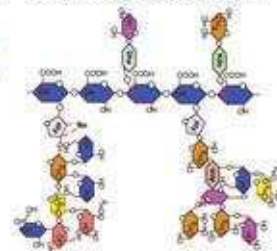
Homogalacturonan



Rhamnogalacturonan I

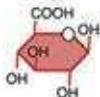


Rhamnogalacturonan II

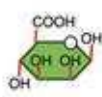


Acidos urónicos

Glucuronic acid



Mannuronic acid



Unidentified polymers

Lignina

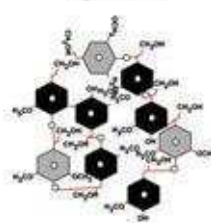
Guaiacyl unit



Syringyl unit



Lignin GS



Lignin G

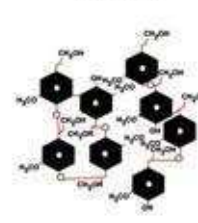


Figura I. 4: Estructura química de los bloques de construcción predominantes de las paredes celulares de las plantas. Panel izquierdo, monómeros. Panel derecho subunidades de los respectivos polímeros. Extraído de (Sarkar et al., 2009).




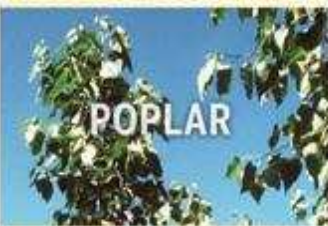
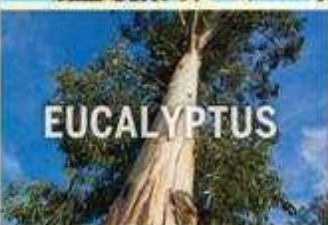

Las proporciones de estos monómeros varían entre células individuales y entre las distintas capas de la pared celular e influyen fuertemente en la resistencia frente al ataque fúngico (Fukazawa, 1992). La madera de las gimnospermas es químicamente más sencilla que la de las angiospermas y consiste casi exclusivamente en monómeros guayacilo. Los hongos causantes de pudrición blanca son más comunes en las angiospermas que en gimnospermas en la naturaleza. Por lo general, las unidades siringil (S) de la lignina se degradan preferencialmente, mientras que las unidades guayacilo (G) son más resistentes a la degradación. Muchos hongos causantes de pudrición blanca colonizan el lumen de las células y causan la erosión de la pared celular; las zonas erosionadas coalescen y se forman grandes huecos llenos de micelio. Este tipo de pudrición se conoce como no-selectiva o simultánea (Hatakka and Hammel, 2011a).

La enorme diversidad química y anatómica de los tejidos vegetales ha representado un enorme desafío para los descomponedores. Los hongos lignocelulolíticos a lo largo de su evolución desarrollaron distintas estrategias de ataque a la madera y distintas baterías enzimáticas y mecanismos no enzimáticos para poder acceder a la celulosa y otras moléculas metabolizables.

Otros componentes de la pared celular

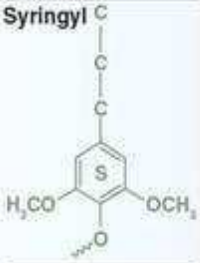
Además dependiendo de la especie de madera, 2-5% del peso seco de la misma se compone de extractivos (Sjoström and Westermarck, 1999). Se trata de componentes no estructurales de la madera. Ellos se pueden dividir ampliamente en terpenos, resinas, y fenoles (Kuhad et al., 1997).

Estos diversos compuestos orgánicos tienen varias funciones, pudiendo actuar como una reserva de nutrición para las células vivas, así como otorgar protección contra la degradación microbiana. Además, también están presentes en bajas cantidades proteínas y compuestos inorgánicos (Fengel and Wegener, 1989).

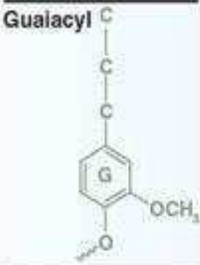
Plant resource	% Hemicellulose	% Cellulose	% Lignin*
 MISCANTHUS	24-33	45-52	9-13
 SWITCHGRASS	26-33	37-32	17-18
 CORN STOVER	31	37	18
 POPLAR	16-22	42-48	21-27
 EUCALYPTUS	24-28	39-46	29-32
 PINE	23	46	28

*Typical aromatic polymer containing:

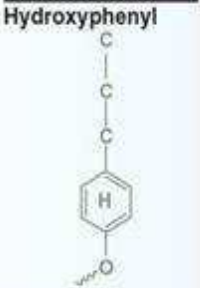
Syringyl



Gualacyl



Hydroxyphenyl



Dependiendo de la fuente y del método de aislamiento los pesos moleculares de la lignina que se reportaron van de 78.400 (en picea) a 8.300 (en Miscanthus) g mol⁻¹.

Figura I 5. Constituyentes de la biomasa de un conjunto de plantas los datos de arriba hacia abajo corresponden al miscanthus (“pasto elefante”) en primer lugar; pasto varilla; rastrojo de maíz; álamo; eucalipto; y finalmente pino. (Tomado de Ragauskas et al. (2014)).

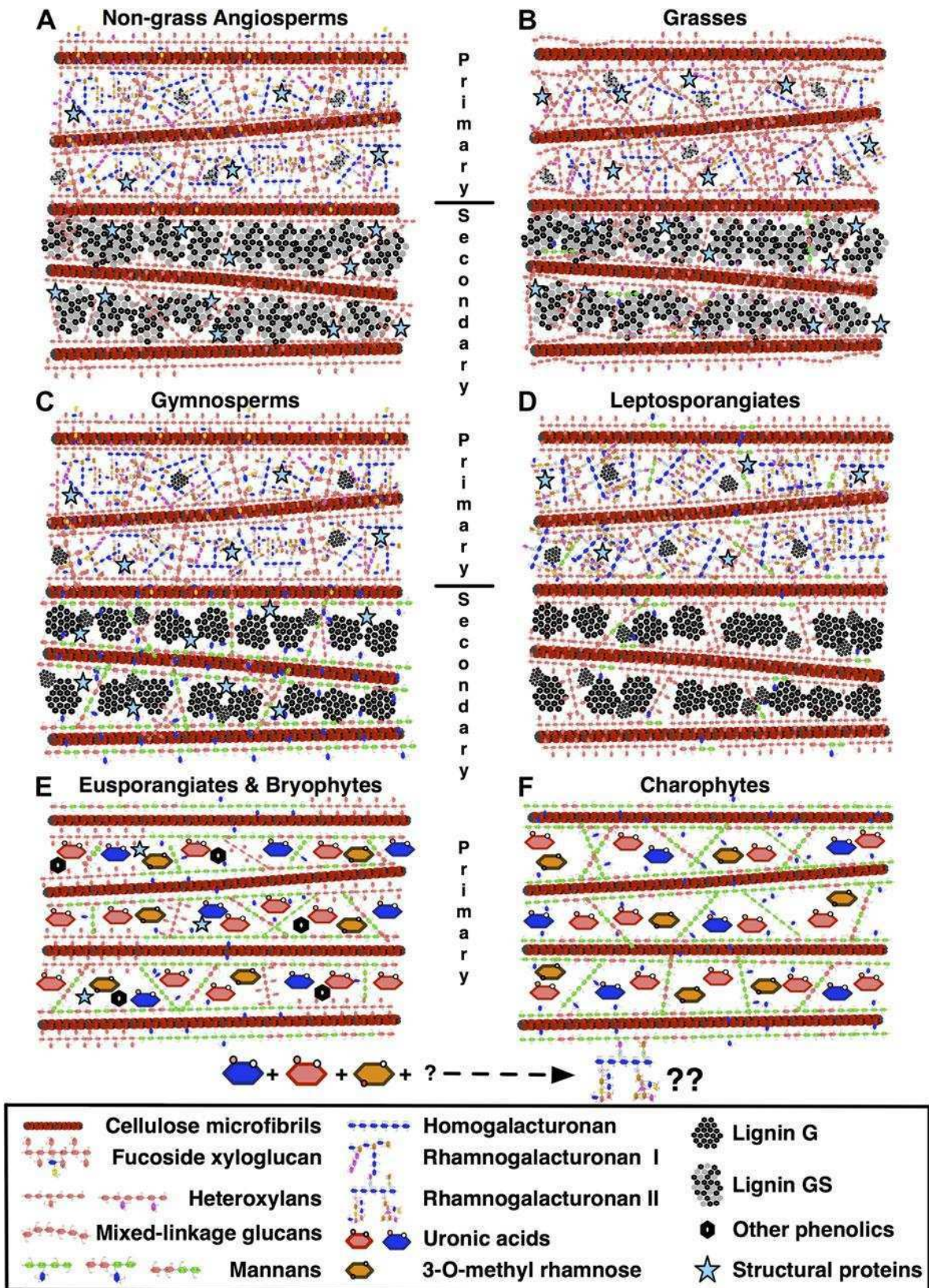


Figura I 6: Representación 2D simplificada de la composición de las paredes celulares en los diferentes grupos del Reino Plantae. Todos los grupos poseen microfibrillas de celulosa. **A: Angiospermas no Gramíneas** Tienen gran cantidad de hemicelulosas (xiloglucano XG.

heteroxilanos, mananos) y proteínas estructurales. Las paredes primarias tienen grandes cantidades de pectina (homogalacturanos (HG), ramnogalacturanos (RG) I y II) mientras que la pared secundaria tiene altas concentraciones de lignina con unidades guayacilo (G) y siringilo (S). **B:** en las **Gramíneas**, XGs, HGs y RGs se encuentran en menor cantidad y tienen una mayor cantidad de β -glucanos con enlaces mixtos. **C: Gimnospermas:** muy similar a las angiospermas no gramíneas, excepto porque tienen mayor concentración de glucomananos y porque su lignina se compone primariamente de unidades guayacilo. **D: Leptosporangiados** Tienen bajas cantidades de XGs, HGs y RGs pero gran cantidad de xilanos, mananos, ácidos urónicos, 3-O-metilramnosa y ligninas. En **Eusporangiados, Briofitas y Carofitas (EF)** las paredes celulares no se diferencian claramente entre primarias y secundarias. **Eusporangiados y Briofitas (E):** las paredes celulares tiene una composición similar a la de leptosporangiados salvo que carecen de xilanos y lignina. En lugar de lignina están presentes compuestos fenólicos como lignanos. Sólo se detectaron mananos, ácidos glucurónicos, ácidos manurónicos y 3-O-metilramnosa en las paredes celulares de Carofitas (**F**) hasta el presente.
Nota: La distribución espacial, orientación, tamaño y proporción de los polímeros en el esquema no está en escala. Extraído de Sarkar et al. (2009).

Tipos de pudrición

Si bien nuevos estudios estiman necesaria la revisión de la clasificación de los tipos de pudrición como categorías cerradas e inconexas (Floudas et al., 2015) entendiendo que la gran diversidad de hongos puede mostrar un gradiente entre las categorías propuestas, dado que las tres principales especies estudiadas en este trabajo, están fuertemente sindicadas como hongos de pudrición blanca, se describirán los tipos tradicionales de pudrición.

Hongos causantes de pudrición castaña.

En estos hongos, la celulosa y hemicelulosa son totalmente degradadas mientras que la lignina permanece prácticamente intacta (Eriksson et al., 1990b; Green and Highley, 1997).

Dado el mayor interés comercial en la aplicación de hongos de pudrición blanca, se sabe poco acerca de la capacidad de descomposición de la lignina de los hongos de pudrición castaña, sin embargo, para unos pocos se ha informado la presencia de enzimas ligninolíticas (Kirk, 1975).

La pudrición castaña se caracteriza por una rápida degradación de la capa S2, pero la S3 y la capa rica en lignina de la laminilla media parecen quedar inalteradas (Eriksson et al., 1990a; Schwarze, 2007).

Debido a la descomposición preferencial de hidratos de carbono, la madera adquiere una consistencia frágil, evidenciándose grietas en cubos.

La primera manifestación de degradación de la pared celular por los hongos causantes de pudrición castaña es la pérdida de birrefringencia, efecto identificado tempranamente por Schulze en 1937.

Esto podría ser visto microscópicamente observando la muestra bajo Nícoles cruzados de manera que sólo las regiones que contienen la celulosa intacta se iluminan. Las regiones donde la celulosa se encuentra degradada aparecerá oscura. La lignina y la hemicelulosa se verán oscuras con independencia del estado de descomposición, debido a su naturaleza no birrefringente.

Sólo una pequeña proporción (alrededor del 7%) de todas las especies de Basidiomycota xilófagos cae en este grupo, que se presenta con mayor frecuencia en la madera de gimnospermas.

Sin embargo, los hongos causantes de pudrición castaña son esenciales en su rol de recicladores de biomasa en los bosques de coníferas y constituyen la causa más importante del biodeterioro de las estructuras de madera hechas por el hombre (Eriksson et al., 2012).

La pobre batería enzimática ligninolítica de los hongos de pudrición castaña da cuenta de su dificultad para atacar a la lignina, dificultando asimismo el acceso de las enzimas celulolíticas a la celulosa.

El análisis de la lignina presente en la madera que ha sufrido pudrición castaña ha demostrado que ésta se encuentra oxidada parcialmente, a través de la demetilación de los anillos aromáticos, lo que aumenta el contenido de hidroxilos fenólicos, y la introducción de nuevos grupos carbonilo y carboxilo. Sin embargo, la lignina residual todavía es polimérica, y la mayor parte parece permanecer *in situ*. Trabajos recientes basados en espectroscopia de resonancia magnética nuclear de muestras de madera disueltas han aclarado un poco el panorama, al revelar que muchos de los vínculos intermonomero de lignina en realidad desaparecen durante la podredumbre castaña (Yelle et al., 2008). Estos resultados sugieren que la lignina puede ser despolimerizada transitoriamente, lo que podría facilitar el acceso de las hidrolasas de polisacáridos.

Análisis filogenéticos recientes basados en las secuencias de ARN ribosomal sugieren que los hongos causantes de pudrición castaña evolucionaron repetidamente a partir de hongos de pudrición blanca, muy probablemente por la pérdida selectiva de algunos mecanismos de biodegradación (Hatakka and Hammel, 2011a). Los cambios químicos que tienen lugar en la lignina y la celulosa durante este tipo de biodeterioro, en combinación con la aparente falta de enzimas ligninolíticas o un complejo celulolítico completo, sugiere la posible intervención de oxidantes pequeños en el proceso de degradación. El más conocido y más probable mecanismo es el de las reacciones tipo Fenton, es un proceso de oxidación en el cual se producen radicales altamente reactivos del hidroxilo (OH). El radical de hidroxilo tiene una alta capacidad oxidativa (2.80 V) y puede romper fácilmente enlaces de moléculas. Esencialmente todos los hongos necesitan para realizar esta reacción extracelular mecanismos para reducir el Fe^{3+} extracelular a Fe^{2+} , ya que este último se auto-oxida en la mayoría de los entornos biológicos. El reactivo de Fenton es el oxidante más fuerte que puede encontrarse en agua y reacciona de manera no selectiva virtualmente con cualquier compuesto orgánico con el que

se encuentre. Abstrae hidrógenos de estructuras alifáticas tales como polisacáridos, despolimerizándolos.

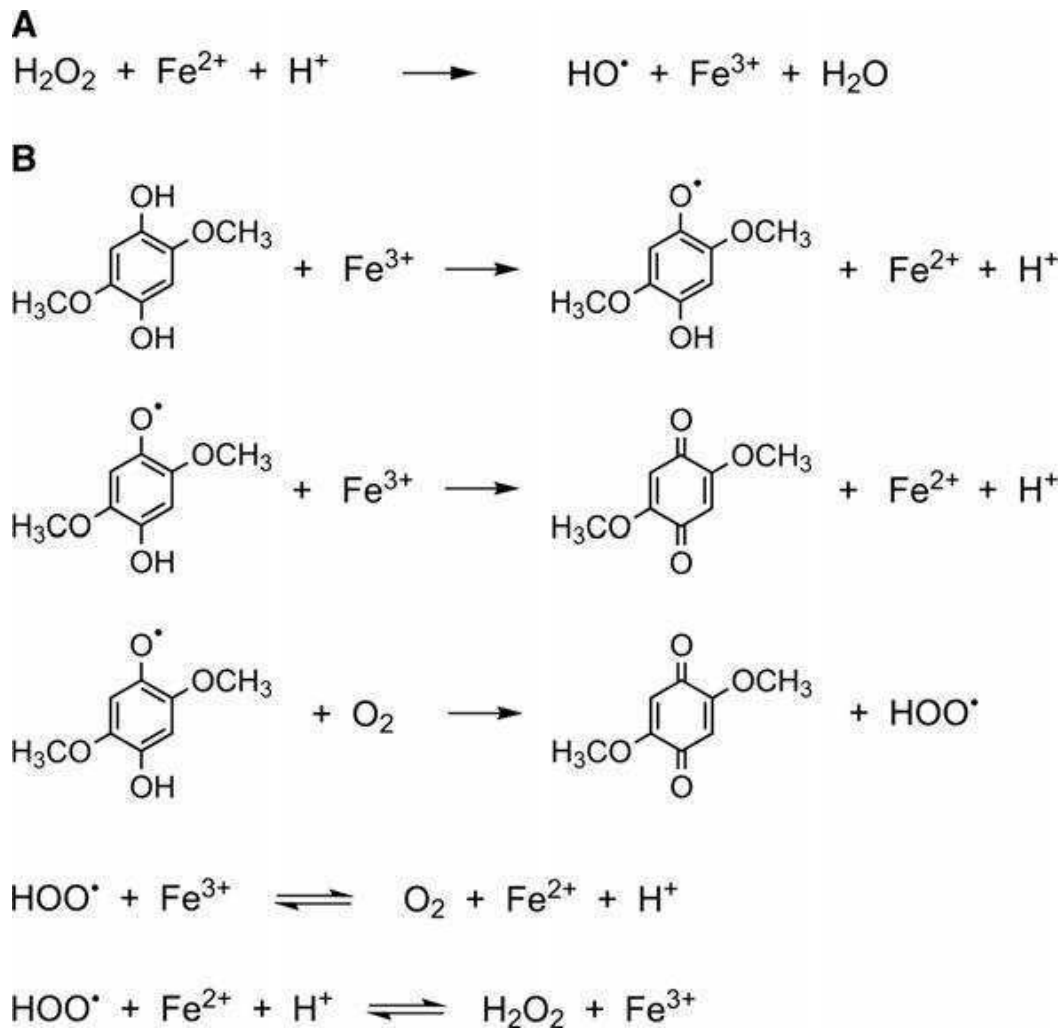
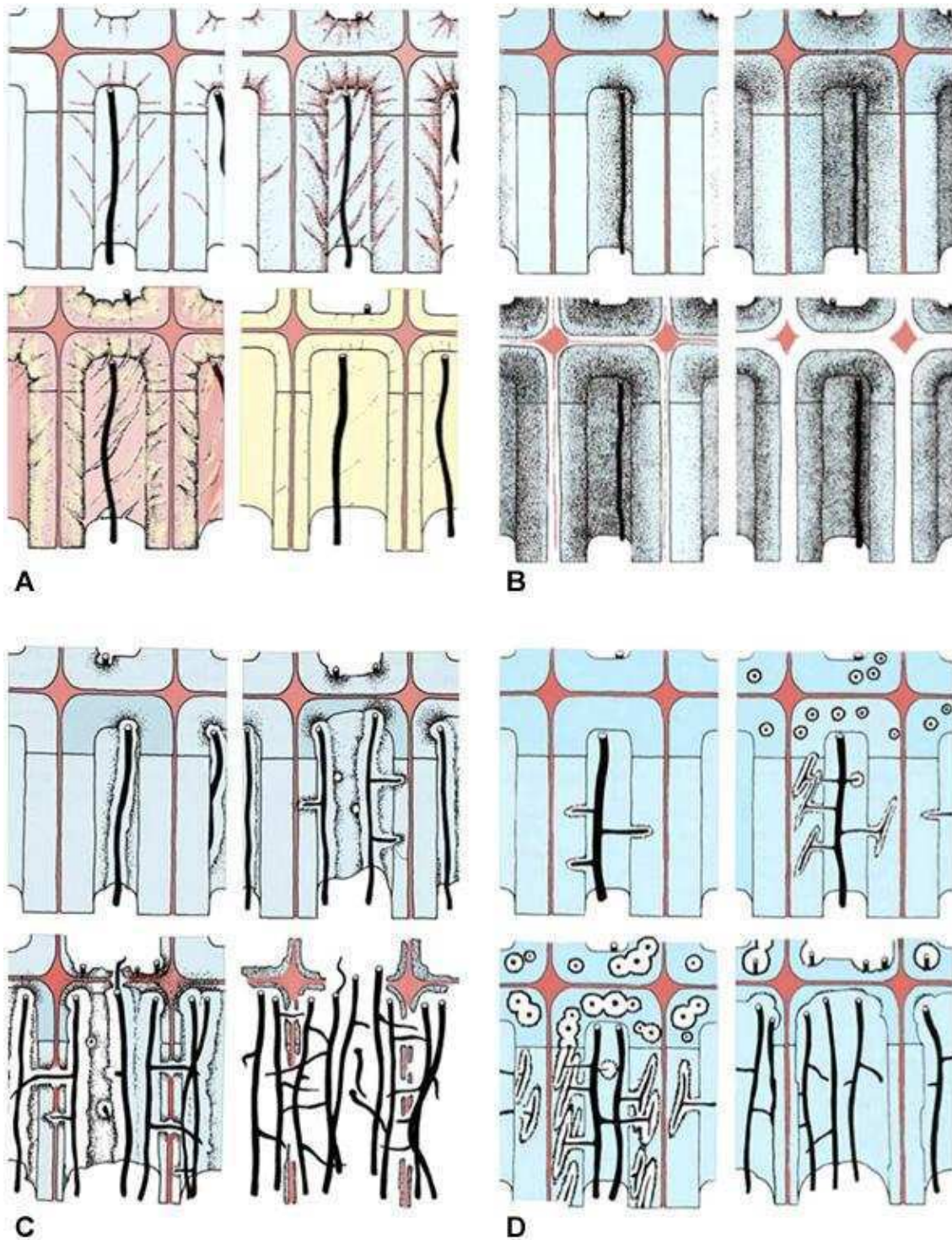


Figura. I. 7: Reacciones de radicales libres extracelulares con un rol propuesto en la pudrición castaña incipiente. A: Reacción de Fenton. B: Proceso dependiente de hidroquinonas que producen el Fe^{2+} y el H_2O_2 necesarios para las reacciones tipo Fenton. (extraído de: (Hatakka and Hammel, 2011b). El reactivo de Fenton también oxida anillos aromáticos, causando la hidroxilación del anillo y la escisión de las estructuras alifáticas adyacentes, lo que podría explicar por qué los hongos causantes de pudrición castaña presentan alguna capacidad ligninolítica. (Hammel et al., 2002).

Durante estas reacciones, se producen, una serie de nuevos derivados de oxidantes como los iones alcóxido ($\bullet\text{OR}$) y peróxido ($\bullet\text{OOR}$) sustrato, que son menos reactivos que Fenton pero capaces de causar oxidación adicional de lignocelulosa (Hamel et al., 2002).



Figuras. (I. 8 A a D) Los esquemas muestran características micro-morfológicas de los diferentes tipos de pudrición. (A) Pudrición castaña por *Fomitopsis pinicola*. En una etapa temprana de decaimiento, sustancias de bajo peso molecular son secretadas por las hifas que crecen en la S3 y difunden radialmente en toda la pared celular. En una etapa más avanzada enzimas han penetrado en toda la pared secundaria, esto conlleva a una ruptura de la hemicelulosa y la celulosa. La contracción de la madera conduce a la formación de numerosas grietas y hendiduras en la pared secundaria. Incluso en las etapas avanzadas la S3 permanece intacta y la matriz de lignina persiste. (B) delignificación selectiva por *Heterobasidion annosum*. En una etapa temprana de la degradación, sustancias de bajo peso molecular (que se muestran

como puntos) difunden al interior de la pared secundaria desde las hifas que están creciendo en el lumen. Esto inicia la degradación de la hemicelulosa y la lignina dentro de la pared secundaria, que también se extiende a la laminilla media. En etapas avanzadas la degradación preferencial de pectina y lignina resulta en la separación de las células individuales una de la otra. Inicialmente la celulosa permanece intacta. (C) Pudrición simultánea por *Fomes fomentarius*. En una primera etapa se produce la degradación en la vecindad inmediata de las abundantes hifas que crecen dentro del lumen. La pared celular es progresivamente degradada desde el lumen hacia la pared. Hifas individuales penetran en la pared celular en ángulo recto con el eje de células. La pared celular se vuelve cada vez más delgada, y numerosas perforaciones aparecen entre las células adyacentes. En una etapa más avanzada la degradación se ve obstaculizada por fuerte lignificación de la laminilla media. (D) Pudrición blanda por *Kretzschmaria deusta*. En una etapa temprana del decaimiento, las hifas difunden en la pared secundaria. Las hifas se ramifican orientándose paralelamente a las microfibrillas de celulosa en la capa S2. La degradación de la pared celular alrededor de las hifas conduce a la formación de cavidades con extremos de forma cónica. En un estado avanzado de descomposición de la pared secundaria queda casi completamente destruida, mientras que la laminilla media persiste. Tomado de (Schwarze, 2007).

Hongos causantes de pudrición blanca.

La pudrición blanca es causada principalmente por Basidiomycota y por algunos Ascomycota. La característica común de todos estos hongos es que tienen la capacidad de degradar la lignina la celulosa y las hemicelulosas. Sin embargo, las velocidades relativas de descomposición de la lignina y la celulosa pueden variar en gran medida de acuerdo con las especies de los hongos y las condiciones dentro de la madera (Fig. 1 8).

Teniendo en cuenta que las moléculas de lignina cuentan con pesos moleculares de entre 600-1000 kDa, resulta evidente que su tamaño impide la degradación intracelular, por ello, los hongos ligninolíticos han desarrollado un sistema enzimático único y no específico que funciona en el ambiente extracelular. Además, por el tipo de enlaces covalentes que presenta (aril-éter, aril-aril y carbono-carbono) y su heterogeneidad, no puede ser degradada por mecanismos típicos de hidrólisis. El mecanismo del sistema degradador de lignina está basado en la producción de radicales libres. Este mecanismo permite que estas enzimas sean catalíticamente activas sobre una gran diversidad de sustratos orgánicos.

Los hongos de pudrición blanca pueden causar dos tipos distintos de degradación, selectiva y no selectiva o simultánea. En el caso de la delignificación selectiva, la lignina se degrada antes que la celulosa o la hemicelulosa. En el inicio del ataque fúngico sustancias de bajo peso molecular difunden al interior de la pared secundaria desde las hifas que están creciendo en el lumen. Esto inicia la degradación de la hemicelulosa y la lignina dentro de la pared secundaria, que también se extiende a la laminilla media. Posteriormente, la degradación preferencial de pectina y lignina resulta en la separación de las células individuales una de la otra. Con este patrón de degradación, inicialmente la celulosa permanece intacta. En contraste con la

putrefacción castaña, las células del parénquima son a menudo preferentemente degradadas por los hongos de putrefacción blanca que causan una delignificación selectiva. Aunque la descomposición de la celulosa es una secuela común a la delignificación selectiva, hay casos extremos en los que la lignina puede ser descompuesta en un gran volumen de madera, mientras la celulosa se mantuvo prácticamente intacta (Blanchette, 1984).

En los bosques templados del sur de Chile, Phillipi en 1893 describió un tipo de madera podrida llamada "Palo podrido". Los análisis químicos determinaron que consiste en 97% de celulosa y sólo 0,9% de lignina (Agosin et al., 1990). Palo podrido es un término general asignado al decaimiento producto de delignificación selectiva o no selectiva, mientras que Palo blanco describe la madera que tiene etapas avanzadas de delignificación.

El análisis del secretoma del organismo modelo *Ceriporiopsis subvermispora* reveló un patrón de secreción secuencial de enzimas que resultaría consistente con el mecanismo de degradación selectiva asociado a esta especie (Hori et al., 2014).

En la putrefacción blanca simultánea, la descomposición tiene lugar cerca de las hifas involucradas, resultando en la erosión de la pared celular. La coalescencia de la erosión inducida por numerosas hifas resulta en un adelgazamiento general de la pared desde el lumen hacia el exterior (Blanchette and Reid, 1986; Liese, 1970). Las enzimas que se secretan son capaces de descomponer todas las sustancias de la pared celular lignificada (Liese, 1970). La descomposición de celulosa, hemicelulosa, y lignina se produce casi a la misma velocidad.

Hongos causantes de putrefacción blanda

El trabajo de Savory (1954) marcó un paso importante en la comprensión de los procesos de descomposición causada por los hongos lignocelulolíticos. Su descripción de esta forma de putrefacción causada por Ascomycota y deuteromicetes reveló un patrón anteriormente observado por otros autores desde 1937. Este tipo de putrefacción se denomina "soft rot" debido a la textura esponjosa de la superficie de madera y difiere tanto de la putrefacción castaña como de la blanca en su patrón de desarrollo (I. 8 D). Los hongos causantes de putrefacción blanda se clasifican en dos tipos (I y II). La putrefacción blanda es químicamente más parecida a la putrefacción castaña ya que la celulosa y la hemicelulosa se degradan mientras que la lignina resulta ligeramente modificada. La característica anatómicamente distintiva de la putrefacción blanda es la formación de cavidades dentro de la capa S2 de la pared secundaria (Tipo I).

Los hongos causantes de putrefacción blanda degradan poco a la madera de coníferas, sin embargo se los puede encontrar en situaciones que parecen

favorecerlos como en las tablas de madera utilizadas en las torres de enfriamiento en la industria y en maderas en contacto con el suelo. Los soft-rot, parecen ser importantes descomponedores cuando la madera está sujeta a condiciones extremas de humedad e incluso a condiciones de secado frecuente, en las cuales degradadores más agresivos como los Basidiomycota no pueden sobrevivir (Eriksson et al., 2012).

Las cavidades típicas de este tipo de pudrición se inician con la penetración fina de hifas presentes en el lumen celular. La penetración de las hifas crece a través de la capa S3 más interna de la pared celular hacia la S2 rica en celulosa en donde las ramas L o T, crecen axialmente siguiendo la orientación de las microfibrillas. Las hifas finas que exhiben un crecimiento continuo por un corto tiempo cesan el crecimiento apical. En este punto se forma la cavidad dentro de la pared celular en torno a la hifa fina, que aumenta su diámetro a medida que la cavidad se ensancha. Este proceso se repite varias veces, conduciendo a la formación de una cadena espiralada de cavidades dentro de la pared celular, orientadas en el ángulo de las microfibrillas de celulosa, cada una mostrando distintos estadios de la expansión de las cavidades. Este patrón repetitivo de inicio y cese del crecimiento apical de la hifa, resulta en la ruptura gradual de la pared secundaria (degradación tipo I). Muecas discretas de la erosión de la pared celular de hifas en crecimiento dentro del lumen, sumadas a las cavidades formadas por hifas dentro de la pared celular, también se encuentran frecuentemente en madera degradada por hongos de pudrición blanda. Estas depresiones que son indistinguibles de aquellas de los hongos de pudrición blanca han sido atribuidas al tipo II de ataque a la red celular de los hongos de pudrición blanda (Schwarze, 2007).

Enzimas involucradas en la degradación

Resultaría esperable que los organismos degradadores tengan una pauta coevolutiva con los organismos degradados. Así, la complejización de las paredes celulares de los vegetales a lo largo de su historia evolutiva podría haber jugado un rol importante en la selección de las baterías enzimáticas de los hongos que las degradan.

La mayoría de los hongos modernos se encuentra estrechamente asociados con las plantas o productos vegetales. Como descomponedores de materiales vegetales, hongos en dikarya son actores clave (Ascomycota y Basidiomycota) (Floudas et al., 2012). En contraste con dikarya, los linajes que divergieron temprano en la evolución, tales como los Chytridiomycota y algunos de los zygomycetes, utilizan diversas fuentes de nutrición (Stajich et al., 2009). Estudios filogenéticos de un grupo de 40 especies fúngicas en función de su capacidad de degradar pectina, incluyendo una amplia diversidad de grupos, indicarían que los primeros hongos evolucionaron digiriendo paredes celulares de algas que fueron ancestros de las plantas terrestres.

En comparación con los hongos, el registro fósil para el linaje de las plantas es muy rico. Vinculando la evolución de hongos con la de las Streptophyta, se puede establecer una estimación máxima de la edad de los hongos ligados nutricionalmente a ellas. El análisis filogenético de la expansión de los genes cuyos productos están involucrados en la degradación de pectina permite estimar que el ancestro común pectina-degradante entre Chytridiomycota y dikarya tiene como edad más temprana probable 750 millones de años. (Chang et al., 2015).

En cuanto a la degradación de la lignina, análisis comparativos de genomas de 31 especies sugiere que el linaje de las peroxidasas degradadoras de lignina se expandió desde el antepasado de Agaricomycota, el cual sería un hongo de pudrición blanca, y luego por contracción, se llegaría a los linajes de hongos de pudrición castaña y especies micorrizales. Los análisis de reloj molecular sugieren que el origen de la degradación de lignina podría haber coincidido con la fuerte disminución de la tasa de enterramiento de carbono orgánico en torno al final del período carbonífero. Resulta interesante que la investigación de los hongos degradadores de lignina y sus enzimas pueda generar una hipótesis alternativa a la explicación geológica habitual que hace referencia a que la alta tasa de enterramiento de carbono orgánico de los períodos Carbonífero y Pérmico se habría generado por los ambientes anóxicos de pantanos y zonas anegadas y su decrecimiento se debería a la progresiva disminución de los mismos. Como hipótesis alternativa, Floudas et al, proponen que la caída abrupta del enterramiento de carbono orgánico podría deberse a la expansión de los linajes de hongos degradadores de lignina (Floudas et al., 2012).

I 3.1- Degradación de lignina

A partir de los estudios realizados con hongos ligninolíticos en los años setenta, se comprobó que la degradación de la lignina daba lugar a productos que provenían de la ruptura oxidativa de anillos aromáticos. Por lo que se pensó que las oxigenasas extracelulares podían estar involucradas en la transformación de este polímero (Kirk and Chang, 1975). Las enzimas ligninolíticas pueden actuar separadas o en cooperación, dependiendo de si el hongo es capaz de producir una o más de ellas.

Además de estos sistemas enzimáticos, se ha considerado que la participación de compuestos de bajo peso molecular es también esencial en la degradación de la lignina. Esto se postula debido a que en su estado natural es inaccesible para enzimas tales como la lignin o manganeso peroxidasa. Entre los cofactores importantes para la transformación de la lignina se encuentran el

manganeso, el alcohol veratrílico, el oxalato y el 2-cloro-1,4-dimetoxibenceno. (ten Have et al., 1998)

Las enzimas modificadoras de la lignina (EML) participan en la biodegradación de esta biomolécula. Se incluyen en este grupo a las enzimas que catalizan reacciones oxidativas inespecíficas, como la lacasa (bencenodiol: oxígeno oxidorreductasa, EC 1.10.3.2) y peroxidases tales como la lignin peroxidasa (LiP, diarylpropanperoxidasa, EC 1.11.1.14), manganeso peroxidasa (MnP, EC 1.11.1.13), y la peroxidasa versátil (VP, EC 1.11.1.16) (Hammel and Cullen, 2008; Martínez, 2002), entre otras. También se suelen considerar a otras enzimas como miembros de la batería enzimática que les faculta a los hongos de pudrición blanca degradar la lignina. Así se puede mencionar a las enzimas generadoras de H₂O₂ como aril alcohol oxidasa (AAO, EC 1.1.3.7), glioxal oxidasa (GLOX) y piranosa-2-oxidasa (EC 1.1.3.10) (Kersten and Cullen, 2007). Recientemente, oxidases potencialmente implicadas en la degradación de la lignina y compuestos aromáticos relacionados han sido clasificadas en familias de enzimas según su secuencia proteica y sus propiedades bioquímicas, y se integraron en la base de datos FOLy (Levasseur et al., 2008). Las EML generan por reacciones oxidativas radicales libres altamente reactivos. Kirk and Farrell (1987) describieron a la degradación de la lignina por los hongos causantes de pudrición blanca como "combustión enzimática" (Kirk and Farrell, 1987).

Las EML son secretadas por los hongos de pudrición blanca en combinaciones diversas, típicamente varias isoenzimas son codificadas por múltiples genes en una única especie fúngica (Martinez et al., 2004; Pezzella et al., 2009). Se ha considerado que esta heterogeneidad de genes y de mecanismos regulatorios podría proveer a estos hongos de la flexibilidad necesaria frente a cambios microambientales (heterogeneidad bioquímica de los sustratos a degradar) así como de la posibilidad de desarrollarse en distintas especies de plantas (Kersten and Cullen, 2007). Otros autores sin embargo señalan que esta diversidad genética puede ser apenas una redundancia (Hammel and Cullen, 2008). El conocimiento actual sostiene que la lignina es despolimerizada afuera de la hifa por la combinación de distintas reacciones oxidativas, estas contemplan tanto la acción de las EML como radicales de oxígeno, y metabolitos de bajo peso molecular (Hammel and Cullen, 2008; Hatakka, 1994). La importancia de estas enzimas y de la producción de H₂O₂ en la ruptura de los enlaces de la lignina quedó evidenciada por el estudio del proteoma y transcriptoma del organismo modelo *Phanerochaete chrysosporium* (Sato et al., 2009; Wymelenberg et al., 2009)

Durante el crecimiento en medios con nutrientes limitados que mimetizan las condiciones de degradación de lignina se incrementó la expresión de LiP, MnP y varias oxidases extracelulares (Wymelenberg et al., 2009). En cultivos estacionarios sobre madera, los genes que codifican para LiPs y alcohol oxidases también mostraron alta expresión (Sato et al., 2009).

Los sucesivos transcriptomas y secretomas que se van elucidando permiten ir aproximándose a los patrones de expresión enzimática que intervienen en la degradación de la madera por parte de los hongos analizados y las diferencias que puedan existir cuando cambian los sustratos o la situación fisiológica del hongo. Estudios sobre el hongo causante de pudrición blanca *Phanerochaete carnosae* mostraron que 30 transcriptos fueron 100 veces más abundantes durante el crecimiento sobre madera que cuando se lo creció usando un cultivo líquido, entre estos transcriptos se encontraban 6 MnPs, cinco celulasas, dos hemicelulasas una LiP, una GLOX y una P 450 monooxigenasa. Curiosamente, no hubo diferencias cualitativamente importantes entre los transcriptomas resultantes del cultivo sobre maderas de angiospermas o gimnospermas, lo que sugiere que conjuntos similares de enzimas están presentes en *P. carnosae* en estas dos situaciones diferentes, aunque los niveles de expresión variaron. (MacDonald et al., 2011).

Lacasa

Esta enzima cataliza la oxidación de una gran variedad de compuestos fenólicos con la concomitante reducción de oxígeno molecular a agua. La lacasa es una de las enzimas conocidas desde antaño. Su actividad fue descrita a partir de un exudado del árbol de la laca japonés *Rhus vernicifera* (hoy *Toxicodendron vernicifluum*) por Yoshida en 1883. Citado por Makelä et al. (2009).

Las lacasas pertenecen a la gran y diversa superfamilia de las oxidasas multicobre (MCOs)(Hoegger et al., 2006). Además tipos similares de MCOs están presentes en grupos tan variados de organismos como plantas, insectos y bacterias, mostrando su amplia distribución en la naturaleza (Claus, 2004; Mayer and Staples, 2002; Sharma et al., 2007)

Las lacasas fúngicas se caracterizan por ser glicoproteínas extracelulares con un contenido de carbohidratos que puede variar en el rango del 10 al 30% del peso molecular. Esta glicosilación podría otorgarle estabilidad frente a las condiciones extracelulares en las que esta enzima trabaja. El peso molecular de estas proteínas varía entre los 60 y los 80 KDa y su punto isoeléctrico entre 3 y 6 (Baldrian, 2006; Thurston, 1994a). Las lacasas fúngicas típicas cuentan con cuatro átomos de cobre alojados en dos centros (T1, T2/T3). El sitio T1, contiene un átomo de cobre, que es el responsable del color azulado de la enzima, la eficiencia catalítica de la enzima depende del potencial redox de este cobre. El sitio T2/T3 contiene un cobre T2 y dos cobres T3)(Morozova et al., 2007; Solomon et al., 1996). Los átomos de cobre habitualmente están coordinados por residuos bien conservados 10 histidinas y una cisteína. Algunas lacasas

fúngicas “no-azules” presentan en estos sitios átomos de Zn, Fe, Mn (Palmieri et al., 1997).

Las lacasas fúngicas están involucradas en la síntesis de melanina y otros pigmentos, formación de cuerpos fructíferos, conidiación, esporulación, y la patogénesis de plantas (Mayer and Staples, 2002).

Son capaces de catalizar la oxidación no específica de compuestos fenólicos y en presencia de mediadores, también de compuestos no fenólicos. La base del sistema lacasa-mediador es el uso de compuestos de bajo peso molecular que son oxidados por la lacasa a radicales orgánicos intermedios que a su vez actúan como mediadores redox (Morozova et al., 2007b). Esta característica de actuar vía mediadores redox sería la responsable además de que la lacasa pueda oxidar a la lignina de las paredes celulares de las plantas ya que los mediadores pueden difundir lejos de las hifas. Los mediadores redox son capaces de oxidar compuestos que no son sustratos para la lacasa lo que amplía el rango de aplicaciones industriales potenciales de esta enzima.

Ejemplos de las moléculas mediadoras para lacasa son 2,2'-azinobis- (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonato (ABTS), 1-hidroxibenzotriazol (HBT), y 3-hidroxiantranilato (3-HAA), este último se encontró como producto natural en los cultivos de *Pycnoporus cinnabarinus* (Eggert et al., 1996; Morozova et al., 2007b). Algunos productos de degradación de la lignina pueden actuar también como mediadores de la lacasa en la naturaleza (Camarero et al., 2005). La expresión de lacasa en cultivos fúngicos generalmente puede ser inducida mediante la adición de compuestos aromáticos relacionados con la lignina, por ejemplo, 2,5-xilidina, guayacol, ácido ferúlico, alcohol veratrílico, y ácido siríngico (Lundell et al., 1990; Saparrat et al., 2010; Soden and Dobson, 2001). Algunas de las isoenzimas de lacasa de *Trametes versicolor* son inducibles por compuestos aromáticos, mientras que otras serían constitutivas (Rogalski et al., 1990).

El cobre es un inductor conocido de la actividad lacasa en los hongos. Dado que el sitio activo de la lacasa contiene cuatro átomos de cobre, el efecto promotor de este metal sobre la actividad enzimática puede ser explicado básicamente a nivel de proteínas. Por ejemplo, el cobre soluble desempeñaría un papel post-transcripcional mediante la activación de la apoproteína secretada (Larrondo et al., 2003).

Además, la inducción transcripcional de genes de lacasa por el cobre se ha demostrado en varios hongos de pudrición blanca, por ejemplo, *T. versicolor* (Collins and Dobson, 1997), *Pleurotus ostreatus* (Palmieri et al., 2000), y *Trametes pubescens* (Baldrian and Gabriel, 2002; Galhaup et al., 2002).

Además, elementos de respuesta a metales (MRE) han sido identificados dentro de muchas regiones promotoras de lacasa, (Faraco et al. 2003; Galhaup

et al., 2002; Mansur et al., 1998) aunque su funcionalidad no se ha demostrado todavía. Aparte de cobre, otros iones de metales pesados (Cd^{2+} , Ag^{2+} y Hg^{2+}) han sido reportados como potentes inductores de la actividad lacasa o de expresión de los transcritos de lacasa (Baldrian and Gabriel, 2002; Galhaup et al., 2002; Karahanian et al., 1998).

El amplio rango de catálisis de las lacasas las vuelve un recurso interesante con fines industriales. Las lacasas sólo requieren de oxígeno como co-sustrato, y liberan agua como único subproducto y su amplia gama de sustratos puede ampliarse aún más mediante el uso de sistemas lacasa-mediador. Las aplicaciones potenciales en áreas como el control de la contaminación ambiental, la modificación de los materiales lignocelulósicos, industria alimentaria, biosensores, la industria textil, la industria farmacéutica y en la síntesis orgánica han impulsado las investigaciones sobre esta enzima (Kudanga et al., 2011).

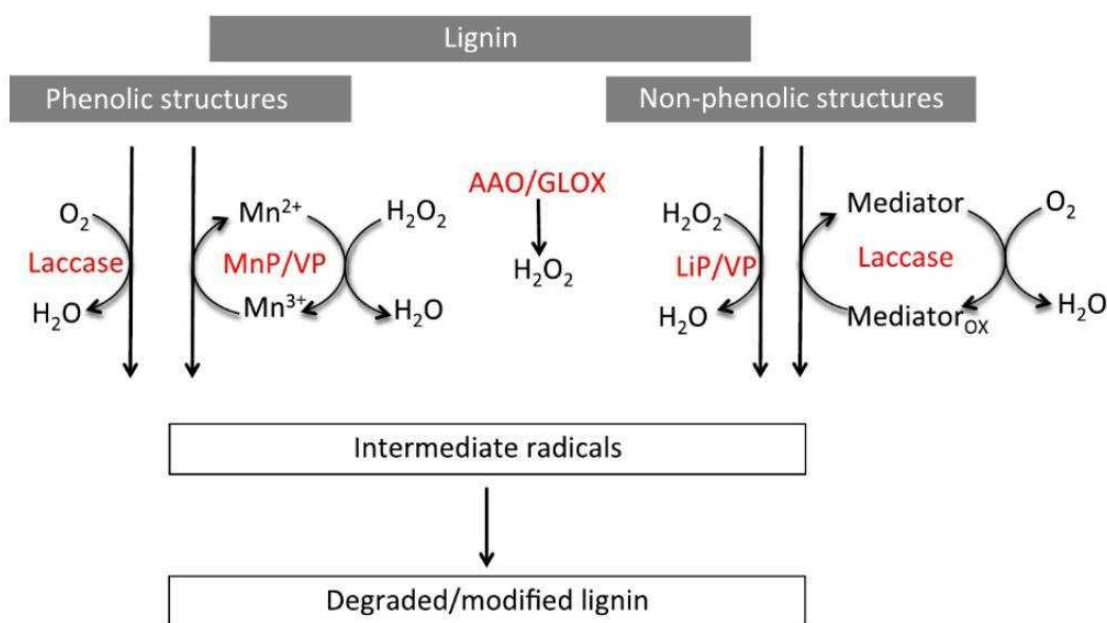


Figura 19 Conjunto de reacciones catalizadas por las enzimas degradadoras de lignina. (tomado de (Abdel-Hamid et al., 2013).

Peroxidasas modificadoras de Lignina

Grupo constituido por enzimas como la lignin peroxidasa (LiP), Manganeso peroxidasa (MnP) y peroxidasa versátil (VP). Se trata de glicoproteínas extracelulares que pertenecen a las peroxidasa clase II que

contienen hemo (Martínez, 2002). Estas peroxidases están relacionadas estructuralmente con las proteínas globulares y consisten básicamente en 11-12 α -hélices conformadas por dos dominios, llevan un grupo hemo ligado a Fe (protoporfirina IX) como su grupo prostético, coordinado por dos residuos de histidina altamente conservadas (histidinas distal y proximal) en una cavidad central entre los dos dominios (Martínez, 2002).

Los pesos moleculares de las LiP, MnP y VP se encuentran en el rango de 35-38, 38-62 y 42-45 KDa respectivamente. Las peroxidases modificadoras de lignina de los hongos causantes de pudrición blanca tienen habitualmente *pí* ácidos, entre 3 y 4 (Camarero et al., 1999; Hatakka, 2005; Mester and Field, 1998).

En general, las secuencias de aminoácidos de las peroxidases secretoras de clase II de hongos están bien conservadas. Por ejemplo, dos sitios de unión a Ca^{2+} y ocho residuos de cisteína que forman cuatro puentes disulfuro están presentes para estabilizar la estructura de las proteínas y el sitio activo (Mäkela et al., 2009).

Lignin peroxidasa

Durante el año 1983, se publicaron dos trabajos (Glenn et al., 1983; Tien and Kirk, 1983) en donde se daba cuenta de las características de una peroxidasa hallada por primera vez en *P. chrysosporium*. Esta enzima fue capaz de oxidar compuestos aromáticos no fenólicos. No se encuentra ampliamente distribuida en el grupo de los hongos de pudrición blanca. Caracterizada por su potencial redox inusualmente alto y su bajo pH óptimo, esta enzima cataliza una gran variedad de reacciones oxidativas, actuando sobre grupos fenólicos y no fenólicos. La LiP es capaz de oxidar veratril alcohol, metabolito producido durante el crecimiento secundario. El veratril alcohol oxida compuestos aromáticos. Sería un mediador de la reacción: es oxidado por LiP a veratrilaldehído y luego puede oxidar al sustrato lignina (Koduri and Tien, 1995). Se sugiere que es importante porque por su tamaño pequeño puede difundir y actuar a cierta distancia de la enzima.

En una reacción dependiente de H_2O_2 , las LiPs catalizan la oxidación de compuestos aromáticos fenólicos y no fenólicos, en una reacción inicial en la que se abstrae un electrón directamente desde el anillo aromático produciendo radicales aril catiónicos que pueden reaccionar en una variedad de caminos, incluyendo clivajes C_α - C_β y aperturas del anillo (Hammel and Cullen, 2008; Higuchi, 2004; Kirk and Farrell, 1987).

Manganeso peroxidasa

La Manganeso peroxidasa (MnP) en cambio se encuentra ampliamente distribuida entre los Basidiomycota causantes de pudrición blanca (Hatakka, 2005; Hofrichter, 2002; Lankinen et al., 2005). Cataliza específicamente la oxidación del Mn^{+2} a Mn^{+3} en presencia de H_2O_2 (Glenn et al., 1983). Los iones Mn^{3+} se estabilizan en forma de quelatos para llevar a cabo reacciones oxidativas en las que se producen radicales orgánicos de varios sustratos fenólicos, ácidos carboxílicos, y lípidos insaturados (Gold and Alic, 1993; Hammel and Cullen 2008). Los iones Mn^{3+} producidos como producto de la actividad catalítica de la MnP no son capaces de oxidar directamente estructuras no fenólicas que comprenden aproximadamente el 90% de las subunidades de la lignina en la madera (Hammel and Cullen, 2008). Estas pueden ser alcanzadas por las reacciones posteriores del Mn^{3+} , que pueden resultar, en la peroxidación lipídica, una serie de reacciones en cadena que se ha demostrado permite generar radicales peroxilo a partir de lípidos y también conducir a la escisión de lignina sintética no fenólica (Bao et al., 1994; Kapich et al., 1999a). El Mn^{3+} , forma complejos con ácidos dicarboxílicos o con α -hidroxiácidos, estos complejos pueden difundir a cierta distancia de la enzima y oxidar a su vez a la lignina. Actúa principalmente sobre sustratos fenólicos, aunque estudios recientes han demostrado también su actividad sobre sustratos no fenólicos. Este ion, puede difundir incluso a través de la pared celular intacta de la madera, cuya baja porosidad actúa como una barrera infranqueable para las moléculas de la enzima (Blanchette et al., 1997). La regulación de su producción está dada por la limitación de nitrógeno, en los organismos nitrógeno-regulados, del mismo modo que ocurre con LiP, pero también hay una regulación por manganeso.

Peroxidasa versátil

Esta enzima oxida Mn^{+2} a Mn^{+3} , como lo realiza la MnP y también oxida compuestos no fenólicos, como la LiP; lo que significa que comparte propiedades catalíticas con ambas peroxidases fúngicas, sin embargo, la VP tiene una conformación tridimensional más cercana a la LiP que a la MnP (Martinez et al, 2002).

Tanto MnP como VP tienen tres residuos conservados de aminoácidos ácidos: dos glutamatos y un aspartato, que junto con uno de los propionatos hemo están involucrados en la unión al Mn^{2+} (Gold et al., 2000; Martínez, 2002). Sin embargo, se ha demostrado que la segunda es capaz de oxidar eficientemente al Mn^{2+} en presencia de sólo dos residuos de aminoácidos ácidos lo que refleja ciertas diferencias entre estas dos enzimas (Ruiz-Dueñas et al., 2009).

La VP se caracterizó a partir de dos géneros: *Pleurotus* and *Bjerkandera*, y también se la encontró en *Panus*, *Trametes*, y *Spongipellis* (Ruiz-Dueñas and Martínez, 2009).

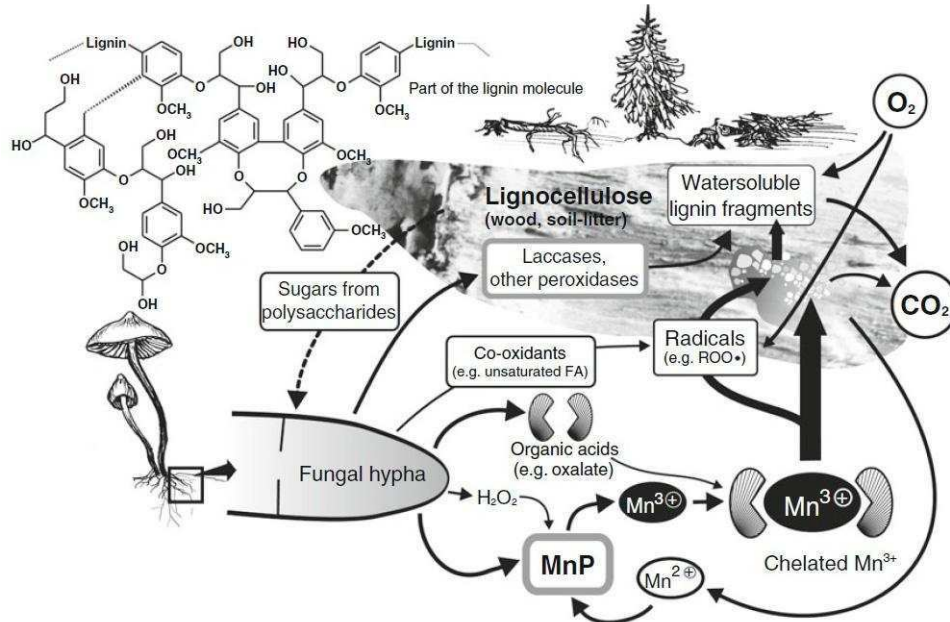


Figura I 10: Mecanismo propuesto para la degradación de la lignina basado en las reacciones mediadas por radicales libres iniciadas por la MnP peroxidasa actuando como una "bomba" de radicales. Tomado de (Hatakka and Hammel, 2011a).

Peroxidasa decolorante de tintes (DyP)

Las peroxidasas decolorantes de tintes (DyPs) fueron descubiertas en hongos y se las nombró en virtud de su capacidad de degradar un amplio espectro de colorantes. La abundancia de los análisis proteómicos ha revelado una amplia distribución de estas proteínas. Estas enzimas están muy extendidas al igual que otras peroxidasas. Curiosamente, los recientes análisis de las secuencias genómicas muestran que estas proteínas son prominentes en las bacterias, mientras que sólo un pequeño número se encuentra en hongos y eucariotas superiores. Su aparición en arqueas es aún menor. De acuerdo a los datos de Interpro database, la superfamilia DyP comprende actualmente a unos 4000 miembros. 3707 fueron encontrados en bacterias mientras que a eucariotas corresponden 117 y tan sólo 11 en archea. A pesar de que la función de la mayoría de las DyP peroxidasas continúa siendo poco clara, existe evidencia acumulada de que en ciertas variantes de bacterias estarían involucradas en la degradación de lignina. Esto sugiere que estas enzimas

ligninolíticas son la contraparte bacteriana de las peroxidasas degradadoras de lignina presentes en los hongos (Fraaije and van Bloois, 2013).

Se trata de enzimas bifuncionales, que no sólo despliegan su actividad oxidativa sino que además portan actividad hidrolítica. Son capaces de oxidar a algunos compuestos que son pobremente degradados por las peroxidasas “clásicas” de hongos como algunos tintes, β carotenos, compuestos aromáticos azufrados, etc (Colpa et al., 2014).

Estudios realizados tras el hallazgo de esta enzima en *Irpex lacteus*, encontraron su pH óptimo entre 2 y 4, alta estabilidad térmica y tolerancia relativamente alta a concentraciones de H_2O_2 elevadas. Otra característica atractiva fue su eficiencia para oxidar antraquinona y colorantes azo, y su habilidad para oxidar compuestos aromáticos no fenólicos como el veratril alcohol. Además, se estudió su efecto durante la hidrólisis de paja de trigo. El resultado sugiere un rol sinérgico con las celulasas, lo que aumentó significativamente el recupero de azúcares fermentables de este sustrato (Salvachúa et al., 2013). Estas características tornan a esta enzima interesante tanto para la industria de pasta y papel, como para la bioremediación o la obtención de combustibles a partir de biomasa.

Se conocen otras enzimas relacionadas con la degradación de lignina, como, *celobiosa-quinona-oxidoreductasa (CBQ)* que oxida celobiosa a celobionolactona y reduce quinonas y otros radicales producidos por LiP, MnP, lacasa y protege así de la repolimerización. Existen varias enzimas capaces de producir peróxido de hidrógeno y su síntesis acompaña la síntesis de peroxidasas; entre ellas se destacan la *glucosa-oxidasa (GOD: glucosa 1-oxidasa)* que actúa específicamente sobre la glucosa mediante la incorporación de O_2 , para producir gluconolactona y H_2O_2 . La *glucosa 2-oxidasa*, a diferencia de la anterior, puede actuar sobre diversos azúcares pero con preferencia por glucosa. Las anteriores enzimas son predominantemente intracelulares. En cambio la *glioxal-oxidasa* es extracelular y oxida varios sustratos: glioxal, metilglioxal (Zhao and Janse, 1996). El glioxal es un metabolito excretado por los hongos de pudrición blanca. Los azúcares necesarios para las glucosas oxidasas pueden ser producidos por la acción de celulasas o hemicelulasas sobre los polisacáridos de la madera.

Los mediadores de bajo peso molecular son de gran importancia para el proceso de degradación de la lignina ya que por su tamaño, las enzimas ligninolíticas no pueden penetrar completamente en la madera (Evans et al., 1994).

Degradación enzimática de la celulosa

El esquema clásico de degradación de la celulosa involucra la acción conjunta y sinérgica de tres clases de enzimas.

1) Endo-1,4- β -glucanasas, (1,4- β -D-glucan 4-glucanohidrolasas) (EC 3.2.1.4), que producen una disminución en el grado de polimerización de la celulosa, por cortes al azar de la cadena glucosídica, produciendo glucosa, celobiosa (disacáridos) y celotriosa (trisacáridos). Los sustratos sobre los que actúan las endoglucanasas incluyen carboximetilcelulosa, celulosa amorfa, celooligosacáridos; no atacando en forma significativa a la celulosa cristalina, como las fibras de algodón. Estas enzimas pueden ser procesivas o no procesivas (en las enzimas procesivas la unión de la enzima a su sustrato es seguida por varios cortes consecutivos en una cadena simple de polisacárido que es abierta a través del sitio activo (Horn et al., 2006; Payne et al., 2011).

2) Exoglucanasas, producen principalmente rupturas secuenciales en la molécula de celulosa a partir de un extremo no reductor liberado y están representadas por dos grupos de enzimas: exocelobiohidrolasas o celobiohidrolasas (CBH) (1,4- β -D-glucan celobiohidrolasas) (EC 3.2.1.91) que liberan unidades de celobiosa a partir del extremo no reductor y exoglucohidrolasas (1,4- β -D-glucan glucohidrolasas) (EC 3.2.1.74) que liberan unidades de glucosa a partir del extremo no reductor liberado e incluyen también actividad de las celobiohidrolasas produciendo celobiosa por ataque en el extremo no reductor del polímero.

3) β -glucosidasas (β -D-glucósido glucohidrolasas) (EC 3.2.1.21), que hidrolizan celobiosa y otros β -1,4-oligoglucósidos de cadena corta, para formar glucosa. Siendo la glucosa el resultado final de la acción degradativa del complejo celulolítico sobre el polímero de celulosa.

Estas enzimas actúan sinérgicamente ya que las endoenzimas, generan nuevos extremos no reductores aptos para la acción de las exoenzimas, quienes liberan celobiosa que es a su vez convertida en glucosa merced a la acción de las β -glucosidasas. Es importante resaltar que los sistemas celulolíticos naturales contienen varias exo y endo celulasas que pueden mostrar preferencias por distintos tipos de celulosas (cristalinas o amorfas). Esta variabilidad podría deberse a las distintas afinidades debidas a la presencia de distintos tipos de modulos de unión a carbohidratos (CBMs) que están covalentemente unidos a los dominios catalíticos de las enzimas en cuestión (Horn et al., 2012).

Todas estas enzimas son hidrolasas, es decir enzimas que clivan uniones por adición de una molécula de agua. Teóricamente, las hidrolasas son suficientes para degradar la celulosa completamente hasta glucosa. Sin embargo, la porción cristalina de la celulosa sólo es parcialmente atacada por enzimas hidrolíticas y en la práctica su degradación es lenta e incompleta. Recientemente se descubrió una familia de enzimas oxidativas que juegan un papel importante en la degradación de polisacáridos cristalinos: clivando oxidativamente en las

regiones cristalinas, atacando los carbonos en posición C1 o C4 de la molécula de celulosa. Algunas de estas enzimas habían sido previamente clasificadas incorrectamente como endoglucanasas y asignadas a la familia GH61 de glucósido hidrolasas, basándose en que poseían una débil actividad endoglucanasa. Estas nuevas enzimas fueron llamadas monooxigenasas polisacárido-líticas (LPMOs)(Horn et al., 2012). Las LPMOs comprenden 3 familias. La primera familia contiene sólo enzimas fúngicas pertenecientes a la antigua familia de glucósido hidrolasas 61 (GH61). La segunda familia, antes conocida como módulo 33 de unión a carbohidratos (CBM33), está dominada por enzimas de origen bacteriano y viral, aunque también se han reportado en ella algunas pocas enzimas de eucariontes (incluidos hongos). La tercer familia se ha descrito recientemente y comparte importantes características con las dos familias citadas anteriormente. El único miembro caracterizado hasta el momento proviene de *Aspergillus oryzae*.

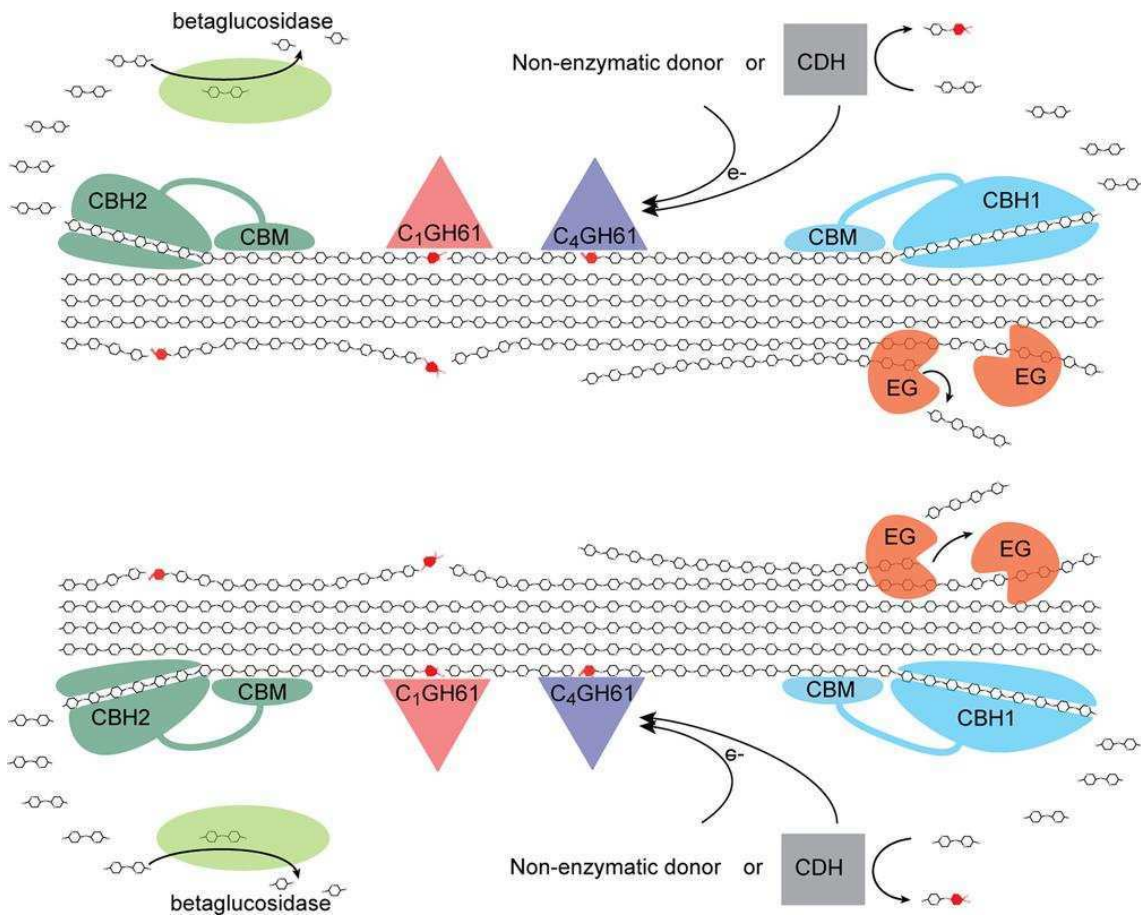


Figura I 11. Sinergismo entre diferentes enzimas en la degradación de celulosa cristalina. Las endoglucanasas (EG) clivan los enlaces internos en sitios amorfos creando nuevos extremos. Las exocelulasas o celobiohidrolasas (CBH) clivan 2 unidades de los extremos del polímero de celulosa, liberando celobiosa (disacárido). Existen 2 tipos de CBHs: las que clivan desde el extremo reductor (CBH I), o desde el extremo no reductor de la celulosa (CBH II). Las β -

glucosidasas (BG) hidrolizan oligosacáridos y producen glucosa. A su vez, la celobiosa deshidrogenasa (CDH) utiliza una molécula aceptora para oxidar celobiosa. Los electrones liberados pueden ser utilizados por polisacárido-monooxigenasas para despolimerizar celulosa cristalina a través de una eliminación reductora. Muchas enzimas están acopladas a módulos de unión a carbohidratos (CBM) sin actividad catalítica, pero que aseguran la unión del dominio catalítico al polisacárido (sacado de Horn et al., 2012).

Celobiosa deshidrogenasa (CDH) (E.C.1.1.99.18)

Esta enzima oxida celobiosa pero también celodextrinas, manodextrinas y lactosa a las correspondientes lactonas usando diferentes aceptores electrónicos incluyendo quinonas, radicales fenoxi, Fe^{3+} , Cu^{2+} , citocromo c.

Por su actividad reductasa estarían involucradas también en degradación de lignina: reduciendo quinonas y radicales fenoxilo, evitando su toxicidad y tendencia a la repolimerización. Constituye una actividad enzimática auxiliar en la degradación de la celulosa, hemicelulosa y lignina: generaría radicales hidroxilo en una reacción tipo Fenton. La enzima reduce Fe^{3+} a Fe^{2+} , o Cu^{2+} a Cu^+ por oxidación de la celobiosa. Fe^{2+} o Cu^+ reaccionan con el H_2O_2 produciendo radicales hidroxilo que pueden alterar los polímeros de la madera. El hierro está presente en la madera y el peróxido lo puede producir la CDH u otras enzimas productoras de peróxido. Otras de sus funciones sería no permitir que las uniones β -1,4-glicosídicas se vuelvan a formar luego de haber sido clivadas por la acción de las endoglucanasas o la remoción de productos finales que puedan provocar represión catabólica o inhibición de la actividad de las enzimas principales. Además, la enzima celobiosa deshidrogenasa (CDH) al parecer también juega un papel importante en la degradación oxidativa de la celulosa. Esta enzima es secretada por muchos hongos causantes de pudrición blanca, pero sólo por pocas especies causantes de pudrición castaña (Floudas et al., 2012). En estudios de expresión génica se descubrió que CDHs y AA9s son coexpresadas con frecuencia, lo que sugiere que estas enzimas podrían trabajar juntas (Wymelenberg et al., 2010). Un indicio de este sinergismo se obtuvo al demostrar que una AA9 de *Thermoascus aurantiacus* combinada con una CDH de *Humicola insolens* aumentaban en gran medida la degradación de celulosa por parte de las celulasas "clásicas". Incluso se encontró que una β -glucosidasa sólo contribuye a la degradación de celulosa en presencia de AA9 y CDH (Langston et al., 2011). Más aún, sólo la combinación de AA9 y CDH producidas en forma heteróloga llevó a la formación de productos oxidados a partir de celulosa hinchada con ácido fosfórico, mientras que su producción resultó insignificante cuando sólo una de las dos enzimas fue añadida a la reacción. Aún no está claro de qué modo la CDH colabora con las proteínas AA9, se ha propuesto que el dominio hemo de CDH serviría como donante de electrones para reducir el cobre unido a la enzima AA9 de cobre (II) a cobre (I), que luego se uniría a O_2 y, mediante un reordenamiento intramolecular, se formaría un

intermediario superoxo-Cu (II) que atacaría a la celulosa en el carbono C1 o C4 (Phillips et al., 2011). Otros autores han sugerido que se formaría un radical oxilo-Cu (II) en lugar del complejo superoxo-Cu (II) (Kim et al., 2014).

Otras enzimas también intervienen en el proceso de degradación de celulosa, entre ellas la swollenina (en *T. reesei*) sin poder hidrolítico, cuya función es expandir las fibrillas de celulosa para facilitar la entrada de las otras celulasas (Saloheimo et al., 2002).

Degradación enzimática de las hemicelulosas: Enzimas xilanolíticas

Las enzimas que degradan hemicelulosa se nombran según el sustrato sobre el que actúan; por ejemplo, mananasas degradan mananos, xilanasas degradan xilanos, etc. Dentro de las hemicelulosas, el más abundante es el xilano, por ello las xilanasas constituyen el grupo enzimático más estudiado entre las hemicelulasas. Las D-xilanasas, similares a las celulasas, se componen básicamente de dos grupos de enzimas: endo-1,4- β -D-xilanasas (EC 3.2.1.8), y 1,4- β -D-xilosidasas (EC 3.2.1.37), las cuales en muchos casos están presentes en forma de distintas isoenzimas (Tan et al., 1985; Huang et al., 1991).

La hidrólisis de estas moléculas complejas requiere la interacción de numerosas enzimas que corten la cadena principal y también las laterales. La endo-1,4- β -D-xilanasas actúa sobre la cadena de xilano al azar, disminuyendo el grado de polimerización con liberación de xilooligosacáridos, xilobiosa y xilosa. La 1,4- β -D-xilosidasa interviene luego de la endoxilanasas, actuando sobre los xilooligosacáridos (a partir de los extremos no reductores) o sobre la xilobiosa, dando como producto xilosa (Bajpai, 1997). Sin embargo un sistema xilanolítico completo requiere de las enzimas que actúan sobre sus ramificaciones α -arabinofuranosidasas (que remueven cadenas laterales de L-arabinosa), α -glucuronidasas, que liberan ácidos glucurónicos de las cadenas laterales y acetilxilano-esterasas, que remueven los grupos sustituyentes acetílicos de la xilosa, como se muestra en la Fig. I.12 (Polizeli et al., 2005).

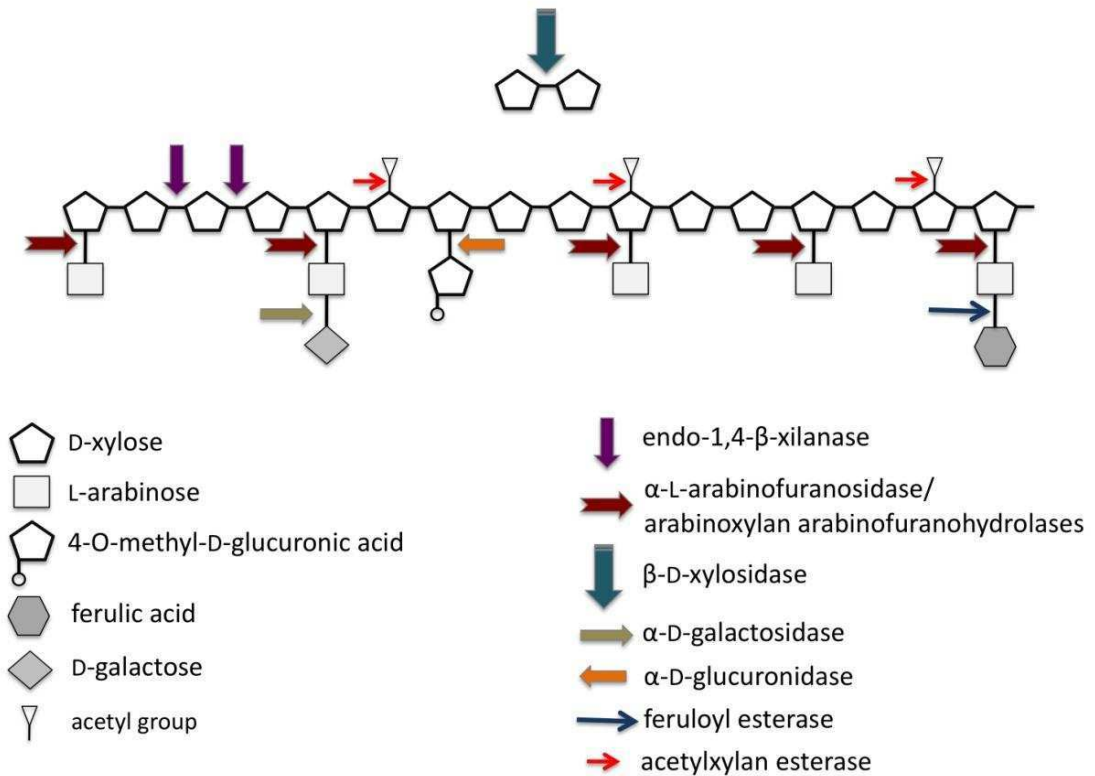


Figura I. 12. Enzimas que actúan sobre ramificaciones: *α-arabinofuranosidasas* (que remueven cadenas laterales de *α*-arabinosa), *α-glucuronidasas* (que liberan ácidos glucurónicos de las cadenas laterales), *acetil esterases* (que remueven los grupos sustituyentes acetílicos de la xilosa), *feruloylesterasas* (clivan enlaces éster entre ácidos hidroxicinámicos: ferúlico-cumárico y arabinoxilanos y ciertas pectinas).

Industria

La fabricación de pulpa y papel es actualmente uno de los sectores industriales de importancia global. Si bien va sufriendo transformaciones, la demanda de papel tiende a diversificarse y sostenerse. Mientras que la lectura de periódicos on-line podría afectarla negativamente, la aparición de nuevos consumos como cartones, cartulinas, papeles para impresión y embalajes, así como el ingreso por parte de extensos sectores de la población en distintas partes del mundo al acceso a bienes genera una demanda creciente sobre esta industria.

Así, la demanda mundial de papel, cartón y cartulina aumenta, debido, entre otros motivos, a los masivos requerimientos de la informática, el desarrollo de las nuevas formas de envases y presentación de productos y las mayores demandas sociales de bienestar (incremento en el consumo de papeles sanitarios y de uso doméstico).

Mejoras en la condición ciudadana y de conocimiento de cuestiones ambientales generan tensiones duales sobre esta industria, ya que la condición de materiales biodegradables de la celulosa y el papel la favorecen, y al mismo tiempo los consumidores cuestionan y ejercen presión en dirección a reclamarle que los procesos de su producción sean amigables con el medioambiente y con la salud de las personas.

Esta industria se caracteriza por ser: (Area, 2005)

- a- Capital intensiva: utiliza gran cantidad de equipamiento, que a su vez es muy costoso, una planta de pulpado, blanqueo y fabricación de papel ronda los 1000 millones de dólares. (con lo que la inversión de capital en esta industria es a largo plazo).
- b- Agua intensiva: En casi todas las operaciones se utilizan suspensiones de fibras o soluciones acuosas. Si bien buena parte del agua se recircula y recicla varias veces, una fábrica muy eficiente requiere 200 m³ de agua fresca por cada tonelada de papel producida. Debido a las presiones ejercidas sobre este sector en los últimos 20 años, existe una tendencia cada vez mayor a trabajar en “circuitos cerrados”.
- c- Energía intensiva: Si bien se ha logrado disminuir la dependencia de consumo de gas y petróleo gracias a la incineración de licores y de residuos de madera (la industria papelera genera el 50% de la energía que utiliza) existe un gran consumo de energía en especial en los procesos de pulpado, refinación, blanqueo y secado.
- d- Producto tipo “commodity”: se produce en grandes cantidades, las características del papel fabricado por diferentes productores son similares, y su precio depende de la habilidad de los productores para abaratar costos.

La calidad de la celulosa obtenida se puede clasificar según el tipo de materia prima utilizada para su producción y derivada principalmente de la zona geográfica de desarrollo de las plantaciones. Vinculado a las especies utilizadas como materia prima, se puede clasificar a la celulosa en dos grandes grupos: celulosa de fibra larga, producida a partir de madera de coníferas, generalmente sometida al proceso Kraft y posteriormente blanqueada. Esta celulosa representa un 45% del total de las celulosas que se comercializan. Por sus excelentes índices de resistencia, es utilizada como materia prima para la fabricación de papeles y cartones blancos para embalaje. También se usa como fibra de refuerzo en una amplia variedad de papeles. Permite así alcanzar los parámetros de resistencia deseados cuando se usa en combinación, por ejemplo, con un elevado porcentaje de fibras recicladas. La celulosa de fibra corta, proviene en cambio de especies latifoliadas y se utiliza para la fabricación de papeles de impresión y de escritura.

Desde hace muchos años existen distintas tecnologías para obtener fibras de celulosa a partir de la madera: métodos mecánicos, termo mecánicos, químicos, etc. Este trabajo se va a centrar en el pulpado Kraft, ya que es una de las tecnologías más usadas a nivel mundial, que si bien tiene un menor rendimiento con respecto al pulpado mecánico, permite una recuperación de energía y reactivos químicos muy importante. Cada una de las etapas de fabricación de pasta y papel podría aprovechar la capacidad natural de algunos hongos para eliminar distintos componentes de las fibras vegetales que deben ser removidas para fabricar papel. Las ligninasas se comprobó que tienen aplicación en diversos pasos del proceso: pulpado, blanqueo, tratamiento de efluentes, y otras particulares como destintado y remoción de extractivos, para disminuir el uso de químicos y la contaminación ambiental asociada. La industria del papel genera efluentes tóxicos y altamente coloreados, que son tratados por oxidación biológica en lagunas o sistemas de lecho fluido, reduciendo las demandas biológica y química de oxígeno, pero no el color. Se ha comprobado que el tratamiento de estos efluentes con hongos ligninolíticos no sólo produce la decoloración (hasta el 80%) sino también la detoxificación (Nilsson et al., 2005; Blanquéz et al., 2008). Los clorofenoles, componentes usualmente presentes en los efluentes industriales de la industria papelera, son altamente tóxicos aún en bajas concentraciones. *P. chrysosporium* y otros hongos causantes de pudrición blanca demostraron además, ser capaces de adsorber y degradar fenoles y clorofenoles (Mathialagan and Viraraghavan, 2009; Wu and Yu, 2007). En el pulpado mecánico se ha demostrado que estos hongos eliminan parte de la lignina, reduciendo el consumo de energía hasta un 30%, con considerables mejoras en las propiedades de resistencia (índices de tracción y de rasgado) de la pulpa (Ferraz et al., 2008). Las pulpas producidas químicamente deben ser blanqueadas ya que contienen hasta un 5% de lignina residual, la que se encuentra modificada y oscurecida por la acción de los reactivos y las condiciones de cocción. Este proceso, hasta la década de los 80, se realizó básicamente con compuestos clorados, generando un gran número de sustancias residuales organocloradas, entre otras, cloroligninas, clorofenoles, dioxinas y furanos. El desarrollo de procedimientos de blanqueo ECF (Libres de Cloro Elemental) y TCF (Totalmente Libres de Cloro), ha mitigado considerablemente la concentración de compuestos clorados adsorbibles (AOX) en las aguas residuales de las plantas de blanqueo. Pero hasta el momento, ni el oxígeno ni la combinación de oxígeno y peróxido pueden igualar la eficacia de la cloración para la eliminación de los productos derivados de la lignina, responsables del color en las pastas alcalinas. De esta forma, el bioblanqueo sigue siendo un objetivo fundamental, en cuya dirección se están invirtiendo importantes esfuerzos de investigación. El uso de hemicelulasas, principalmente xilanasas, libera la lignina reduciendo significativamente el uso de compuestos clorados. El preblanqueo con xilanasas es utilizado actualmente en varias plantas productoras de papel. Pero sin duda el método enzimático más

promisorio, desde el punto de vista de su aplicación industrial al blanqueo de pulpas, lo constituye el sistema lacasa-mediador, junto con la utilización de crudos enzimáticos (Ibarra et al., 2006a; Mai et al., 2004; Valls and Roncero, 2009). Este sistema ha servido de base para patentar dos métodos de blanqueo enzimático de pulpas: LIGNOZIM® y NOVO-NORDISK (Silva, 2006).

Durante la puesta en marcha de esta investigación, se estudiaron tres puntos particulares en los que la aplicación biotecnológica de distintas cepas fúngicas podría resultar relevante: Biopulpado, bioblanqueo y degradación del licor negro. A continuación se hace un relevamiento de los pasos más importantes en el desarrollo del pulpado Kraft y la fabricación de papel.

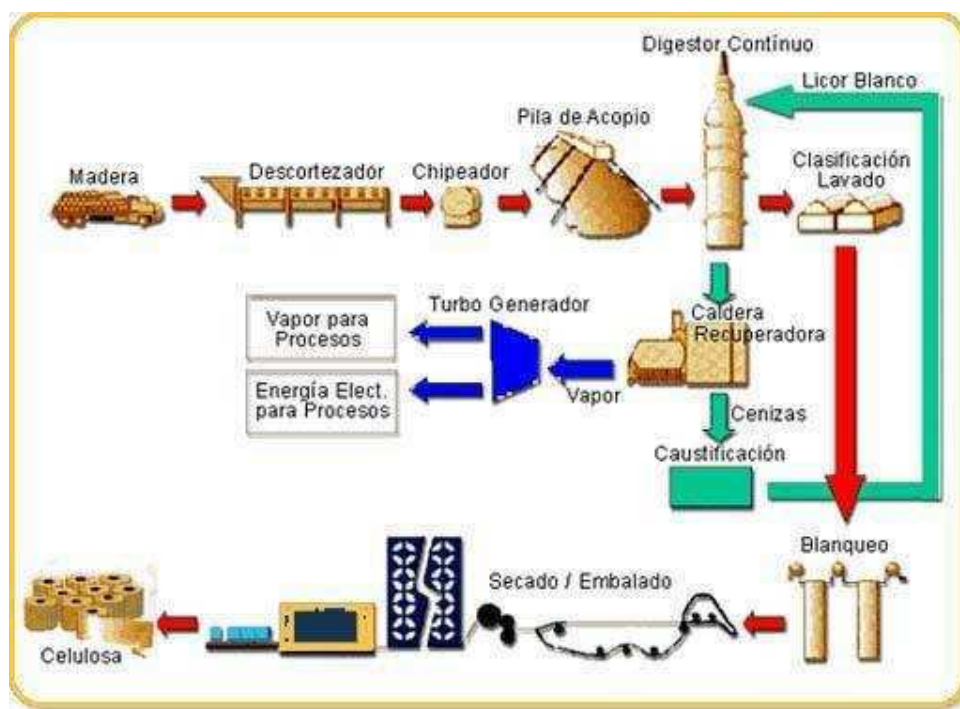


Fig. I. 13: Síntesis general del proceso de elaboración de pasta y papel

Etapa 1: Preparación de la madera

Los rollizos de madera son descortezados, y transformados en astillas (chipeados), que después son enviadas a una pila de acopio para su homogeneización. Las astillas se seleccionan por tamaño y pasan al proceso de cocción.

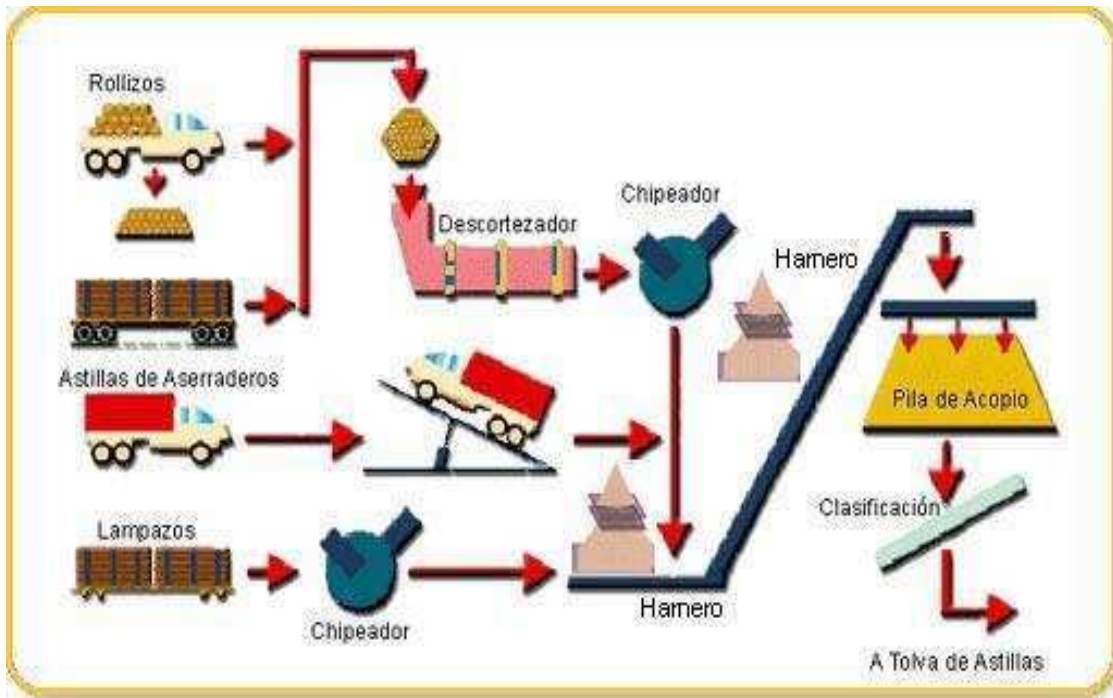


Fig. I.14: Preparación de la materia prima antes de iniciar la fabricación propiamente dicha.

Etapa 2: Cocción

La cocción puede hacerse en un digestor continuo o en digestores en batch. En los digestores se pone en contacto a los chips con el licor blanco, una solución extremadamente alcalina que contiene sulfuro de sodio (Na_2S) e hidróxido de sodio (NaOH). Su función es solubilizar a la lignina y liberar las fibras de celulosa. La cocción se produce en un rango entre los 130 y los 170°C y a una presión de 700 KPa (algo más de 5 atmósferas) como resultado se obtiene la pasta Kraft que debe ser seleccionada y blanqueada y el licor blanco original se transforma en licor negro. En las plantas modernas, el licor negro pasa a la caldera recuperadora, en donde el material orgánico es incinerado para generar vapor y producir electricidad y calor. En esta etapa se producen la liberación de compuestos azufrados malolientes que deben ser eliminados o neutralizados.

Las cenizas inorgánicas se recuperan para regenerar al licor blanco. La corteza se utiliza en las calderas para obtener vapor. Esta recuperación hace que sólo un porcentaje muy minoritario de los residuos sólidos del digestor deba ser enterrado en los vertederos (áreas de disposición controlada).

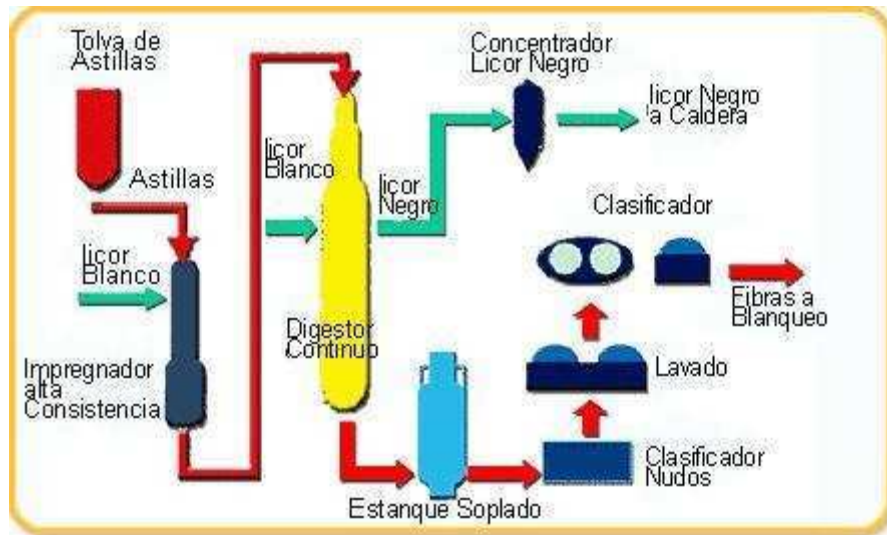


Fig.I.15: Cocción de la pasta

Etapa 3: Blanqueo

Teniendo en cuenta que los papeles blancos constituyen una parte muy importante de la demanda de consumo, es necesario ejecutar una serie de tratamientos a fin de eliminar a la lignina residual así como resinas, otras moléculas cromóforas, iones metálicos, etc. Esta etapa cuenta con una enorme diversidad de secuencias diferentes que hacen uso de distintas sustancias, como cloro elemental, dióxido de cloro, peróxido de hidrógeno, etc. De esta manera se pueden producir papeles con los atributos requeridos de blancura y brillo, los que además no decaen significativamente con el paso del tiempo (no se ponen amarillos). Cabe destacar que las sucesivas demandas de la sociedad sobre esta industria hicieron que los productos químicos más peligrosos como el cloro elemental fueran reemplazados por otros con menor impacto.

Durante el proceso de blanqueo disminuye el rendimiento ya que además de eliminarse la lignina residual, se pierden también fibras de celulosa afectadas por la secuencia de reacciones químicas implicadas. Se estima que en esta etapa se pierde entre el 5 y el 9% de la pasta Kraft para alcanzar una blancura estándar de 87-90%, según la norma ISO-2470. El residuo líquido procedente de la planta de blanqueo, denominado efluente, debería ser conducido a las plantas de tratamiento, con el objeto de purificarlo, eliminando todas las sustancias nocivas para el medio ambiente antes de devolverlo a los ríos.

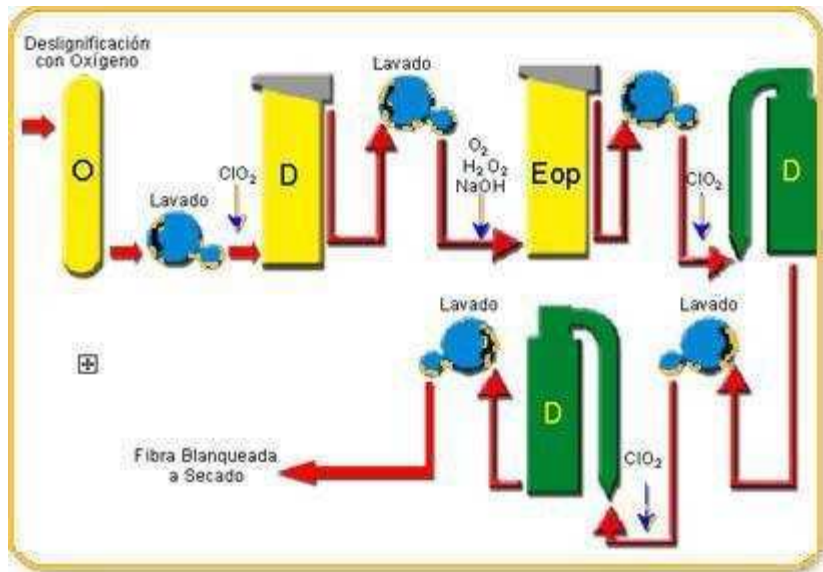


Fig. I. 16: Blanqueo de la pasta.

Etapa 4. Secado y embalado

El porcentaje de fibras contenida en la pasta a la entrada de la máquina secadora (consistencia inicial), es de aproximadamente 1 a 2%, es decir, la pasta tiene un gran contenido de agua. La pasta es distribuida uniformemente sobre el *fourdrinier* o mesa formadora de la hoja en la que llega a una consistencia del 46% luego de pasar por un sistema de secadores y rodillos. A la salida de esta área, la lámina posee una consistencia de 87-92% seco. Después se corta en forma de pliegos que se prensan y se embalan en unidades de 250 k llamadas fardos.

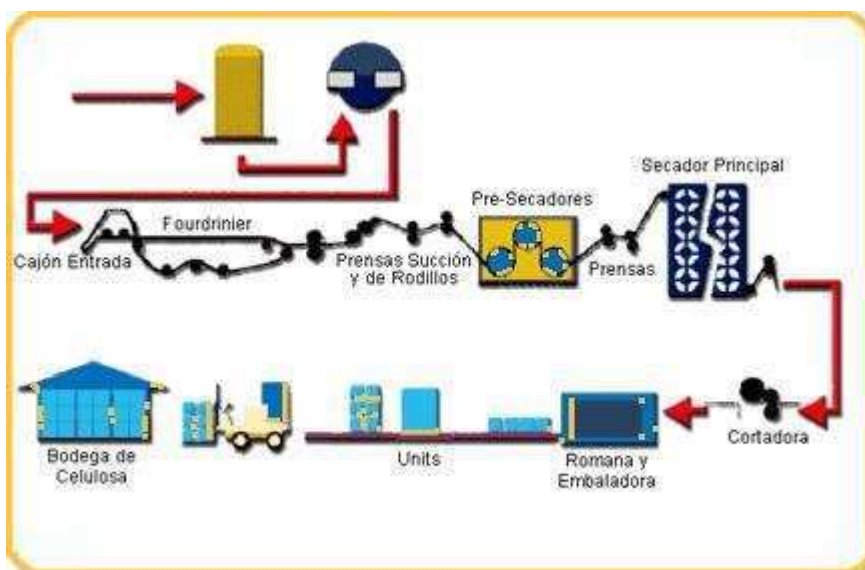


Fig. I.17: Elaboración y corte de los pliegos

Etapas 5. Recuperación de energía y reactivos

El pulpado Kraft está diseñado y programado para la recuperación y reutilización de los distintos componentes que intervienen en las 4 primeras fases. Cortezas de rollizos, aserrines y astillas subdimensionadas, son transportados a las calderas de poder para ser aprovechados como combustible y generar vapor. El licor negro proveniente del digestor, generalmente con una concentración de sólidos del 15 al 18% sigue un proceso de concentración. El licor negro entra en la caldera recuperadora con una consistencia del 75% y se quema la materia orgánica liberando energía en el proceso de combustión. Posteriormente se recuperan la fracción inorgánica y las sales minerales (cenizas). Los principales compuestos químicos de las cenizas son el sulfuro de sodio (Na_2S) y el carbonato de sodio (Na_2CO_3). Estas cenizas son disueltas en agua y se forma el denominado licor verde que es caustificado mediante varias reacciones químicas y filtradas recuperándose el licor blanco.

Si bien el tratamiento clásico es el incinerado del licor negro, actualmente esta práctica está siendo repensada ya que en él se encuentran moléculas de mayor potencial económico. Por un lado la lignina está siendo analizada para formar parte de nuevos materiales compuestos, o como proveedora de átomos para la elaboración de fibras de carbono (Gellerstedt et al., 2010; Ragauskas et al., 2014). Además desde hace bastante tiempo se cuenta con la posibilidad de extraer el tall oil, que como tal cuenta con escaso valor por encima del licor negro pero que podría servir como materia para la fabricación de biodiesel (Altıparmak et al., 2007). Con un propósito similar resulta potencialmente interesante poder extraer los azúcares de las hemicelulosas presentes en el licor negro.

Etapas 7. Control de emisiones aéreas y olor

Caldera Recuperadora: Es la principal fuente de emisiones aéreas de la Planta. Como ya se indicó, esta caldera es alimentada con licor negro concentrado. En el interior de esta caldera, que opera en torno a los $1.000\text{ }^\circ\text{C}$, se producen una serie de reacciones químicas que liberan compuestos gaseosos, algunos de los cuales deben ser eliminados o tratados con el objeto de mitigar su impacto en la calidad del aire. El principal es el Dióxido de Azufre (SO_2). Para reducir su emisión se opera con licor negro a elevada concentración, lo cual aumenta la temperatura de combustión en la caldera. En estas condiciones, el sodio en fase gaseosa reacciona con el dióxido de azufre en presencia de oxígeno, produciendo sulfato de sodio (Na_2SO_4).

La caldera recuperadora emite además material particulado (principalmente Na_2SO_4), Óxidos de Nitrógeno (NO_x) y Sulfuro de Hidrógeno (H_2S), éste último es uno de los responsables del olor característico de las plantas de celulosa Kraft.

Etapa 8: Manejo de residuos sólidos

Los desechos industriales que se depositan en las ADC (áreas de disposición controlada) de las plantas contienen tanto elementos orgánicos como inorgánicos, además de una inevitable cantidad de líquido. Las ADC son diseñadas con una base impermeable (membranas), compuesta por varias capas de distintos materiales, la cual cuenta además con una red de tuberías que colectan estos líquidos para ser procesados en la Planta de tratamiento de efluentes. El material orgánico presente en estos residuos experimenta una descomposición anaeróbica producida por microorganismos, la cual genera metano, un biogás. Por esta razón las ADC deben disponer de chimeneas para evacuar este gas y eventualmente quemarlo, que es la forma más ambientalmente segura para su eliminación.

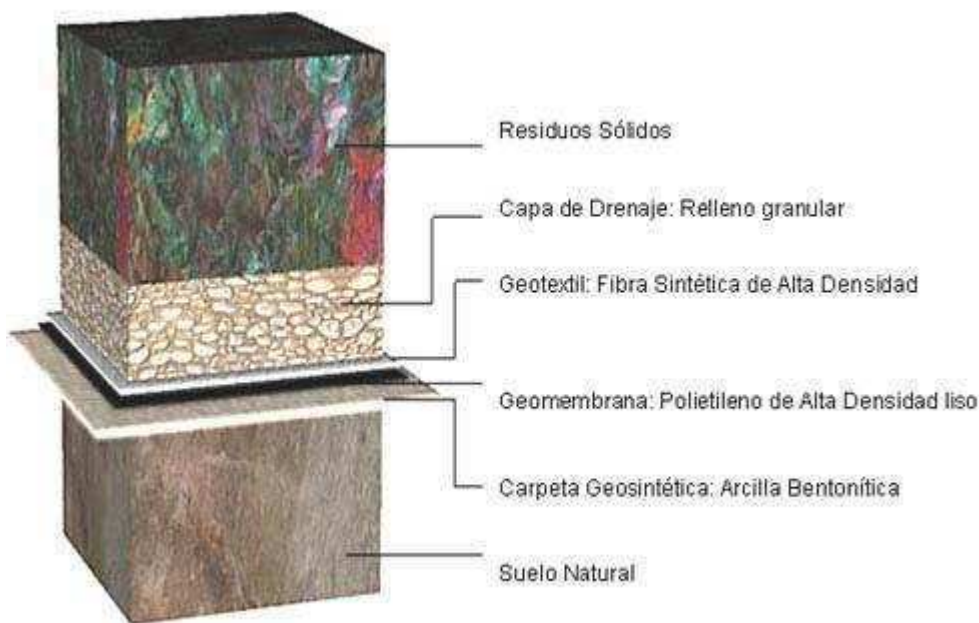


Figura I.18: Manejo de residuos sólidos.

<http://www.eis.uva.es/~macromol/curso08-09/pls/fase.htm>

Usos biotecnológicos potenciales de los hongos degradadores de la madera

A los usos ya descritos en bioblanqueo, biopulpado y tratamiento de efluentes debemos sumarle el empleo actual de enzimas lignocelulolíticas producidas por hongos causantes de pudrición blanca en el proceso de obtención de etanol de segunda generación. Los carbohidratos lignocelulósicos (celulosa y hemicelulosa) tienen mucho potencial para la obtención de químicos y combustibles. Para llegar a ellos debe “desentramarse” la estructura altamente incrustada de los componentes de la pared celular. Los hongos causantes de pudrición blanca cumplen con creces este papel en la naturaleza, siendo incluso capaces de mineralizar la lignina a dióxido de carbono y agua. El pretratamiento biológico de lignocelulosas con hongos causantes de pudrición blanca se usa hace décadas para mejorar la digestibilidad del alimento de rumiantes (Isroi et al., 2011; Salvachúa et al., 2011). El pretratamiento es un paso crucial en la conversión de biomasa lignocelulósica a azúcares fermentables y combustibles, y el pretratamiento fúngico en comparación con el térmico/ químico reduce la recalcitrancia de la biomasa por medio de microorganismos proveyendo de un sistema amigable con el medio ambiente y eficiente con respecto al uso de energía para el proceso (Wan and Li, 2012).

La perspectiva de un incremento en la obtención de biocombustibles de segunda generación utilizando a los azúcares fermentables provenientes de la biomasa lignocelulósica permite avizorar un aumento concomitante de la lignina extraída durante este proceso. Desde hace tiempo existen usos comercialmente importantes para la lignina, por ejemplo la elaboración de vainillina, este aromatizante es el más utilizado en el planeta y su producción anual alcanza las 16 Kt por año (De esa cantidad, únicamente el 1% tiene como origen las chauchas de vainilla, el 99% restante proviene del procesamiento de efluentes de la industria papelera) (Strassberger et al., 2014). Sumado a la producción de vainillina, también es posible obtener poliuretanos basados en lignina (da Silva et al., 2009), en el horizonte existen alternativas de mayor valor, como la producción de fibras de carbono. Se calcula que hasta el 50% del acero que constituye los autos podría ser reemplazado por estas fibras, lo que redundaría en un salto en la eficiencia energética al reducir enormemente el peso de los vehículos. Sin embargo, con la tecnología actualmente disponible, los valores de los precursores para la fabricación de las fibras tornan a este cambio

económicamente insostenible. El desarrollo de las tecnologías adecuadas podría permitir que las fibras de carbono se elaboren a partir de lignina, un recurso mucho menos caro. Otra industria que podría utilizar grandes volúmenes de este polímero es la del plástico y materiales compuestos derivados del plástico (Ragauskas et al., 2014). Por estos motivos conocer la biología de los organismos que descomponen los materiales lignocelulósicos se convierte en altamente relevante. A pesar de la diversidad de hongos ligninolíticos que han sido descritos en el Hemisferio Sur, existen aún escasas investigaciones acerca de los sistemas enzimáticos implicados. Un importante caudal de los estudios relacionados con hongos ligninolíticos, sus enzimas y aplicaciones biotecnológicas se han realizado sobre los organismos modelo *P. chrysosporium* y *T. versicolor* (Levin et al., 2004). En este trabajo de tesis se evaluaron 35 cepas de hongos causantes de pudrición blanca de nuestro país para su aplicación en tres etapas diferentes de la fabricación de pasta y papel.

2. Objetivos

Objetivos generales:

- ◆ Relevamiento y caracterización de cepas argentinas de hongos ligninolíticos para su aplicación en procesos biotecnológicos ligados a la industria celulósico-papelera.
- ◆ Estudiar los parámetros de cultivo que favorezcan los objetivos deseados.

Objetivos específicos:

- ◆ Seleccionar a los organismos que presenten mejores capacidades para ser potencialmente utilizados en la fabricación de pasta y papel en tres etapas distintas: biopulpado, bioblanqueo, y decoloración del licor negro.
- ◆ Identificar la presencia de enzimas ligninolíticas y establecer su posible vinculación con la eficacia de las cepas seleccionadas para su posible utilización en las distintas etapas del procesamiento del papel.
- ◆ Establecer las condiciones de cultivo necesarias para producir la degradación de la lignina en chips de madera de *Pinus taeda*.
- ◆ Estudiar las modificaciones estructurales de la madera tras el biopulpado.
- ◆ Identificar organismos capaces de intervenir en una secuencia de bioblanqueo independiente del uso de cloro.
- ◆ Optimizar las condiciones del proceso de blanqueo.
- ◆ Diseñar sistemas en los que los hongos puedan crecer en el licor negro y contribuir a su decoloración.

3. Biopulpado

Introducción

Las paredes de las células que componen la madera contienen en su mayoría celulosa, hemicelulosa y lignina. La resistencia a la tracción de fibras de madera se determina principalmente por la presencia de celulosa y hemicelulosas, mientras que la lignina media la adhesión entre las fibras.

Los llamados hongos de pudrición blanca tienen todas las enzimas necesarias para la completa degradación de los componentes de la madera. Algunas especies de hongos eliminan la lignina más eficientemente que otros componentes de la madera; lo que origina patrones selectivos de degradación pudiendo generar lo que se conoce como degradación selectiva de la misma o delignificación (Hawkes et al., 1993). Este efecto, aplicado a la industria papelera, podría disminuir la dependencia de los productos químicos en los procesos de fabricación de pulpa. El tratamiento con un agente biológico capaz de degradar selectivamente a la lignina previamente al pulpado, se conoce con el nombre de "Biopulpado".

Un ejemplo interesante de degradación de la lignina es el caso del "Palo podrido", en donde se puede encontrar una eliminación de la lignina de hasta el 90% (Dill and Kraepelin, 1986). La alta capacidad de los hongos causantes de pudrición blanca para degradar todos los componentes de la madera se basa principalmente en la actividad de los diferentes complejos de enzimas extracelulares. Estos hongos secretan enzimas hidrolíticas tales como celulasas, pectinasas y xilanasas, que típicamente son inducidas por sus sustratos.

Por otra parte, la lignina (un polímero de unidades de fenilpropano conectadas por enlaces C-C y C-O-C) puede ser oxidada y degradada por un sistema de ligninasas compuesto por al menos tres tipos de enzimas: lignin peroxidasa (LIP), manganeso peroxidasa (MnP) y lacasa. Además, varios hallazgos proporcionan información sobre moléculas de bajo peso que participan en el ataque inicial a la lignocelulosa. Reacciones tipo Fenton producen OH^\cdot , este radical es el oxidante más fuerte que se encuentra en los

hongos causantes de pudrición blanca (Forney et al., 1982; Backa et al., 1993); otras moléculas reactivas implicadas en el ataque a la lignina son los radicales peroxilo provenientes de la peroxidación lipídica(Kapich et al., 1999b). Las mismas enzimas y mecanismos no específicos que otorgan a estos hongos la capacidad para degradar la lignina les permiten también degradar una amplia gama de contaminantes. Entre ellos, una gran variedad de colorantes son sustratos de ligninasas que generan como productos sustancias incoloras. Por lo tanto, la decoloración de estas tinturas puede ser utilizada como un método de relevamiento para seleccionar cepas potencialmente promisorias. Poly R-478 y Azure B se utilizan habitualmente como herramientas útiles para detectar la actividad ligninolítica en los hongos causantes de pudrición blanca (Levin et al., 2004).

La celulosa es un polímero lineal de unidades de glucosa, que puede ser hidrolizado por la acción de endoglucanasas, celobiohidrolasas y β -glucosidasas; mientras que la hemicelulosa es un polímero ramificado heterogéneo que se caracteriza por ser un heteropolisacárido (constituido por diferentes unidades de monosacáridos), enlazados por diferentes tipos de enlaces acetálicos o glicosídicos del tipo α y β . Las hemicelulosas están formadas por una cadena base donde se repite la unidad estructural y cadenas laterales, denominadas ramificaciones. Cuando la cadena lineal del polímero se construye por monómeros de azúcar como la xilosa, en este caso, las enzimas implicadas en su degradación se nombran como xilanasas. Dado que la estructura del xilano es más compleja y variable que la de la celulosa, se requiere un conjunto más complejo de enzimas para su hidrólisis. De manera similar a lo que ocurre con las celulasas, las xilanasas pueden actuar de forma sinérgica para lograr la hidrólisis, las enzimas predominantes dentro de este sistema son β 1,4-endoxilanasas que atacan a la cadena principal del polisacárido, y β -xilosidasas, que hidrolizan xilooligosacáridos cortos a xilosa (Eriksson et al., 2012). Los hongos de pudrición blanca y sus enzimas (particularmente ligninasas y xilanasas) resultan entonces prometedores para el tratamiento de chips de madera antes de la fabricación de pulpa. Mientras que las ligninasas atacan la lignina, las xilanasas degradan a la hemicelulosa y hacen a la pulpa más permeable a los reactivos utilizados para la eliminación de la lignina residual. Este proceso de biopulpado no sólo elimina a la lignina sino también a otros extractivos presentes en la madera disminuyendo las resinas y la toxicidad de los efluentes. Cuando el tratamiento biológico es seguido por uno mecánico en la fabricación de pulpa, hay hasta un 30% de ahorro de energía, mientras que

cuando es seguido por un proceso químico de pulpado al sulfito o Kraft, el tiempo de cocción se reduce drásticamente. Las propiedades de resistencia del papel también han mejorado después del biopulpado (Bajpai, 1999).

Los estudios sobre la producción de enzimas por hongos degradadores de la madera son generalmente llevados a cabo utilizando un medio líquido de constitución química definida, en condiciones capaces de inducir la producción de una determinada enzima (Boer et al., 2006; Eichlerová et al., 2006). Sin embargo, en entornos naturales y en fermentación en estado sólido, estos hongos crecen en sustratos leñosos bajo condiciones muy diferentes de las de cultivo sumergido, consecuentemente los patrones de producción de enzimas serán esperablemente distintos.

Se requieren aún mucho trabajo de investigación para comprender acabadamente el proceso de degradación de la madera, y en particular el patrón de secreción de enzimas y otros metabolitos por los hongos, durante su ataque a los distintos componentes de la madera (Hou et al., 2004; Machuca and Ferraz, 2001).

Numerosos estudios previos se han centrado en hongos ligninolíticos tales como *P. chrysosporium*, *T. versicolor* y *C. subvermispora*. Recientemente, sin embargo, ha habido un interés creciente en el estudio de una gama más amplia de hongos causantes de pudrición blanca, no sólo desde el punto de vista de la biología comparativa, sino también con la perspectiva de encontrar mejores sistemas enzimáticos de degradación de lignina y hemicelulosa, para su uso en biopulpado y otras aplicaciones biotecnológicas (Levin et al., 2005; Trejo-Hernandez et al., 2001).

La utilidad de las distintas especies de hongos, así como la variedad de condiciones de uso vienen siendo estudiadas desde hace tiempo. Por su gran diversidad enzimática estos organismos tienen el potencial para intervenir en varias etapas del procesamiento de la madera, la pulpa y el papel.

Hongo	Material crudo	Beneficio	Referencias
<i>Physisporinus rivulosus</i>	Chips esterilizados	Degradación selectiva de la lignina, crecimiento en rango amplio de temperatura, menor consumo de energía, reducción del pitch.	(Hatakka et al., 2003)
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	Chips esterilizados	Degradación selectiva de la lignina, menor consumo de energía, reducción del pitch. Mejora el pulpado químico.	(Fischer et al., 1994; Akhtar et al., 2000)
<i>Phlebiopsis gigantea</i>	Troncos de madera	Reducción del contenido de resina de madera; Mejora el pulpado químico; consumo de energía de refinado menor; disminuye la tinción de la madera ; mejor descortezado	(Behrendt and Blanchette, 1997)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Chips y troncos sin esterilizar	Reducción del consumo de energía, reducción del pitch y aumento en la calidad de la pulpa.	(Singh and Chen, 2008)

Tabla P1. Beneficios del pretratamiento con hongos. Extraída de (Singh et al., 2010)

Estudios de evaluación técnico económica de la aplicación de hongos de pudrición blanca en operaciones aplicadas a pulpado Kraft realizados por Peñaloza Catalán en Chile para la planta Arauco I (Catalán, 2004) concluyen que la aplicación de biopulpado resultaría en ganancia incremental para la empresa y al mismo tiempo crearía unos 30 puestos laborales.

Los hongos de la Mesopotamia Argentina, en especial los de la provincia de Misiones por lo general crecen sujetos a condiciones extremadamente altas de temperatura y humedad. Por lo tanto, representan una fuente interesante para la búsqueda de enzimas termotolerantes orientada a futuras aplicaciones biotecnológicas. En esta sección del trabajo 35 cepas de hongos causantes de pudrición blanca de la Mesopotamia Argentina, fueron evaluadas por su

capacidad para decolorar Poly R-478. Los 8 cepas que mostraron la mayor velocidad de decoloración en medio Poly R-478 fueron seleccionadas para valorar su capacidad de decolorar Azure B. Posteriormente se inoculó con los cepas seleccionadas a chips de *P. taeda*, para identificar su potencial de aplicación en tratamientos de biopulpa. Varias enzimas hidrolíticas (endoglucanasa y endoxilanasas) y las enzimas oxidativas (lacasa y MnP) presentes en los extractos de los cultivos fueron estudiadas para tratar de elucidar la relación entre la batería enzimática de cada hongo y su correspondiente patrón de degradación, se determinaron también los cambios en la estructura física y composición química de la madera.

Materiales y métodos

Organismos

35 cepas de hongos de pudrición blanca de la Colección de cultivos de la Universidad de Buenos Aires (BAFC) se utilizaron en esta etapa. Los cultivos stock se mantuvieron en medio extracto de malta (1,2%), agar (2%) en tubos pico de flauta a 4°C con transferencia periódica.

Relevamiento de la capacidad ligninolítica en placa

Todas las cepas se inocularon en placas de agar (90 mm de diámetro, 20 ml medio / placa de Petri) conteniendo medio extracto de malta agarizado (MEA): extracto de malta (12,7 g l⁻¹), glucosa (10 g l⁻¹) y agar (20 g l⁻¹) suplementado con Poly R-478 (0,02%) o Azure B (50 µM). El inóculo consistió en un bloque de agar de 25 mm² proveniente de un cultivo de 7 días, en MEA.

Placas sin inocular se usaron como controles de decoloración abiótica. Las placas se incubaron a 28°C por 21-28 días. El crecimiento fúngico fue evaluado midiendo la extensión radial del micelio. Se calcularon las tasas promedio de crecimiento del micelio (cm día⁻¹). Cuando un hongo degrada un colorante se genera en torno a él un halo de degradación. Tanto el crecimiento del micelio como el del halo de degradación, se midieron semanalmente.

Experimentos de degradación de la madera

Condiciones de cultivo para los experimentos con condiciones de esterilidad.

Los experimentos de degradación de la madera se llevaron a cabo con muestras de 20 g (peso seco) de virutas (chips) de madera de 5 x 2 x 0.5 cm a las que se les agregaron 20 ml de las siguientes soluciones acuosas C1: licor de maíz fermentado (corn steep liquor) 1%; C3: corn steep liquor 3%; (M): extracto de malta 3%; MP: extracto de malta 5% más peptona 1,5%. Los Erlenmeyers conteniendo los chips fueron autoclavados y posteriormente inoculados con las distintas cepas fúngicas seleccionadas. Los inóculos se cultivaron en Erlenmeyers de 150 ml que contenían 25 ml de medio líquido (en agitación a 100 rpm) con la siguiente composición: 1% de glucosa y extracto de malta 1,3%. La inoculación se llevó a cabo utilizando 5 ml (55% de contenido de humedad final de los chips de madera) de un cultivo homogeneizado de 7 días en agitación. Los chips inoculados se incubaron durante 14 días a 28°C.

Extracción

Después del período de incubación, los chips de madera se cortaron en pequeños fragmentos de aproximadamente 2,5 x 0,4 x 0,5 cm, a continuación, se extrajeron las proteínas y azúcares solubles mediante la adición de 225 ml de agua destilada, con agitación durante 20 min, seguida por filtración y centrifugación. Los extractos crudos se utilizaron para todas las determinaciones de las actividades enzimáticas y de contenido de azúcares reductores. Todos los pasos para la extracción del crudo enzimático se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Los sobrenadantes se almacenaron a – 20°C hasta el momento de realizar las determinaciones. Los experimentos se llevaron a cabo en cultivos paralelos por triplicado.

Ensayos enzimáticos

Todas las actividades enzimáticas se ensayaron a 30°C. La actividad lacasa se determinó por oxidación de ABTS [2,2 azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)] ($\epsilon_{420} = 36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La mezcla de reacción contenía buffer acetato de sodio 0,1 M, pH 3.6 y 5 mM ABTS (Bourbonnais et al., 1995). La actividad MnP se determinó mediante oxidación de rojo fenol (0,01%). El producto de reacción se midió a 610 nm ($\epsilon_{610} = 22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La mezcla de reacción contenía buffer succinato 0,05 M pH 4,8, 0,1 mM de MnSO_4 , 0,1 mM de H_2O_2 (Glenn and Gold, 1985). Endoglucanasa y endoxilanasas se determinaron mediante la medición de los azúcares reductores producidos después de la hidrólisis de los sustratos por el método de Somogyi-Nelson (Nelson et al., 1944). Las mediciones se realizaron en 0,1 M de buffer acetato de sodio, pH 4,8, usando los siguientes sustratos: carboximetilcelulosa (CMC) 0.5% para

endoglucanasa y xilano de avena 0,2% para endoxilanasas. Se hizo una curva estándar con glucosa o xilosa para calcular las actividades enzimáticas endoglucanasa y endoxilanasas, respectivamente. La actividad enzimática se expresó en Unidades Internacionales (U), definiéndolas como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de producto en 1 min.

Análisis de la composición de la madera

Composición química

Se determinó la composición química de los chips de madera biotratados y no biotratados. Muestras de madera libres de extractivos se prepararon según el método TAPPI T204 om-88 "Extractivos en solvente de la pulpa y la madera" utilizando etanol-benceno o agua como disolventes. El material extractable por solventes de baja polaridad consiste principalmente en resinas, ácidos grasos y sus ésteres, ceras y sustancias insaponificables. Materiales solubles o extractivos en madera abarcan a los componentes que son solubles en disolventes orgánicos neutros. Estos compuestos incluyen ceras, grasas, resinas, los fitoesteres y los hidrocarburos no volátiles, hidratos de carbono de bajo peso molecular, sales y otras sustancias solubles en agua.

La lignina Klason (lignina insoluble en ácidos) se determinó de acuerdo con el método TAPPI T-222 om-88 "Lignina insoluble en ácidos en madera y pulpa". Para determinar la lignina insoluble en ácido en la madera, los hidratos de carbono se hidrolizan y se solubilizan con ácido sulfúrico (72%); la lignina insoluble en ácido se separa por filtración, se seca y se pesa. La madera contiene aproximadamente 20 a 30% de lignina, su eliminación constituye un objetivo importante en los procesos de pulpado y blanqueo. La determinación del contenido de lignina en la madera y las pulpas proporciona información para la evaluación y aplicación de las distintas alternativas para la fabricación de pulpa y para el blanqueo. El contenido de celulosa fue evaluado por el método Seifert, en esta determinación el aserrín de madera extraída se trata con una mezcla caliente de HCl, una sustancia específica de la degradación de la lignina (acetilacetona) y un solvente de la lignina (dioxano). Transcurrida una hora, el aserrín tratado se separa de los reactivos y se lava con una serie de solventes (metanol, dioxano, agua caliente, éter) hasta conseguir un producto casi blanco. El contenido de hemicelulosa se calculó por diferencia [100% - (extractivos totales + lignina + celulosa)]. Los valores de lignina y celulosa se determinaron en madera libre de extractivos.

Porosidad

El análisis del tamaño de los poros se realizó mediante porosimetría de mercurio en un Poresizer 9320.

Análisis de Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Las muestras molidas como un polvo fino, de madera de *P. taeda* tratada con *Pycnoporus sanguineus* BAFC 2126 y muestras control no tratadas, fueron analizadas por ^{13}C CP-MAS RMN. Los espectros en estado sólido ^{13}C RMN se registraron a 100.6 MHz (9.4 T) en un espectrofotómetro Bruker Avance 400. Un rotor Bruker de 7 mm de diámetro se hizo girar en aire a 5.0 kHz. En todos los experimentos los pulsos 1H y ^{13}C 908 fueron de aprox. 4 min. Los espectros CP-MAS se registraron con tiempos de contacto de 2 min y 5 seg de retraso de reciclado.

Resultados

Relevamiento de la capacidad ligninolítica en placa

En este trabajo 35 cepas de hongos causantes de pudrición blanca de la Mesopotamia Argentina se examinaron para evaluar su capacidad de decoloración de las placas con el sustrato modelo de lignina Poly R-478. La capacidad de los mismos para decolorar esta tintura, se comparó con la de *Coriolus antarcticus*, un organismo que ha probado ser muy eficiente en la degradación de colorantes (Levin et al., 2004). La capacidad de decoloración del Poly R-478 es indicativa de la actividad de las peroxidasas. Dicha actividad incluye la actividad combinada de oxidasas productoras de H_2O_2 y de las peroxidasas, y se correlaciona con la capacidad de los hongos causantes de pudrición blanca de degradar al antraceno, un hidrocarburo aromático tricíclico (Field et al., 1993). Según de Koker et al. los hongos con capacidad para decolorar el Poly R-478 podrían ser parte de diferentes grupos: hongos con una fuerte actividad LiP y MnP, hongos con fuerte actividad MnP u hongos con fuerte actividad lacasa (de Koker et al., 2000). Por otro lado, la actividad de LiP es responsable de la degradación del Azure B, por lo tanto, las placas que contienen este colorante se utilizaron para evaluar esta actividad (Archibald, 1992).

Todas las cepas fúngicas ensayadas fueron capaces de crecer en MEA complementado con Poly R-478 (Tabla P1), pero 13 de ellas no decoloraron después de 21 días de incubación.

Encontramos diferencias entre géneros, inter-específicas e intra-específicas en la relación entre el halo de crecimiento y el halo de decoloración, lo que sugiere diferencias fisiológicas. Estudios anteriores relevaron la capacidad de decolorar Poly R, en hongos que habitan en la madera, obtuvieron resultados similares (Freitag and Morrell, 1992; Levin et al., 2004).

En la mayoría de los casos, cuando se produjo decoloración, el diámetro del halo de decoloración fue menor que el diámetro de crecimiento de la colonia correspondiente. Los resultados obtenidos son consistentes con el hecho de que la decoloración estaría ligada a la producción de enzimas ligninolíticas, asociada a la fase de metabolismo secundario y presente en las partes más viejas del micelio. Resultados similares fueron obtenidos por Levin en un relevamiento previo de la capacidad de los hongos causantes de pudrición blanca argentinos para degradar diversos colorantes (Levin et al., 2004). En consonancia con resultados, también en este estudio se incluyeron *P. sanguineus* y cepas de *P. brevispora* entre los más rápidos agentes decolorantes de Poly R-478.

En las 8 cepas que decoloraron más rápidamente al Poly R-478, se evaluó su capacidad para decolorar el Azure B. Las tasas de crecimiento observadas en este medio fueron más altas que las detectadas en cultivos suplementados con Poly R-478. Todas las cepas ensayadas en este segundo paso de selección fueron capaces de decolorar el Azure B, que muestra valores similares de decoloración a los observados en medio Poly R-478.

Tabla P1

Crecimiento y decoloración en placas con medio malta agarizado suplementado con Poly R-478 (0,02%) o Azure B (50 µM).

Cepa	Orden	Familia	Crecimiento en Poly R(cm día ⁻¹)	Decoloración en Poly R(cm día ⁻¹)	Crecimiento en Azure B (cm día ⁻¹)	Decoloración en Azure B (cm día ⁻¹)
<i>Skeletocutis nivea</i> var. <i>diluta</i> (BAFC 2347)	Polyporales	Polyporaceae	0.114	0		
<i>Phlebia brevispora</i> (<i>Merulius tremellosus</i> *) (BAFC 633)	Polyporales	Meruliaceae	1.286	0.957	1.286	1.086
<i>Irpex lacteus</i> (BAFC 1171)	Polyporales	Meruliaceae	1.286	0.814	1.286	0.614
<i>Phanerochaete sordida</i> (BAFC 2122)	Polyporales	Phanerochaetaceae	1.286	0.571	1.142	Difusa
<i>Ganoderma applanatum</i> (BAFC 1168)	Polyporales	Ganodermataceae	0.450	0.111		
<i>Ganoderma applanatum</i> (BAFC 1172)	Polyporales	Ganodermataceae	0.450	0.356		
<i>Coriolus pinsitus</i> (<i>Trametes villosa</i> *) (BAFC 663)	Polyporales	Polyporeaceae	0.714	0.271		
<i>Coriolus pinsitus</i> (BAFC 667)	Polyporales	Polyporeaceae	1.186	0		
<i>Coriolus pavonius</i> (BAFC 752)	Polyporales	Polyporaceae	0.643	0.322		
<i>Coriolus pavonius</i> (BAFC 753)	Polyporales	Polyporaceae	0.500	0.414		

<i>Coriolus pavonius</i> (BAFC 760)	Polyporales	Polyporaceae	0.643	0.536		
<i>Coriolopsis floccosa</i> (<i>Funalia floccosa</i> *) (BAFC 2101)	Polyporales	Polyporaceae	1.014	0.686	0.95	0.772
<i>Fomitopsis sp.</i> (BAFC 746)	Poriales	Coriolaceae	0.536	0.273		
<i>Hexagonia papyracea</i> (<i>Hexagonia variegata</i> *) (BAFC 1173)	Polyporales	Polyporaceae	0.636	0		
<i>Lenzites sp.</i> (BAFC 669)	Poriales	Coriolaceae	0.554	0.143		
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (BAFC 2126)	Polyporales	Polyporaceae	1.286	0.943	1.143	0.643
<i>Rigidoporus ulmarius</i> (BAFC 1160)	Polyporales	Meripilaceae	0.471	0		
<i>Tyromyces caesius</i> (<i>Postia caesia</i> *) (BAFC 2283)	Polyporales	Polyporaceae	1.286	0.570		
<i>Lenzites elegans</i> (<i>Trametes elegans</i> *) (BAFC 2127)	Polyporales	Polyporaceae	1.286	0.943	1.286	0.757
<i>Trametes villosa</i> (BAFC 2755)	Polyporales	Polyporaceae	1.286	1.000	1.286	0.444
<i>Lentinus afín villosus</i> (BAFC 1743)	Poriales	Lentinaceae	1.171	0		
<i>Schizophyllum commune</i> (BAFC 583)	Agaricales	Schizophyllaceae	1.214	0		
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Agaricales	Pleurotaceae	0.714	0.553		

(BAFC 215)							
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Agaricales	Pleurotaceae	0.818	0.464			
(BAFC 0076/2002)							
<i>Polyporus tenuiculus</i>	Polyporales	Polyporaceae	0.364	0			
(<i>Favolus tenuiculus</i> *)							
(BAFC 1020)							
<i>Polyporus tenuiculus</i>	Polyporales	Polyporaceae	0.657	0			
(BAFC 1154)							
<i>Polyporus sp.</i>	Polyporales	Polyporaceae	1.286	0.182			
(BAFC 665)							
<i>Polyporus sp.</i>	Polyporales	Polyporaceae	1.071	0			
(BAFC 739)							
<i>Polyporus sp.</i>	Polyporales	Polyporaceae	0.686	0			
(BAFC 2452)							
<i>Phellinus calcitratus</i>	Hymenochaetales	Hymenochaetaceae	0.364	0			
(BAFC 2152)							
<i>Scytinostroma sp.</i>	Lachnocladiales	Lachnocladiaceae	1.286	0.167			
(BAFC 2740)							
<i>Eichleriella leveilliana</i>	Tremellales	Exidiaceae	0.179	0			
(BAFC 670)							
<i>Auricularia polytricha</i>	Auriculariales	Auriculariaceae	0.545	0			
(<i>Auricularia nigricans</i> *)							
(BAFC 2095)							
<i>Coriolus antarcticus</i>	Polyporales	Polyporaceae	1.286	1.286	1.286		0.857
(<i>Trametes versicolor</i> *)							
(BAFC 266)							
	Polyporales	Polyporaceae	1.201	0.986	1.290		0.643

Nota: Con asterisco se señala al nombre actual consultado el 1 de marzo en Index fungorum o mycobank.

Experimentos de degradación de la madera

Los hongos seleccionados se inocularon en los chips de madera de *P. taeda* para evaluar su potencial de aplicación al proceso de biopulpa. El crecimiento se evaluó visualmente, y mientras que *P. sanguineus* mostró el crecimiento más rápido y una densa capa micelial cubriendo los chips después de 7 días, sólo se observaron hifas dispersas en los chips colonizados por los otros hongos ensayados después de 2 semanas de tratamiento.

La cuantificación de enzimas extracelulares está limitada por el método de extracción, por lo tanto, se llevó a cabo un estudio preliminar para determinar el tiempo óptimo de extracción. No se encontró una actividad enzimática significativamente mayor al aumentar el tiempo de extracción de 20 min a 4 h, el tiempo de extracción utilizado en adelante (20 min) fue similar a otros reportados previamente (Heck et al., 2005; Patidar et al., 2005). Sin embargo, el procedimiento de extracción puede no haber sido el apropiado para garantizar la recuperación total de las enzimas adsorbidas sobre el sustrato de madera. Por lo tanto, los datos comunicados no son comparables con otros trabajos adonde se midieron enzimas secretadas en fermentación en estado sólido.

Las enzimas extracelulares hidrolíticas (endoglucanasa y endoxilanasas) y oxidativas (MnP y lacasa) se midieron después de 14 días (Tabla P2). En cuanto a las ligninasas, la actividad lacasa más alta (5.560 mU g^{-1}) fue producida por los cultivos de *Trametes villosa* suplementados con malta. Este hongo produce también un alto valor de MnP (217 mU g^{-1}) similar al obtenido con *P. sanguineus* (332 mU g^{-1}). Se detectó una actividad lacasa insignificante y ninguna actividad de MnP en *Lenzites elegans*, mientras que en cambio *I. lacteus* produce muy bajos títulos de MnP y ninguna actividad lacasa.

La secreción de enzimas hidrolíticas máxima se observó en *Phlebia brevispora* y *P. sanguineus*, el título más alto de endoglucanasa (332 mU g^{-1}) fue producido por *P. sanguineus* en los chips de madera suplementados con C3, mientras que *P. brevispora* produjo la actividad endoxilanasas más alta (660 mU g^{-1}) en MP.

Tabla P2

Producción de enzimas (mU g⁻¹) en chips de madera de *P. taeda*, con diferentes suplementos, después de 14 días.

Cepa	Suplementos	Lacasa	MnP	Endoglucanasa	Endoxilanasas
<i>C. antarcticus</i> (BAFC 266)	C1	0	20	275	59
	C3	273	14	64	200
	M	30	6	58	160
	MP	65	94	126	230
<i>P. brevispora</i> (BAFC 633)	C1	614	46	322	339
	C3	26	0	371	420
	M	0	0	197	440
	MP	35	0	320	660
<i>I. lacteus</i> (BAFC 1171)	C1	0	43	197	115
	C3	0	23	143	209
	M	0	0	110	144
	MP	0	40	90	208
<i>P. sanguineus</i> (BAFC 2126)	C1	72	101	305	162
	C3	0	133	466	283
	M	0	19	181	242
	MP	117	332	72	239

<i>L. elegans</i> (BAFC 2127)	C1	0	0	154	90
	C3	0	0	124	278
	M	19	0	48	193
	MP	0	0	84	253
<i>C. floccosa</i> (BAFC 2101)	C1	684	35	79	50
	C3	1540	98	25	50
	M	0	28	39	54
	MP	2140	147	34	66
<i>P. sordida</i> (BAFC2122)	C1	0	28	89	20
	C3	0	35	95	108
	M	0	98	12	41
	MP	85	112	72	63
<i>T. villosa</i> (BAFC 2755)	C1	513	35	108	63
	C3	1110	98	124	107
	M	5560	217	22	70
	MP	1356	189	159	114

Agregados: C1: licor de maíz fermentado (corn steep liquor) 1%; C3: corn steep liquor 3%; (M): extracto de malta 3%; MP: extracto de malta 5% más peptona 1,5%. Los resultados corresponden a los valores promedio con una DS menor al 10%.

Todos los valores de pérdida de peso seco se ubicaron entre el 2 y el 4,5%, después de 2 semanas de tratamiento. El efecto del biopulpado se puede observar con pérdidas muy pequeñas de peso (menores al 5%) en los procesos de pulpado con sulfito. El biopulpado puede no requerir la degradación de estructuras no fenólicas; el debilitamiento y la modificación de la lignina, más que la remoción de la misma, parecen ser suficientes para dar efecto al biopulpado. Consecuentemente, se observó que un buen biopulpado puede

producirse cuando los principales componentes de la pared celular: lignina, celulosa y hemicelulosa permanecen en gran parte intactos (Messner et al., 1998).

Tabla P3

Composición química del control (no inoculado) y chips de madera biotratados 14-días (% w/w de extractivos, lignina Klason e hidratos de carbono)

Cepa	Extractivos en solvente	Extractivos en agua	Extractivos totales	Lignina Klason	Celulosa	Hemicelulosas
<i>C. antarcticus</i>	2.2	5.7	7.9	26.1	50.4	15.6
<i>P. brevispora</i>	1.5	2.9	4.4	28.9	45.9	20.8
<i>I. lacteus</i>	2.6	2.1	4.7	26.4	38.1	30.8
<i>P. sanguineus</i>	2.2	3.3	5.5	25.9	50.9	17.7
<i>L. elegans</i>	2.1	2.5	4.6	26.0	51.0	18.4
<i>C. floccosa</i>	1.0	3.0	4.0	28.8	45.0	22.2
<i>P. sordida</i>	1.3	3.9	5.2	28.0	44.5	22.3
<i>T. villosa</i>	1.6	1.7	3.3	28.9	43.9	23.8
Control	1.7	1.1	2.8	29.0	44.4	23.8

La lignina, celulosa y hemicelulosa se determinaron sobre chips de madera libres de extractivos. Los hongos se cultivaron en chips de madera de *P. taeda* suplementados con CSL 1%. Los datos corresponden a valores promedio con una DS menor al 5%.

El tratamiento de chips de madera de *P. taeda* con cuatro de los hongos seleccionados (*I. lacteus*, *C. antarcticus*, *P. sanguineus* y *L. elegans*) condujo a una disminución del contenido de lignina Klason del orden del 3% con respecto a los chips sin tratar (Tabla P3). Estos valores se comparan favorablemente con los resultados obtenidos previamente por Guerra et al, quienes encontraron una pérdida de peso de sólo 3% después de 30 días de tratamiento de chips de madera *P. taeda* con *C. subvermispora* acompañada por una disminución del contenido de lignina de 28,2 a 26,1% (Guerra et al., 2002). En nuestro caso, entre los hongos evaluados *P. sanguineus* evidenció la mayor pérdida de lignina (3,1%) comparada con el control, por este motivo se lo seleccionó para estudios posteriores.

La fracción de extractivos, un grupo de componentes no estructurales de la madera que generalmente contiene resinas, ácidos grasos, terpenos y compuestos fenólicos, aumentó con el tratamiento fúngico. Estudios previos atribuyen este aumento a los subproductos de biodegradación (Oriaran et al., 1989). El contenido de celulosa de la madera tratada con *C. antarcticus*, *P. sanguineus* y *L. elegans* fue mayor que la del control, mostrando de este modo un patrón de delignificación selectiva. La eliminación de lignina también fue acompañada por la degradación de hemicelulosa. En los hongos causantes de pudrición blanca que delignifican selectivamente se ha observado que la hemicelulosa y la lignina son preferencialmente atacadas, especialmente en las primeras etapas del deterioro (Hawkes et al., 1993).

Sin embargo, los altos niveles de actividades enzimáticas hidrolíticas y oxidativas detectados después de 14 días de deterioro de la madera (Tabla P2) no se correlacionaron con la colonización del sustrato visible o con la magnitud de las pérdida iniciales de peso de la madera o de componentes particulares, por ejemplo *L. elegans* creció en la madera incluso dando títulos muy bajos de enzimas oxidativas, pero la disminución del contenido de contenido de lignina fue del 3%. Ferraz et al., obtuvieron resultados similares cuando analizaron la biodegradación de madera de *Eucalyptus grandis* por *C. subvermispora* y la producción de enzimas luego de 15 días de incubación. Por otro lado, la capacidad de los hongos causantes de pudrición blanca para la degradación de

madera parecería correlacionar con los niveles de las actividades oxidativas sólo después de períodos más largos de biodegradación (Ferraz et al., 2003). Aunque la lignina fue degradada cuando se detectaron actividades peroxidasa (MnP y/o LiP) en cultivos fúngicos, no se encontró una correlación entre la actividad de las peroxidases y el grado de delignificación en madera de abeto después de 2 semanas de tratamiento (Fackler et al., 2006).

Estos resultados apoyan la idea de que otros sistemas no vinculados a la producción de enzimas extracelulares oxidativas también resultarían importantes, al inicio de la pudrición blanca (ejemplo mecanismos no enzimáticos). No resulta esperable una correlación directa entre los niveles de enzimas oxidativas y la tasa de eliminación de lignina porque la eliminación de la misma expresa la etapa final de su degradación (mineralización), que comienza con los pasos de depolimerización. Sin embargo, previamente se ha observado que la cantidad de enlaces-aril éter de la lignina disminuye y la misma sufre una fragmentación extensiva en las etapas tempranas de cultivo antes de ser mineralizada por *C. subvermispora* (Ferraz et al., 2002). Estas modificaciones en la estructura de la lignina por parte de los hongos capaces de degradarla pueden ser beneficiosas para los procesos posteriores en la fabricación de pulpa. Una eliminación selectiva de la lignina aparentemente se correlaciona con beneficios en el pulpado biomecánico (Hakala et al., 2004). En el curso de esta investigación, la madera de *P. taeda* sufrió cambios estructurales notables afectándose la lignina y las hemicelulosas durante el tratamiento con *P. sanguineus*, como se revela por espectros de RMN ¹³C CP-MAS (Fig. P1). Así el grupo de señales a 151-152 ppm asignadas a C-3/C-5 en las unidades siringil (S), C-3 en 5-5' y 4-O-5 unidades y C-4 en estructuras con C α =O y residuos vinilo disminuyen marcadamente en el espectro correspondiente a las maderas tratadas. Simultáneamente, la resonancia a 144 ppm (C-4 en estructuras fenólicas)(Hawkes et al., 1993) aumentó notablemente mostrando claramente la escisión de enlaces entre unidades de lignina. La depolimerización de la lignina puede incluir también la escisión de las estructuras β -O-4 dado que una señal en torno a 60 ppm, asignada al C γ en esas estructuras, se redujo notablemente después del tratamiento biológico de la madera.

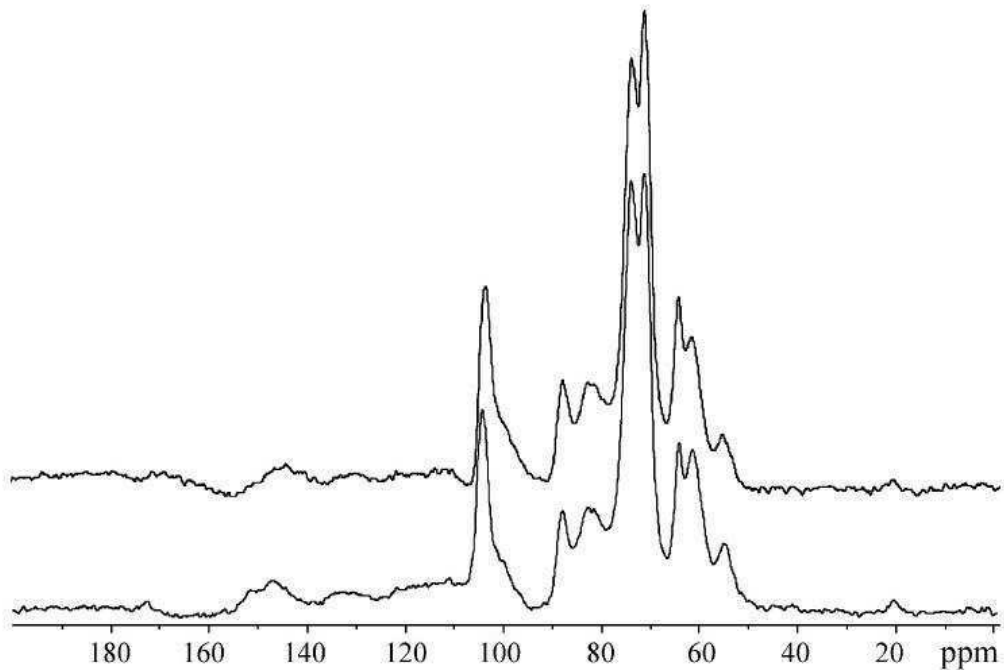


Figura 1 Resonancia magnética de madera de *P. taeda* sin tratar, espectro superior y tratada con *Pycnoporus sanguineus* 14 días de incubación, espectro inferior.

Anteriormente, análisis químicos y de RMN mostraron también la degradación de estructuras β - O-4 en la lignina de *P. taeda* durante el tratamiento biológico con *C. subvermispora* (Guerra et al., 2004). Además, la disminución de resonancia a 55,6 ppm (resonancia de carbono en los grupos OCH₃) en el espectro de la madera biotratada, en comparación con el material leñoso de partida, indicó la demetoxilación de la lignina. En el tratamiento biológico de la madera de *P. taeda* con *P. sanguineus* resultó afectada también la hemicelulosa, lo que se pone de manifiesto a partir de la disminución significativa de la resonancia en torno a los 21 ppm asignados a carbono de metilo en grupos acetilo, que pertenecen principalmente a galactoglucomanano (Capek et al., 2002). La degradación de esta última también fue confirmada por la disminución a 61,8 ppm (C-6 en hexosas de galactoglucomanano) en la madera biotratada.

La Fig. P2 muestra la distribución del tamaño de poro después de la incubación durante 14 días con *P. sanguineus*. El tamaño de poro aumentó en los chips de madera tratados en el rango de 10 y 100 μ m en comparación con los no tratados.

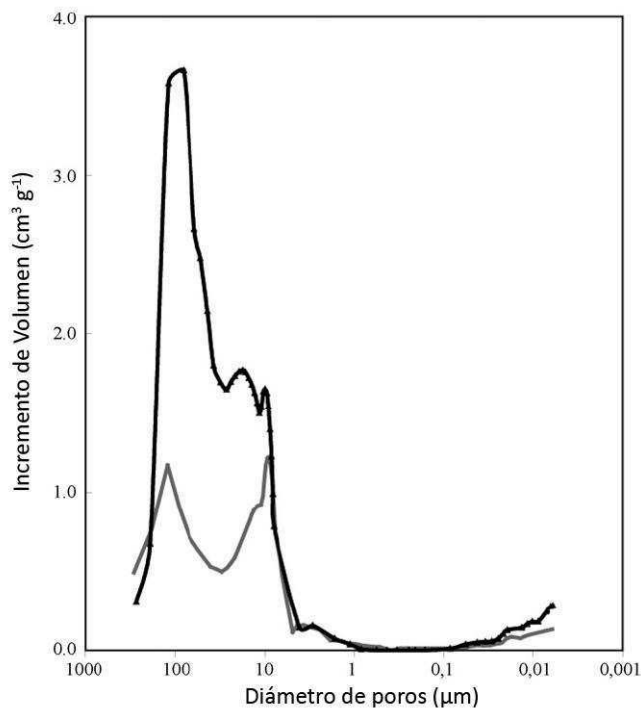


Fig. P2.
Distribución del tamaño de poros.
Línea superior, madera tratada con *P. sanguineus* durante 14 días.
Línea inferior control de madera sin tratar.

El aumento más notable se observó alrededor del tamaño de poro 100 μm , lo que revela una gran cantidad de poros de dicho tamaño, resultantes de la degradación fúngica. Los valores promedio de tamaño de poro de chips de madera tratados y no tratados fueron 0,3025 y 0,2377 μm , respectivamente.

Por otro lado, la porosidad fue del 83% para los chips de madera tratados mientras que en el control fue del 68%. El efecto resultante es una estructura más abierta que mejora la impregnación química. Un trabajo anterior mostró un aumento en la porosidad de la pared secundaria durante etapas incipientes del decaimiento (Blanchette et al., 1997). El tamaño de poro en la madera de *Pinus resinosa* también aumentó después del tratamiento con *Phlebiopsis gigantea* (Behrendt and Blanchette, 1997).

Conclusiones

Entender el mecanismo de degradación de la madera realizando un ensayo de biopulpa a escala de laboratorio podría ser útil para mejorar este procedimiento tecnológico a escala industrial. La presión sobre la industria papelera para disminuir el consumo de agua, ha promovido esquemas de recirculación de la misma, esto agrava problemas tales como la acumulación de resinas y otros compuestos que resultan dañinos para las maquinarias. La introducción de estrategias de biopulpa podría resultar en una disminución

de estas moléculas antes de ingresar al proceso de industrialización. En líneas generales, la implementación del biopulpado, podría resultar en la suma de efectos beneficiosos “rio abajo” mejorando el pulpado y disminuyendo la producción de efluentes y la cantidad de químicos necesarios para el blanqueo. La aplicación de un hongo de crecimiento rápido, puede competir además con el desarrollo de hongos imperfectos que afectan a la salud de los trabajadores de las pilas de acopio (Singh et al., 2010).

Los resultados de esta etapa del trabajo permitieron la identificación de una nueva cepa con potencial para el biopulpado de madera de *P. taeda*. *P. sanguineus* no sólo fue capaz de reducir el contenido de lignina total Klason en 11% en 14 días de tratamiento, sino que también produjo cambios estructurales notables en la lignina y la hemicelulosa durante el tratamiento, como se revela por el espectro ^{13}C CP-MAS de RMN. Del mismo modo, la porosidad de la madera tratada se incrementó 15%. Además de la modificación química causada por delignificación selectiva, cambios físicos, como el aumento del tamaño de poro, afectan directamente la penetración de productos químicos de cocción. Ambos efectos combinados aumentan la velocidad de reacción, lo que conduciría a tiempos de cocción más cortos o la posibilidad de disminuir la carga química y en consecuencia reducir el impacto ambiental del proceso (Messner et al., 1998).

4. Bioblanqueo

Estudios preliminares y selección de *Trametes trogii* para secuencia de bioblanqueo.

Introducción

La demanda de papel aumenta globalmente, por lo que las características técnicas de su producción, los niveles de consumo de energía y de reactivos, el máximo aprovechamiento de la materia prima, la vinculación de esta industria con el ambiente y la producción de desechos asociados se torna relevante. La eliminación de la lignina de la madera es el primer paso en la fabricación de pastas de papel por medios químicos, siendo la producción de pasta Kraft alcalina el proceso más común. A pesar de que la mayor parte de la lignina se eliminó durante la cocción, una porción de la lignina residual permanece en la pasta otorgándole su color marrón característico, por lo que debe ser eliminada en las reacciones oxidativas de blanqueo. En el caso del blanqueo de pastas tipo Kraft se realizan distintas secuencias en varias etapas, las cuales usualmente incluyen cloro o derivados de éste. Su utilización genera la formación y posterior emisión de sustancias organocloradas, cuya alta toxicidad y presencia en los residuos industriales líquidos conlleva potenciales daños a los ecosistemas depositarios de tales efluentes. El uso de oxidantes como el peróxido de hidrógeno, el oxígeno y el ozono, constituyen hoy en día alternativas amigables con el medio ambiente para el desarrollo de secuencias de blanqueo totalmente libres de cloro (Totally Chlorine Free: TCF). Sin embargo, la mayoría de los reactivos químicos empleados en TCF, debido a su poder de delignificación inferior, son menos eficientes que los reactivos de cloro en la consecución de grados altos y estables de blanqueo de la pulpa (Chandra and Ragauskas, 2005).

La búsqueda de tecnologías más amigables con el medioambiente sumada a la notable capacidad de algunos hongos de degradar la lignina en la naturaleza constituye a la industria celulósico-papelera como un mercado potencial para la aplicación de enzimas fúngicas. Éstas tienen aplicación en diversos pasos del proceso: pulpado, blanqueo, tratamiento de efluentes, y otras particulares como desentintado y remoción de extractivos, para disminuir el uso de químicos y la contaminación ambiental asociada (Bajpai, 2004). Mientras que las ligninasas atacan la lignina, las hemicelulosas se degradan por acción de enzimas como las xilanasas y hacen la pulpa más permeable para la eliminación de la lignina residual (Chandra and Ragauskas, 2005) reduciendo

significativamente el uso de compuestos clorados (Bourbonnais and Paice, 1990). El preblanqueo con xilanasas es utilizado actualmente en plantas productoras de papel en todo el mundo (Bajpai, 2004). Enzimas con capacidad para oxidar a la lignina, tales como las lacasas y las Mn-peroxidasas (MnPs), mostraron potencial para llevar a cabo reacciones de bioblanqueo por oxidación de la lignina y su eliminación específica. Los resultados obtenidos con MnP en el blanqueo de pulpa Kraft han sido prometedores y el tratamiento enzimático ha tenido sólo un efecto menor en la pérdida de resistencia del papel o en el rendimiento (Bourbonnais and Paice, 1990; Papinutti and Martínez, 2006).

Debido a su bajo potencial redox (0.5-0.8 V) la lacasa es capaz de atacar sólo los restos fenólicos en el polímero de lignina, siendo así menos eficaz en la delignificación y blanqueo de la pasta. El rango de sustratos de las lacasas se puede ampliar para incluir compuestos no-fenólicos en presencia de mediadores (moléculas de bajo peso molecular capaces de intervenir en reacciones redox), sintéticos tales como el ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) HBT (1-hidroxibenzotriazol) y TEMPO (radical tetrametilpiperidina-1-oxilo) o naturales presentes en los sobrenadantes de cultivo fúngico ej. HAA (ácido 3-hidroxi-antranílico) producido por *Pycnoporus cinnabarinus* (Bourbonnais et al., 1997). Igualmente, el mediador redox puede ser un compuesto natural formado durante la degradación de la lignina, preferentemente ácido 4-hidroxibenzoico, ácido cumárico, vainillina, siringaldehído, acetosiringona o diferentes hidroquinonas y especies químicas estructuralmente relacionadas (Camarero et al., 2005) (Fig. B 1). Se demostró que la lacasa requiere la presencia de un mediador para degradar de manera eficiente la lignina residual en la pasta Kraft (Bourbonnais et al., 1995). Varios artículos describen sistemas lacasa (purificada)-mediador para el blanqueo y para mejorar las propiedades de resistencia del papel (Ibarra et al., 2006a). Sin duda el método enzimático más promisorio, desde el punto de vista de su aplicación industrial al blanqueo de pulpas, lo constituye el sistema lacasa-mediador (Bourbonnais et al., 1997). El blanqueo de la pulpa con un sistema lacasa-mediador ha alcanzado el nivel de planta piloto y se espera que sea comercializado en breve (Bajpai, 2011). Sin embargo, los elevados costos asociados a la producción enzimática y purificación a gran escala, el precio de los mediadores artificiales requeridos en el proceso y su posible toxicidad, restringen al presente su uso industrial.

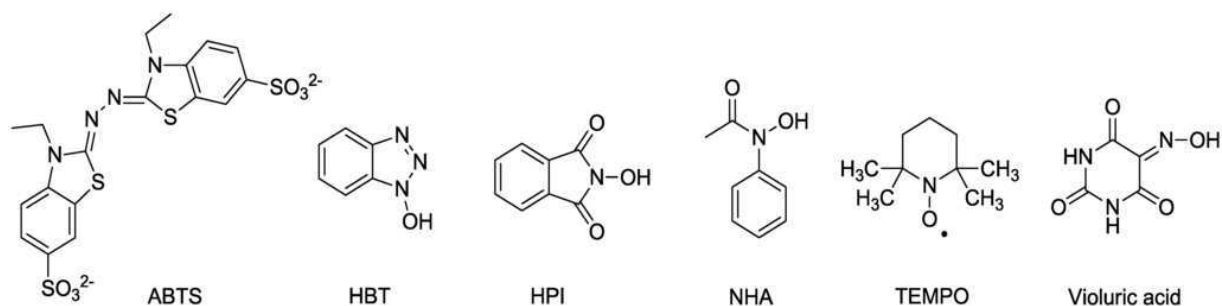


Fig. B. 1 Mediadores de actividad lacasa (Tomado (Woolridge, 2014))

T. trogii (BAFC 463), *Coriolus antarcticus* (BAFC 266) y *T. villosa* (BAFC 2755) son cepas argentinas de hongos de pudrición blanca que en trabajos anteriores mostraron ser eficientes productores de enzimas ligninolíticas (Levin et al., 2002; 2004; 2007). En particular, *T. trogii* BAFC 463, se evidenció como un eficiente degradador de la lignina en madera (Levin and Castro, 1998) resultando ser también un muy buen productor de xilanasas (Levin and Forchiassin, 1998) y ligninasas (Levin et al., 2002). Este hongo, en condiciones favorables, produce grandes cantidades de MnP y niveles de lacasa superiores a los reportados para la mayoría de los hongos de pudrición blanca acompañado de altos niveles de glioxal oxidasa (GLOX), enzima productora de peróxido de hidrógeno. La ocurrencia simultánea de altas actividades ligninolíticas y productoras de peróxido de hidrógeno, esenciales para la actividad de las peroxidasa y limitante de la velocidad de degradación de contaminantes, hace que sea un microorganismo atractivo para futuras aplicaciones biotecnológicas. Por otra parte, en contraste con el organismo modelo bien estudiado *P. chrysosporium*, esta cepa de *T. trogii* es Nitrógeno-no regulada. No requiere de una concentración limitante de nitrógeno en el medio de cultivo para producir enzimas ligninolíticas y produce altos títulos de MnP y lacasa en paralelo con una alta producción de biomasa. Esta característica del hongo lo convierte en un candidato excepcional para la fermentación a gran escala, para producir enzimas ligninolíticas a granel para biorremediación y otros usos potenciales (Levin et al., 2002).

Se realizó esta primera etapa del estudio para evaluar la viabilidad de aplicar extractos crudos de *T. trogii*, *C. antarcticus* y *T. villosa* en una secuencia de bi blanqueo de pasta Kraft de *P. taeda*.

Materiales y métodos

Organismos

T. trogii BAFC 463, *C. antarcticus* BAFC 266, *T. villosa* BAFC 2755 (Polyporaceae, Aphyllophorales, Basidiomycetes) fueron obtenidos a partir de la colección de cultivos de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (BAFC).

Medio y condiciones de cultivo

Glucosa 10 g, asparagina 4 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, H_2KPO_4 0,5 g, HK_2PO_4 0,6 g, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 1 mM, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0,09 mg, H_3BO_3 0,07 mg, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0,02 mg, $FeCl_3$ 1 mg, $ZnCl_2$ 3,5 mg, tiamina 0,1 mg, agua destilada hasta 1 L. pH inicial del medio: 6,5. Los cultivos se realizaron en Erlenmeyers de 100 ml con 20 ml de medio. Como inóculo se utilizó 1 cubo de 25 mm² de superficie de una colonia crecida en agar-extracto de malta (1,3% extracto de malta, 1% glucosa, agar 2%) durante 7 días. Se incubó a $28 \pm 1^\circ C$ en condiciones estáticas. El micelio fue cosechado a distintos días a partir del día 7, por filtración a presión reducida, la fuente de enzima fue el sobrenadante crudo de cultivo, que se obtuvo directamente de la filtración de los mismos.

Tratamiento enzimático realizado sobre la pulpa Kraft de *P. taeda*

Se tomaron alícuotas de 100 mg de pulpa Kraft industrial sin blanquear de *P. taeda* (PKSB: pulpa Kraft sin blanquear) con un valor de número Kappa inicial de 24.8. Se las lavó con agua destilada e incubó con 2.5 ml de sobrenadantes (pH final 6.5) durante 12 h a 50°C y 50 rpm. Posteriormente, la pulpa tratada con enzimas (PKBE: pulpa Kraft blanqueada enzimáticamente) se lavó tres veces con agua destilada y se secó al aire libre a temperatura ambiente (25°C).

Blanqueo

Todos los experimentos de blanqueo se llevaron a cabo en Erlenmeyers. A muestras de 100 mg de PKBE seca se les agregaron 10 ml de H_2O_2 2% y se incubó 2 h a 80°C y 50 rpm. Luego la PKBE se enjuagó 3 veces con 20 ml de agua destilada. Los sobrenadantes recuperados de este primer ciclo se colectaron para aplicarlos en condiciones idénticas a nuevas muestras de PKSB (segundo ciclo). En las muestras control, los sobrenadantes fueron reemplazados por agua destilada. También se agregó un control usando sólo el medio de cultivo libre de

enzimas. Para todos los experimentos las mediciones se hicieron con triplicados paralelos. Los valores enzimáticos corresponden a valores medios con una desviación estándar menor al 5%.

Efecto de los mediadores

El efecto de los mediadores de lacasa (1,5% p/v) se evaluó durante el tratamiento enzimático. Se ensayaron dos mediadores sintéticos [ABTS (ácido 2'2-azino-bis-[3-etilbenzotiazol-6-sulfónico]) y HBT (1 hidroxibenzotriazol)] y mediadores naturales [anisaldehído y HBA (ácido 4-hidroxibenzoico)].

Evaluación de las propiedades de la pulpa

El valor de luminancia (L^*) se midió contra un blanco estándar de referencia (óxido de titanio $L^* = 94.5$) con un espectrofotómetro esférico portable (D 65/10°). Las hojas de pulpa se hicieron filtrando en un Büchner y se usaron para medir luminancia y brightness con un colorímetro Color Touch Model ISO Technidyne.

Estimación de las actividades enzimáticas y de la concentración de H_2O_2


Todas las actividades enzimáticas se ensayaron a 30°C. La actividad lacasa se determinó por oxidación de ABTS ($\epsilon_{420} = 36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La mezcla de reacción contenía buffer acetato de sodio 0,1 M, pH 3,6 y 5 mM ABTS (Bourbonnais et al., 1995). La actividad MnP se determinó mediante oxidación de rojo fenol (0,01%). El producto de reacción se midió a 610 nm ($\epsilon_{610} = 22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La mezcla de reacción contenía buffer succinato 0,05 M pH 4,8, 0,1 mM de $MnSO_4$, 0,1 mM de H_2O_2 (Glenn and Gold, 1985). Endoglucanasa y endoxilanasas se determinaron en 0,1 M de buffer acetato de sodio, pH 4,8, usando como sustrato respectivamente carboximetilcelulosa (CMC) 0.5% para endoglucanasa y xilano de avena 0,2% para endoxilanasas. Se cuantificaron azúcares reductores liberados por el método de Somogyi-Nelson usando glucosa o xilosa como standard para calcular respectivamente actividad endoglucanasa o endoxilanasas (Nelson, 1944). La actividad glioxal oxidasa (GLOX) fue estudiada mediante un ensayo acoplado a peroxidasa, usando metilglioxal como sustrato para GLOX y rojo fenol para la peroxidasa (Kersten, 1990) La concentración de H_2O_2 se midió con el ensayo acoplado de peroxidasa. La mezcla de reacción consistió en 2.5 U de peroxidasa de rábano picante (HRP, Sigma) por ml de sobrenadante de cultivo y rojo fenol 0.01% como dador de

electrones. Después de 10 min se agregó NaOH (0.2 M concentración final) y se midió la absorbancia a 610 nm. Muestras sin HRP se usaron como blanco (Kersten, 1990). La actividad enzimática se expresó en todos los casos como unidades internacionales (U) definiéndolas como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de producto en 1 min.

Resultados y discusión

Sobrenadantes de cultivo de *T. trogii*, *C. antarcticus* y *T. villosa* se analizaron para el tratamiento enzimático de pulpa Kraft (sin adición posterior de NaOH, y minimizando los requerimientos de H_2O_2). El principal objetivo de este relevamiento preliminar fue testear las mejores condiciones de cultivo para el bioblanqueo. El experimento se centró en la detección rápida, preservando los reactivos del ensayo. Con esto en mente, las eficiencias de los sobrenadantes se ensayaron mediante el uso de 100 mg de muestras y se midió la luminancia como parámetro. Los valores de luminancia obtenidos fueron 92.5, 74.4 y 74.1 para *T. trogii*, *C. antarcticus* y *T. villosa*, respectivamente. Se detectaron actividades lacasa y MnP en todas las cepas, pero *T. trogii* mostró los títulos más altos de ambas actividades enzimáticas junto con valores de luminancia superiores. Esta diferencia en la eficiencia de bioblanqueo podría atribuirse al potencial redox ($E^\circ = 0,79$) de la lacasa de *T. trogii*, ya que ésta pertenece al grupo de las lacasas con alto potencial redox (Garzillo et al., 2001).

Por otra parte *T. trogii* produjo también altos niveles de actividad GLOX en los cultivos adicionados con Cu 1 mM (0.19 U ml^{-1} al día 21 de crecimiento). Sólo unas pocas cepas de las 67 analizadas por de Jong et al. (1992) mostraron actividades GLOX mayores a 0.003 U ml^{-1} . Kersten usando un medio líquido optimizado obtuvo valores de actividad GLOX de 0.032 U ml^{-1} en *P. chrysosporium*. A pesar de que el H_2O_2 es el aceptor de electrones necesario para la catálisis, las peroxidasas, incluida la MnP son sensibles a ser inactivadas por el peróxido (Kersten, 1990). Con el fin de prevenir este tipo de inactivación en experimentos de bioblanqueo, el H_2O_2 se puede suministrar de forma continua a demanda. Cuando se estudió la MnP de *Bjerkandera* sp. BOS55 para aplicarla a bioblanqueo un enfoque alternativo al suministro continuo de H_2O_2 lo constituyó la producción continua de ésta por la glucosa oxidasa (Moreira et al., 2001). Asimismo, el suministro continuo de H_2O_2 por la acción de la GLOX, puede mejorar el nivel de bioblanqueo de los sobrenadantes de *T. trogii*.



Time (d)	MnP (U/ml)	Laccase (U/ml)	Endoglucanase (U/ml)	Endoxylanase (U/ml)	Luminance
7	0	0.1	0	0	77.98
11	0	0.86	0.57	1.12	78.16
14	0.22	75.00	3.99	11.82	90.84
21	0.25	43.53	2.56	12.19	92.45
23	0.18	27.77	2.85	11.33	90.34
30	0.09	33.33	2.85	11.82	89.74

Tabla B.1 Abajo: ilustra la variación a lo largo del tiempo de las actividades enzimáticas lignocelulolíticas y capacidades de blanqueo de los filtrados crudos de *T. troglia*, cuando el hongo se cultivó estáticamente en medio GA suplementado con 1 mM de CuSO₄. La luminancia más alta se logró con los filtrados de cultivos de 21 días [que contienen lacasa (43.53 Uml⁻¹), MnP (0.25 Uml⁻¹) y endoxilanasas (12.19 Uml⁻¹)]. Arriba muestra correspondientes a las pastas tratadas con los sobrenadantes de los días indicados en el vértice.

Por otra parte, después del tratamiento enzimático, el requerimiento de H₂O₂ disminuyó, como se refleja por el peróxido remanente superior en las muestras que contenían la pulpa sometida a tratamiento enzimático, con respecto a los controles tratados con agua (datos no mostrados), además la luminancia de la pulpa aumentó significativamente alcanzando un valor de 92.5 (medido contra un blanco de referencia de óxido de titanio L* = 94.5). En comparación la luminancia original de la pulpa sin tratar fue de 77.9 y la del control tratado con agua de 78.9 (Tabla B.1). También se llevó a cabo un control incubado con el medio sólo, pero la luminancia de la pulpa no difirió significativamente de la tratada con agua.

Debido a que la presencia de hidrolasas (celulasas y hemicelulasas) y oxidasas (ligninasas) varía en función de la edad del cultivo, el resultado del blanqueo de la pulpa difiere cada día. Otro factor que podría influir sobre la eficacia del blanqueo podría ser la concentración de mediadores secretados por el hongo. La presencia de mediadores pudo haber ampliado la gama de sustratos susceptibles a la oxidación, que a su vez pueden haber llevado a la mejora en la eficiencia de blanqueo en comparación con la reportada anteriormente (Bourbonnais and Paice, 1990; Bourbonnais et al., 1997).

Por lo tanto, en un intento de obtener una mayor eficiencia en el proceso de blanqueo, se añadieron artificialmente mediadores de lacasa a los sobrenadantes (HBT, HBA, ABTS o anisaldehído); sorprendentemente, ninguno de ellos mejoró el bioblanqueo. E incluso, su adición disminuyó la eficiencia del proceso. Además, las mediciones de las actividades de lacasa residuales mostraron un importante efecto de desestabilización de la enzima causada por estos mediadores (hasta 30% de actividad residual con respecto a la actividad inicial) (Tabla B.2). La inactivación de la enzima por las especies oxidadas de algunos mediadores es un inconveniente general de los sistemas lacasa-mediador (Ibarra et al., 2006b; Papinutti et al., 2008). Probablemente, este efecto de desactivación fue el responsable de los valores de luminancia más bajos en comparación con el control sin adición de mediadores. Las enzimas hidrolíticas mostraron una inactivación completa posterior a la incubación en todos los experimentos, independientemente de la adición de mediadores (datos no mostrados).

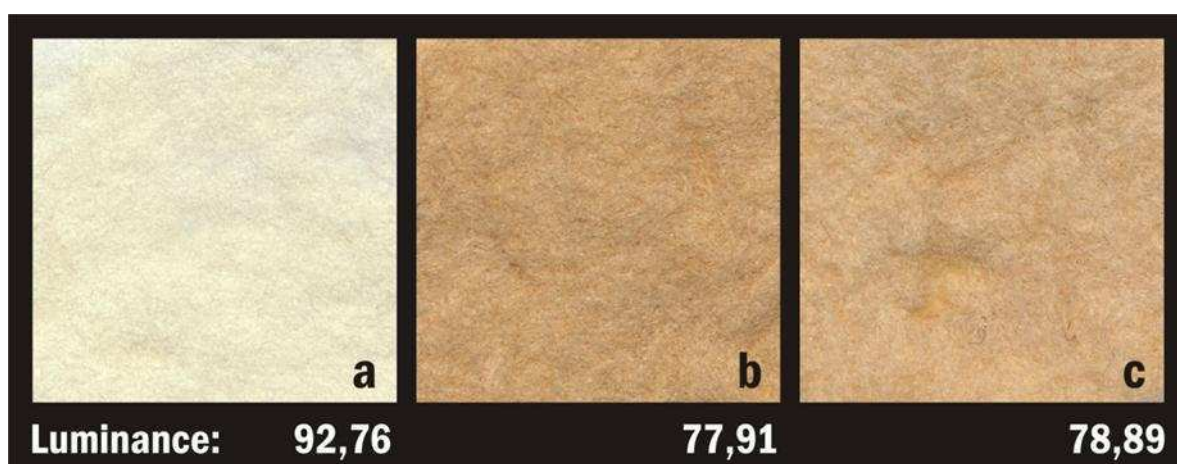


Fig. B.2: Luminancia de la pulpa de *P. taeda* tratada con sobrenadantes de cultivo de *T. trogii* de 21 días de incubación en medio GA suplementado con 1 mM de CuSO_4 (izquierda), alcanzaron un valor de luminancia de 92.76 (medido contra un blanco de referencia de óxido de titanio $L^*= 94.5$). En comparación la luminancia original de la pulpa sin tratar fue de 77.91 (centro) y la del control tratado con agua de 78.89 (derecha).

Los mediadores naturales como la acetosiringona, el ácido cumárico y el siringaldehído constituyen una alternativa en bioblanqueo (Fillat and Roncero, 2010). La producción de anisaldehído por *T. trogii* se ha demostrado previamente (Levin et al., 2003), éste u otros mediadores naturales podrían

estar presentes en los sobrenadantes de cultivo, y desempeñar un papel en el proceso de blanqueo sin el efecto concomitante no deseado de desactivación de las enzimas ligninolíticas causado por los mediadores sintéticos.

Tabla B 2. Efecto de los mediadores (1.5% p/v del sobrenadante) sobre la actividad residual después de tratar a la pulpa 12 h a 50°C.

	Lacasa (%)	MnP (%)	Luminancia
Control	96	100	92.76
HBT	48	48	78.89
HBA	37	84	87.78
Anisaldehído	49	84	83.07

Valores de actividades enzimáticas y de luminancia de la pulpa Kraft después del tratamiento con sobrenadantes de *T. trogii* y blanqueo con peróxido (H₂O₂ 2%: 2 h a 80°C). Se aplicaron sobrenadantes de *T. trogii* cultivados estáticamente en medio GA suplementado con 1 mM CuSO₄ de 21 días de crecimiento (actividades iniciales: lacasa 45.53 Uml⁻¹; MnP: 0.25 Uml⁻¹).

Teniendo en cuenta que la lacasa de *T. trogii* demostró ser totalmente estable luego de 24 h de incubación a 50°C (Levin et al., 2002) se probó la eficiencia de estos sobrenadantes reciclados luego de un ciclo de incubación para blanquear nuevas muestras de pulpa Kraft en un segundo ciclo de incubación. Si bien el blanqueo fue menor al observado luego del primer ciclo, se logró un fuerte aumento en el valor de brightness comparado con el valor inicial de la pulpa (Tabla B 3) lo que demostró que en un segundo ciclo de incubación los sobrenadantes de *T. trogii* son capaces de retener su capacidad de blanqueo. La pérdida de actividad enzimática no fue significativa para la lacasa y la MnP que retuvieron aproximadamente el 100% de sus actividades. En otros estudios, MnP y lacasa demostraron actuar sinérgicamente en la degradación de la lignina y de algunos colorantes (Galliano et al., 1991; Arantes and Milagres, 2007), la actividad MnP también mostró estar involucrada en el bioblanqueo; esta enzima puede utilizar los ácidos grasos insaturados como mediadores a través de la peroxidación de lípidos para degradar lignina sintética

de manera eficiente (Bao et al., 1994; Bermek et al., 2002). Por lo tanto, el efecto sinérgico entre la lacasa y la MnP no se pueden descartar. Se describió un efecto sinérgico entre la MnP y la lacasa de *Rigidoporus lignosus* en la degradación de la lignina (Levin et al., 2002). También se postuló que existe una interacción entre la MnP y la lacasa de *Stropharia rugosoannulata*: la lacasa produjo indirectamente H₂O₂ por oxidación de Mn⁺², necesario para la acción de la peroxidasa (Levin et al., 2002). Este tipo de cooperación podría aumentar la velocidad de degradación si ambas enzimas están presentes.

Tabla B.3. Evolución de los valores de Brightness y actividades enzimáticas en primer y segundo ciclo de uso de los sobrenadantes.

	Brightness (% ISO)	Lacasa (%)	MnP (%)
Pulpa control- Tratada con agua	37.3		
Sobrenadante - 1 ^{er} ciclo	82.26	96	100
Sobrenadante - 2 ^{do} ciclo	73.61	91	100

Condiciones de tratamiento: 12 h a 50°C; seguidas por H₂O₂ 2% 2 h a 80°C. Los sobrenadantes de *T. trogii* se cultivaron estáticamente durante 21 días en medio GA suplementado con 1 mM de CuSO₄ (actividad de lacasa: 45.53 Uml⁻¹; actividad MnP: 0.25 Uml⁻¹; actividad GLOX: 0.19 Uml⁻¹; concentración inicial de peróxido de hidrógeno en el sobrenadante: 0,035 mM).

Existen antecedentes de otras enzimas como las xilanasas que se utilizan comercialmente en secuencias de bioblanqueo (Bajpai, 2004). Durante el pulpado Kraft parte del xilano se disuelve pero cortas cadenas de xilano precipitan en forma más o menos cristalina sobre las microfibrillas de celulosa y forman una barrera contra la extracción efectiva de la lignina residual de las fibras. La hidrólisis del xilano o del manano en el interior de las fibras puede mejorar también su “blanqueabilidad” (Viikari et al., 1994).

Sin embargo, las xilanasas no parecen contribuir apreciablemente a la eficiencia de bioblanqueo de los sobrenadantes de *T. trogii*, teniendo en cuenta que sólo el 12% de la actividad inicial endoxilanasas se mantuvo después del primer ciclo de incubación, pero los sobrenadantes no perdieron su capacidad de blanqueo cuando fueron utilizados en un segundo ciclo.

Habitualmente, las enzimas celulolíticas (entre ellas la endoglucanasa) representan un inconveniente cuando se aplican sobrenadantes de cultivo, por ese motivo con la finalidad de reducir los efectos sobre la fracción de celulosa de la lignocelulosa, se pueden buscar condiciones de bioblanqueo experimentales que no afecten a las actividades ligninolíticas pero inactiven a las celulasas. Alternativamente con el fin de obtener sobrenadantes adecuados para los propósitos de bioblanqueo, se pueden aplicar técnicas de optimización de superficie de respuesta, dirigidas simultáneamente a maximizar la producción de enzimas ligninolíticas y reducir al mínimo la producción de celulasas. Esta metodología se aplicó con éxito en *T. trogii* obteniéndose en fermentación en estado sólido en un medio basado en madera, suplementado con extracto de malta, peptona y cobre 901 Ug^{-1} de lacasa y 20 Ug^{-1} de MnP (Levin et al., 2008).

Aunque, las lacasas podrían ser producidas a gran escala y a bajo precio, el costo del mediador es el factor determinante para la comercialización del sistema de blanqueo lacasa-mediador. Por lo tanto, el hecho de que los extractos extracelulares crudos de *T. trogii* no requieran la adición de mediadores sintéticos para bioblanqueo, convierte a este hongo en una alternativa interesante para su aplicación a dicho proceso.

Optimización de los parámetros del proceso de bioblanqueo usando *T. trogii*

En el apartado anterior se ensayaron sobrenadantes de cultivo de distintos hongos de pudrición blanca para su aplicación en bioblanqueo de pulpa Kraft industrial, obteniéndose resultados promisorios con extractos crudos de *T. trogii*, sin el agregado de mediadores (Papinutti et al., 2008). En esta sección se analizarán distintos parámetros relacionados con el proceso de bioblanqueo, utilizando los sobrenadantes de este hongo, con el objetivo de optimizar las condiciones del proceso.

Varias cuestiones necesitan ser resueltas antes de implementar el uso de enzimas ligninolíticas en estrategias industriales de blanqueo TCF. Un aspecto a abordar es la producción a gran escala y bajo precio de comercialización de las enzimas adecuadas. Un segundo aspecto que hay que resolver es la disponibilidad de mediadores eficientes y económicos para las aplicaciones anteriores. La toxicidad eventual y efecto inactivante de la enzima por parte de la mayoría de los mediadores de lacasa y sus productos de reacción constituye una cuestión importante que todavía resta por investigar (Bajpai, 2004; Papinutti et al., 2008). Uno de los enfoques más prometedores para mejorar la producción de la pasta Kraft consiste en incrementar el rendimiento general de la pulpa, reduciendo conjuntamente los costos operativos. Muchos estudios se han centrado en el mecanismo de delignificación, las condiciones que afectan a la actividad de las enzimas, y la búsqueda de nuevos mediadores, pero no en esclarecer la influencia de las condiciones de trabajo (Moldes and Vidal, 2008). Los métodos tradicionales de optimización suelen involucrar el cambio de una variable independiente, manteniendo las otras fijas.

Basándose en el principio de diseño de experimentos, la metodología de superficie de respuesta (RSM) abarca el uso de varios tipos de diseños experimentales, la generación de ecuaciones polinómicas y el mapeo de la respuesta sobre el dominio experimental para determinar las condiciones óptimas de operación de un proceso y mejorar significativamente su resultado en cuanto a costos, tiempos, eficiencia, productividad (Singh et al., 2008). La RSM requiere un mínimo de experimentación y consecuentemente tiempos cortos, y permite la investigación del efecto de todos los parámetros simultáneamente y de sus posibles interacciones.

En el presente estudio toda la secuencia de bioblanqueo con sobrenadantes de cultivo de *T. troglia* se realizó a temperatura moderada (28°C) para minimizar la pérdida de pulpa y el gasto de energía. La metodología de superficie de respuesta elegida se basó en un diseño de Doehlert (Doehlert, 1970), y se la utilizó para analizar los efectos de varios parámetros del proceso involucrados en la etapa de blanqueo con peróxido. El efecto de blanqueo se evaluó sobre la base de las propiedades ópticas de la pulpa como principal criterio en la toma de decisiones de los consumidores. Se investigó el impacto de las tres variables cuantitativas, el pH, la concentración de peróxido de hidrógeno y el tiempo de tratamiento, en la luminancia de la pulpa.

Materiales y métodos

Organismo, medio y condiciones de cultivo

Se utilizaron sobrenadantes de cultivo de *T. trogii* BAFC 463 obtenidos a partir de cultivos de 21 días de incubación en medio GA (glucosa 10 g, asparagina 4 g suplementado con $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 mM). Los cultivos se realizaron en Erlenmeyers de 250 ml con 50 ml de medio.

Tratamiento enzimático de la pulpa Kraft industrial sin blanquear de *P. taeda* (PKSB: pulpa Kraft sin blanquear) (etapa E: etapa enzimática)

Muestras de un gramo (peso seco) de pulpa Kraft industrial de *P. taeda* (PKSB) con valor de número Kappa inicial de 24.8 se lavaron con agua destilada hasta que el agua de lavado alcanzó $\text{pH}=7$ y se las trató con sobrenadantes de cultivo de *T. trogii* a una consistencia del 12%, incubándolas a 28, 40 o 50°C con agitación a 50 rpm por distintos períodos de tiempo (entre 1 y 24 h). Se llevaron a cabo dos controles, en uno el sobrenadante enzimático fue reemplazado por agua y en el otro por medio de cultivo.

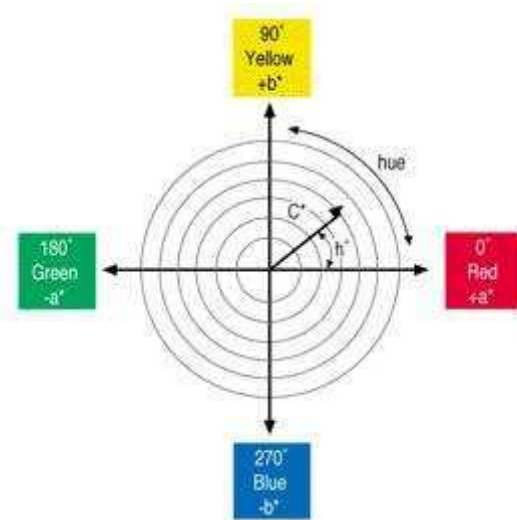
Tratamiento con peróxido (etapa P: etapa peróxido)

Muestras de pulpa incubadas a 28°C 1 h con sobrenadante enzimático (PKBE: pulpa Kraft blanqueada enzimáticamente) y controles, se blanquearon con H_2O_2 . Se ensayaron distintas consistencias (2.5, 5 y 10%). Se ensayaron concentraciones crecientes de peróxido (0-3%) diluidas tanto en agua como en diferentes buffers (fosfato de sodio, succinato de sodio y tris-malato 0.1 M, pHs entre 4 y 8). La incubación se llevó a cabo a 28°C y 50 rpm en Erlenmeyers de 100 ml. Se evaluaron diferentes periodos de incubación (12-120 h).

Evaluación de las propiedades de la pulpa

El valor de Luminancia (L^*) se midió contra un blanco de referencia estándar de óxido de titanio ($L^*=94.5$) con un espectrofotómetro esférico portable SP62 (D65/10°). El color de las muestras se describió de acuerdo con el sistema CIE (ver apartado) $L^*a^*b^*$ en donde L^*a^* y b^* son coordenadas de un espacio –color tridimensional, basado en la teoría de que el color es captado como valores de luminosidad (eje L^* va de luminosidad a oscuridad) a^* (del rojo al verde) y b^* (del amarillo al azul) y C^* Croma ($C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$) (Moldes et al., 2008). El punto de blanqueo ideal se define por $L^*= 100$ (que es sólo un valor teórico) y $a^*=b^* = 0$. Las respuestas medidas se graficaron como ΔL^*

(incrementos de luminancia sobre el valor del control blanqueado sólo con peróxido). El rendimiento de la pulpa se determinó gravimétricamente luego de secarla a 37°C hasta peso seco constante.



Example	L*	C*	h
Pale Gray (nearly white)	83.70	-0.71	315.0Y
Medium Gray	59.60	0.50	270.0Y
Brilliant Red	43.70	41.55	26.8Y
Brilliant Yellow	83.30	77.02	88.6Y
Green	56.80	33.72	152.7Y
Deep Blue	29.30	19.61	294.1Y

Fig.B.3: Espacio cromático $L^*a^*b^*$ con el eje vertical L (Luminancia) y los ejes horizontales de color a^* y b^* . Estos últimos definen el plano del color, en el que la intensidad cromática (chroma) aumenta hacia fuera a partir de la ausencia de color central. Los colores se desarrollan desde el eje central hacia la periferia, ganando progresivamente en saturación. Cuanto más alto esté localizado el plano cromático en el eje vertical, más claros parecen estos colores y cuanto más descienden, resultan más oscuros.

Espacio de color CIE Lab En el año 1976, la CIE (Commission Internationale de l'Éclairage) creó el sistema CIE Lab. En este espacio se encuentran todos los colores visibles para el ojo humano. Este sistema representa un espacio de color uniforme con distancias iguales que corresponden a diferencias equivalentes de color percibidas. Este espacio de color es tridimensional y está formado por tres ejes que son L^* , a^* y b^* , como se muestra en la (Fig. B.3). El valor de L^* es una medida de la luminosidad de un objeto y se cuantifica en una escala en donde el negro perfecto tiene un valor L^* de cero y el blanco un valor L^* de 100. El valor de a^* es la medida de rojo (cuando a^* es positivo) o verde (cuando a^* es negativo). El valor de b^* es una

medida del amarillo (cuando b^* es positivo) o del azul (cuando b^* es negativo). Las coordenadas a^* b^* se aproximan a cero con los colores neutros (blanco, gris) y aumentan de magnitud con los colores más saturados o intensos.

Determinación de las actividades enzimáticas

Se valoraron siguiendo la metodología descrita previamente, a 50°C, su temperatura óptima de reacción (Levin et al., 2002). Los resultados presentados son la media de los ensayos por triplicado con una desviación estándar de menos de 5%.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se testaron diferentes condiciones de trabajo (pH, concentración de peróxido y tiempo de tratamiento) en la etapa de blanqueo con peróxido que sigue al tratamiento enzimático de la pulpa usando una metodología de superficie de respuesta basada en el diseño experimental de Doehlert, con el fin de describir sus efectos y normalizar un protocolo de bioblanqueo. Los niveles de las variables ensayadas fueron seleccionados de acuerdo a los estudios preliminares. Pulpas tratadas enzimáticamente (5% de consistencia) fueron blanqueadas con H_2O_2 en buffer succinato de sodio a 28°C. Para analizar el efecto de tres variables independientes, Doehlert propuso un diseño experimental basado en 13 combinaciones de las tres variables estudiadas. Se adoptaron y codificaron los valores equidistantes de cada variable independiente y la combinación entre ellas siguiendo este diseño.

La interrelación entre las variables dependientes y de funcionamiento se estableció mediante un modelo lineal que incluye, la interacción y los términos cuadráticos. Se construyó un modelo polinómico cuadrático Eq. (1) para la descripción de la respuesta medida como funciones de las variables del proceso:

$$\text{Eq. [1]} \quad Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2$$

En donde X_1 , X_2 y X_3 son los valores de los tres factores estudiados (pH, concentración de peróxido y tiempo de tratamiento) expresados como variables codificadas; b indica los coeficientes de regresión (calculados a partir de los datos experimentales por regresión múltiple usando el método de cuadrados mínimos) e Y representa la respuesta experimental medida (tanto L^* como C^*).

Los valores reales y codificados se muestran en la Tabla B 4. Los resultados se analizaron usando el software STATISTICA 5.1 (StatSoft, Tulsa, Okla).

Resultados

Influencia de la temperatura de incubación y tiempo de tratamiento en la etapa enzimática

Los resultados obtenidos muestran la viabilidad de blanqueo de pulpa en condiciones esencialmente moderadas, en una secuencia libre de cloro basada en el uso de sobrenadantes de cultivo de *T. trogii*, seguida de un tratamiento con H₂O₂.

Diferentes temperaturas de incubación se sometieron a ensayo en la etapa enzimática. A pesar de que el óptimo de actividad para la lacasa de *T. trogii* se encuentra a los 50°C (Levin et al., 2002), los valores de luminancia obtenidos fueron similares a los obtenidos cuando la pulpa se incubó a 28°C. Las concentraciones enzimáticas usadas fueron 352 U laccasa, 2 U MnP por g de pulpa seca. Teniendo en cuenta que los sobrenadantes de *T. trogii* retienen entre el 96 y el 100% de su actividad cuando se los incubaba a 50°C en presencia de pulpa Kraft de *P. taeda* (Da Re et al., 2008) se ensayaron distintos tiempos de incubación de entre 1 y 24 h. Después de la etapa subsiguiente de tratamiento con peróxido (consistencia 5%, H₂O₂ 2% en buffer succinato pH 6 a 28°C) las diferencias de luminancia encontradas fueron demasiado pequeñas para justificar el uso de tiempos largos de tratamiento (L* con 1 h de incubación= 93.8 y el de 24 h fue de 94.1). Resultados similares fueron obtenidos por (García et al., 2003; Sigoillot et al., 2005; Ibarra et al., 2006b; Moldes and Vidal, 2008).

El mayor efecto de la lacasa en la pulpa parecería producirse durante las primeras horas de tratamiento. Por lo tanto, la etapa enzimática podría acortarse, si fuera necesario para el desarrollo del proceso. Moldes and Vidal observaron el efecto protector sobre la actividad lacasa de *T. villosa* otorgado por la incubación en presencia de pulpa, sin embargo la actividad residual que obtuvieron luego de 2 h de incubación a 50°C fue de sólo el 38%, siendo la temperatura la principal causa de la inactivación (Moldes and Vidal, 2008).

En presencia de HBT, la actividad residual cae al 1%, la inactivación de las enzimas por las especies oxidadas de algunos mediadores es un inconveniente general de los sistemas lacasa-mediador (Ibarra et al., 2006b; Papinutti et al.,

2008). Por el contrario, las actividades lacasa y MnP de *T. trogii* exhibieron una alta estabilidad a 50°C cuando la incubación se lleva a cabo en presencia de la pulpa, la lacasa retuvo el 100% de su actividad después de 72 h y la MnP el 90%. Sin pulpa, la lacasa y la MnP exhibieron sólo 1/2 y 1/3 de sus valores iniciales de actividad. Los sobrenadantes de *T. trogii* conservan buena parte de su actividad y no requieren la adición de mediadores, consecuentemente tienen la capacidad de poder ser utilizados en sucesivos ciclos de bioblanqueo (Da Re et al., 2008).

Experimentos preliminares sobre el impacto de la consistencia de la pasta, pH del buffer y de la dosis de peróxido de hidrógeno en la etapa P

Mientras que la consistencia de la pasta en la etapa enzimática se mantuvo fija en 12,5%, se ensayaron diferentes consistencias en la etapa de tratamiento con peróxido (2,5, 5 y 10%). El valor de luminancia obtenido fue similar cuando se utilizó 2,5 y 5% de pulpa, pero disminuyó notablemente cuando la consistencia llegó al 10%. Probablemente el recipiente utilizado y el sistema de agitación no hayan sido apropiados para garantizar el acceso del agua oxigenada a toda la pasta. La consistencia de la pasta, como una fracción de masa, debe ser tan alta como sea posible con el fin de minimizar la cantidad de agua utilizada en una aplicación industrial.

La ausencia de diferencias significativas en los resultados sugiere que los dos niveles de consistencia (2,5 y 5%) proporcionaron un entorno de fibra similar y que los reactivos disueltos tuvieron acceso irrestricto a las fibras de celulosa. La influencia de la consistencia de la pulpa fue estudiada previamente por Geng et al. (2004) quienes encontraron diferencias menores entre 2.5 y 10% de consistencia. Moldes and Vidal (2008) evaluaron 5% o 10% de consistencia de pasta de madera de angiospermas, encontrando propiedades prácticamente idénticas en las mismas.

Muestras de pulpa tratada enzimáticamente se blanquearon a una consistencia del 5% durante 96 h a 28°C, con cantidades crecientes de H₂O₂ (entre 0.2 y 2%) diluida en diferentes buffers [fosfato de sodio (rango de pHs de 6 a 8); succinato de sodio (pHs entre 6 y 4) y tris-malato (pHs 5 a 8)]. Los resultados variaron incluso para el mismo valor de pH cuando se varió el buffer. Dado que los mejores valores de luminancia se obtuvieron con buffer succinato a pH = 6 y H₂O₂ 2%, éste fue el buffer seleccionado para los experimentos subsecuentes.

Modelado

Se aplicó la metodología de superficie de respuesta basada en un diseño experimental propuesto por Doehlert para estudiar los efectos de tres variables durante la etapa de peróxido: efecto del pH, de la concentración de H_2O_2 y tiempo (Tabla B. 4). Según nuestros estudios preliminares, estos factores podrían ser los más prometedores en el proceso de optimización.

Algunas propiedades ópticas, tales como L^* y C^* demostraron ser útiles para evaluar la eficiencia del proceso bioblanqueo, al estar directamente relacionadas con el grado de delignificación, proporcionando así una información más completa que las mediciones de brightness utilizadas convencionalmente (Moldes et al., 2008). Teniendo en cuenta que la determinación de los cambios estructurales en la pulpa después del bioblanqueo con sistemas lacasa-mediador podría correlacionarse con precisión con los cambios en las propiedades ópticas de la pulpa, con el fin de obtener una herramienta simple para evaluar la reacción de blanqueo (Moldes et al., 2008), el resultado de los tratamientos se comparó a través de L^* y C^* , según el sistema de color CIE L^*,a^*,b^* . Un modelo cuadrático completo que contiene diez coeficientes se utilizó para describir la respuesta observada para ajustarse a la ecuación (1). Sólo se encontraron los coeficientes lineales de las variables objeto de estudio para un rango de significancia $P < 0.05$, ninguno de los términos de interacción y cuadráticos fueron estadísticamente significativos (Tablas B5 y B6).

Tabla B 4. Diseño experimental de Doehlert para optimización. Luminancia de la pasta kraft sin blanquear 69.64 (a*=12.15; b*=28.08), mientras que el valor del control blanqueado con peróxido fue de 83.11 (a*=9.29; b*=26.42). SD < 5%.

Ensayo	Factor						Respuesta		
	Tiempo (hs)	H ₂ O ₂ (%)	pH	L*	a*	b*	L*	a*	b*
1	(0) ^a	84	(0)	2	(0)	5	87.55	6.47	20.35
2	(0)	84	(1)	3	(0)	5	90.65	5.29	17
3	(0.866)	120	(0.5)	2.5	(0)	5	91.73	4.29	14.69
4	(0.289)	96	(0.5)	2.5	(0.816)	6	94.45	2.41	9.55
5	(0)	84	(-1)	1	(0)	5	83.11	8.79	24.93
6	(-0.866)	48	(-0.5)	1.5	(0)	5	82.85	9.51	26.34
7	(0.866)	120	(-0.5)	1.5	(0)	5	87.91	6.73	20.87
8	(-0.866)	48	(0.5)	2.5	(0)	5	84.95	8.28	24.09
9	(-0.289)	72	(-0.5)	1.5	(-0.816)	4	79.27	10.95	28.46
10	(0.289)	96	(-0.5)	1.5	(0.816)	6	92.37	3.76	14.03
11	(-0.289)	72	(0.5)	2.5	(-0.816)	4	81.1	10.98	27.38
12	(-0.577)	60	(0)	2	(0.816)	6	92.31	4.12	14.11
13	(0.577)	108	(0)	2	(-0.816)	4	80.55	10.53	27.75
14	(0)	84	(0)	2	(0)	5	86.05	7.53	22.39

^a Los números entre paréntesis son los niveles codificados.

Tabla B5. ANOVA para el modelo cuadrático de superficie de respuesta

Fuente de varianza	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Error estandar	F	P
Regresión	9	313.963	34.885	16.78	0.008
Lineal	3	312.916	104.305	50.18	0.001
Cuadrático	3	0.136	0.037	0.02	0.996
Interacción	3	0.911	0.304	0.15	0.927
Error residual	4	8.314	2.079		
Falta de ajuste	3	7.189	2.396	2.13	0.458
Error puro	1	1.125	1.125		
Total	13	322.278			

Tabla B6. Coeficientes modelo estimados por regresión lineal múltiple y el modelo de predicción seleccionado.

Factor	Coefficiente	p
Cte	3.69	0.022
Tiempo	2.77	0.018
H ₂ O ₂	3.11	0.012
pH	7.80	0.000
Tiempo × Tiempo	0.05	0.972
H ₂ O ₂ × H ₂ O ₂	0.08	0.958
pH × pH	-0.22	0.881
Tiempo × H ₂ O ₂	0.99	0.583
Tiempo × pH	0.51	0.798
H ₂ O ₂ × pH	-0.19	0.920

$$R^2 = 97.4\% \text{ Eq. (2): } \Delta L^* = 10.05 + 2.77 \times \text{Tiempo} + 3.11 \times \text{H}_2\text{O}_2$$

ΔL^* = Incrementos de Luminancia por sobre el valor del control blanqueado con peróxido ($L^*=83.11$)

Por lo tanto, ya que los resultados no demuestran interacción entre las variables, se llevó a cabo una nueva regresión sólo con los términos lineales * (Tablas B4 y B5)

Tabla B7 Coeficientes de regresión para ΔL^* basados en los modelos lineales reducidos y las variables nativas. R^2 96,4%

Variable	coeficiente no estandarizado	coeficiente estandarizado	T	p
Constante	-39.96	2.474	-16.148	0.00000
b 1 (Tiempo)	0.07	0.011	5.614	0.00033
b 2(Peróxido)	3.11	0.494	6.299	0.00014
b 3 (pH)	6.37	0.403	15.779	0.00000

$$\Delta L^* = -39.96 + 0.07 * \text{Tiempo} + 3.11 * \text{Peróxido} + 6.37 * \text{pH}.$$

Tabla B 8 Coeficientes de regresión para C^* basados en los modelos lineales reducidos y las variables nativas. R^2 94.9

Variable	coeficiente no estandarizado	coeficiente estandarizado	T	P
Constante	80.048	3.91807	20.431	0.000
b 1 (Tiempo)	-0.094	0.01883	-5.015	0.001
b 2(Peróxido)	-4.011	0.78271	-5.124	0.001
b 3 (pH)	-8.434	0.63908	-13.197	0.000

$$C^* = 80.048 - 0.094 * \text{Tiempo} - 4.011 * \text{Peroxido} - 8.434 * \text{pH}.$$

Estas nuevas regresiones se llevaron a cabo con las variables dependientes nativas para hacer las ecuaciones más fáciles de usar. La calidad del ajuste del modelo se evaluó mediante el coeficiente R^2 . R^2 representa la proporción de variación en los datos de respuesta que puede ser explicada por el modelo ajustado. Se consideró el alto R^2 como una evidencia de la aplicabilidad del modelo en el rango de variables incluidas. Sobre la base de las ecuaciones reducidas, las curvas de iso-respuesta de L^* (los incrementos de los valores de luminancia por encima del valor del control blanqueado con peróxido: control peróxido) y C^* , a pH 6, se representan como gráficos de contorno (Fig. B4, A y B, respectivamente).

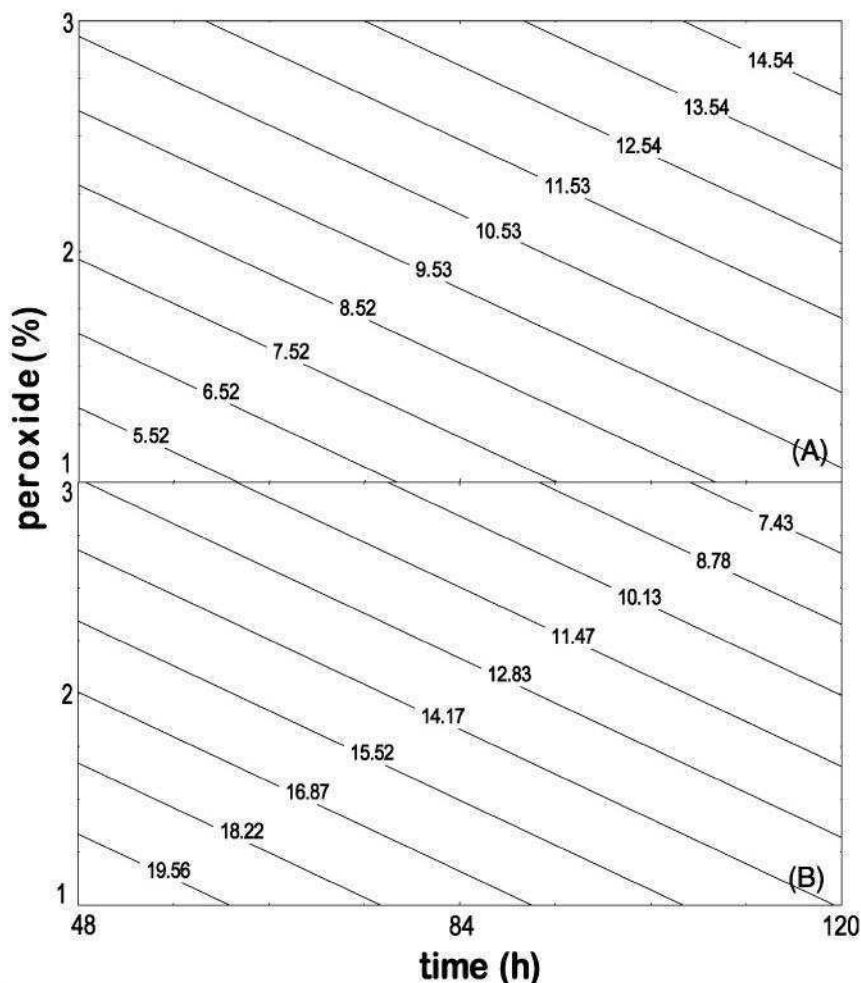


Fig. B 4 (A y B) Diagramas de contorno basado en las ecuaciones que se muestran en las Tablas B.4 y B.5, para los efectos de H₂O₂ y de tiempo de incubación en la etapa de peróxido (a pH 6,0) en A se grafica luminancia L* y en B Cromo C*. L* = incrementos de luminancia por encima del valor de control blanqueado con peróxido, sin tratamiento enzimático (L* = 83,11).

El análisis de las superficies de iso-respuesta a pHs 4 y 5 arrojó resultados similares, pero alcanzando menores valores de luminancia. Los valores de ΔL^* y C* y aquellos predichos por el modelo se grafican en las Figs. B.4 A y B respectivamente. La validez del modelo se confirmó ajustando diferentes valores de las variables en el modelo y llevando a cabo el experimento con esos valores de variables. Las diferencias entre las respuestas experimentales y las predichas fue siempre menor al 10%, apoyando la validez del modelo empleado.

El modelo utilizado y los datos de este análisis, permitieron definir los mejores niveles, entre los ensayados, de los factores seleccionados para el proceso de blanqueo; y también demostraron que las tres variables

independientes tuvieron un efecto positivo significativo en el valor de luminancia (L^*), y negativo en el Chroma (C^*) de la pulpa tratada con enzima.

Esta disminución resulta importante ya que C^* es menor cuando se tienen muestras más neutras, grises y alcanza valores negativos en las muestras blancas. El incremento en la luminancia de la pulpa en conjunto con la disminución en el Chroma, son características deseables en el papel.

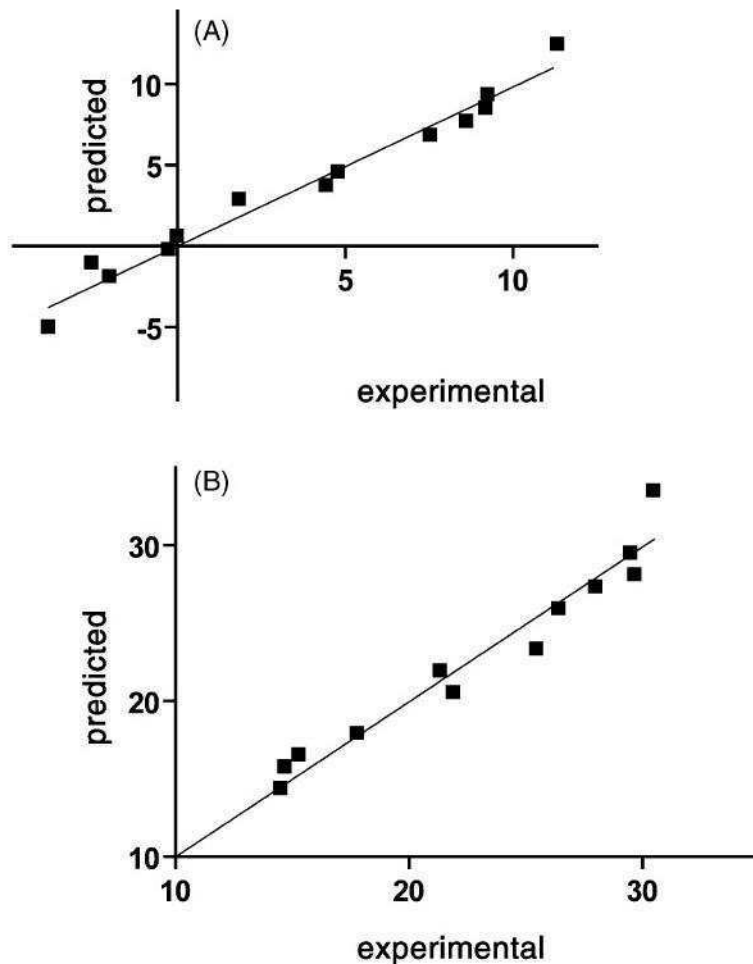


Fig. B.5 Valores previstos versus experimentales para L^* (A) y C^* (B).

Además también se pudo demostrar que no existirían efectos combinados entre las tres variables estudiadas. Para luminancia, los valores positivos para las tres variables en el término lineal (Tabla B.4) ilustran el efecto positivo significativo de todos ellos en la de la pulpa obtenida. Estos coeficientes lineales positivos indican que dentro del rango testeado, la luminancia aumenta con el tiempo de incubación, la concentración de H_2O_2 y el pH. A partir de estos

valores de los coeficientes, se puede observar que el pH es el factor que ejerce la mayor influencia positiva en la luminancia.

La reacción primaria de la lacasa en la degradación de la lignina consiste en la oxidación de los hidroxilos fenólicos a fenoxi radicales en presencia de oxígeno (Thurston, 1994). Anteriormente, se reportaron condiciones de tratamiento tales como el pH, con capacidad de influir en la formación de radicales en el tratamiento con esta enzima (Grönqvist et al., 2003). El pH también puede afectar a la reactividad de los radicales fenoxi formados. Cuando Moldes and Vidal analizaron el blanqueo de pulpa de eucalipto con el sistema lacasa-HBT, también encontraron que el valor del brightness se incrementaba al aumentar la concentración de H_2O_2 ; estos autores obtuvieron resultados similares (ISO brillo 66,5%) con pulpa tratada con 0,5% de H_2O_2 , si la etapa enzimática se realizó con el sistema lacasa-HBT, y con 2% de H_2O_2 si no se utilizó HBT en esa etapa (Moldes and Vidal, 2008). El valor mayor de brightness (68,0%) se obtuvo en las pruebas de control con 3% de H_2O_2 .

En nuestro trabajo los mejores resultados entre los ensayados se obtuvieron a pH 6, con H_2O_2 2,5%, después de 96 h de incubación. La L^* de la pulpa fue 94,45 con una C^* de 9,85 ($a^*= 2,41$ y $b^*= 9,55$). Las pulpas de madera de gimnospermas blanqueadas por lo general tienen un brightness de aproximadamente 70-90% y una amarillez (b^*) de 8 o más.

Existe una necesidad de mejorar los procesos de blanqueo, y esto comprende el avance hacia tratamientos menos costosos, con mayor nivel de blanqueo y un incremento en la estabilidad óptica (es decir disminución de los niveles de reversión) (Wan and Depew, 2000). Los coeficientes lineales negativos obtenidos en este trabajo, indican que los valores de C^* (Chroma) disminuyeron al aumentar el tiempo, H_2O_2 y el pH en el intervalo ensayado (Tabla B.8). El pH es el factor con la influencia negativa más marcada en ambas respuestas. C^* disminuyó notablemente después del mejor tratamiento (9,85), en comparación con el C^* de la pulpa Kraft sin blanquear (30,59) y la del control de blanqueado con peróxido (28) (Fig. B.9).

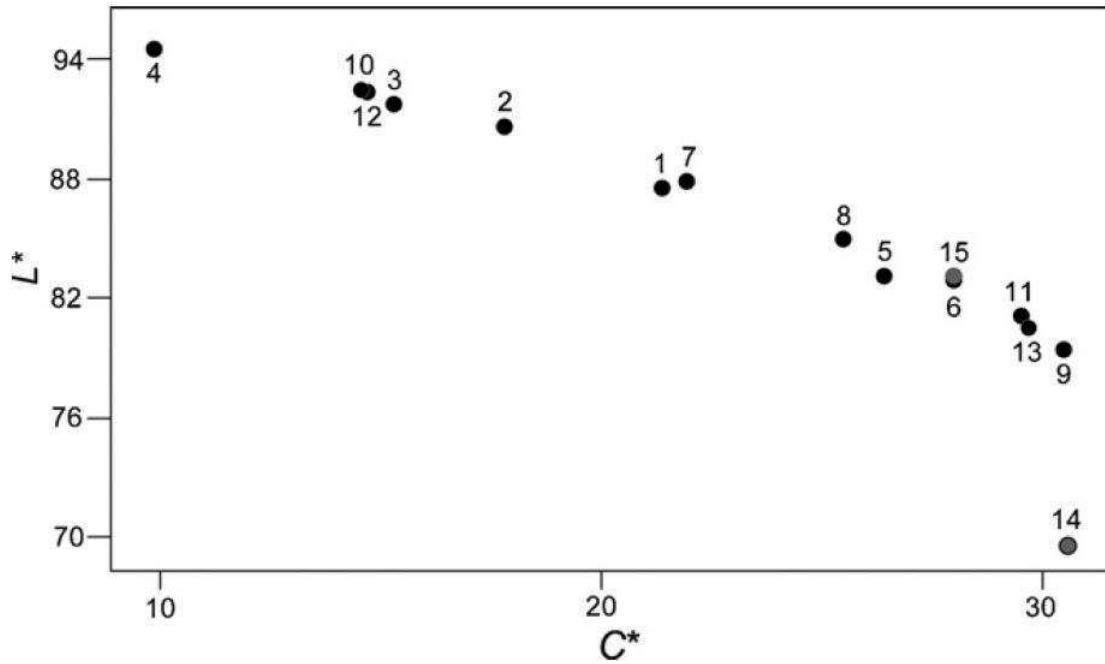


Fig B 9 Valores cromáticos (L*versus C*) de pulpa de *P. taeda* tratada bajo las condiciones detalladas en la Tabla B. 9. El punto 14 corresponde a la pasta Kraft sin blanquear y el 15 al testigo blanqueado con peróxido.

Fondos de la columna inferior contienen las fotos de los tratamientos correspondientes.

Tratamiento	FACTORES ANALIZADOS			RESULTADOS EXPERIMENTALES	
	Tiempo (hs)	H ₂ O ₂ (%)	pH	Luminancia	Pérdida de peso (%)
1	84	2	5	87.55	<0.5
2	84	3	5	90.65	2.08
3	120	2.5	5	91.73	4.66
4	96	2.5	6	94.45	4.37
5	84	1	5	83.11	<0.5
6	48	1.5	5	82.85	<0.5
7	120	1.5	5	87.91	1.69
8	48	2.5	5	84.95	0.52
9	72	1.5	4	79.27	<0.5
10	96	1.5	6	92.37	2.35
11	72	2.5	4	81.10	<0.5
12	60	2	6	92.31	1.15
13	108	2	4	80.55	<0.5
14	84	2	5	86.05	<0.5
Kraft	96	0	-	67.89	0
Control	96	2	6	77.92	0

Tabla B 9. Matriz del diseño y resultados obtenidos R²= 94%. (Representa la proporción de la variación en la respuesta que puede ser explicada por el modelo). Imagen Darío Andrada.

Los valores de L^* y C^* están en el rango obtenido previamente para el bioblanqueo de pulpa Kraft de eucalipto con un sistema lacasa-mediador (Moldes et al., 2008). Teniendo en cuenta que uno de los enfoques más prometedores para mejorar la economía de la producción de pulpa Kraft consiste en el aumento de los rendimientos de pulpa en general (Ragauskas, 2004), una ventaja adicional del proceso actualmente investigado, es la menor pérdida de rendimiento de la pulpa (menos del 5%). Diferentes protocolos de bioblanqueo con lacasa involucran una etapa posterior de peróxido a 80-90°C (Sigoillot et al., 2005; Moldes and Vidal, 2008), implicando una alta demanda de energía. En el presente trabajo se han alcanzado valores muy altos de luminancia (L^*) = 94.45 (en comparación con L^* = 94,5 del estándar blanco de referencia de óxido de titanio), bajo condiciones moderadas (28°C) reduciendo así el consumo de energía.

Conclusión

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que el blanqueo eficiente de la pulpa Kraft de *P. taeda* se puede lograr en una secuencia libre de cloro, con sobrenadantes de cultivo de *T. trogii*, que combinan altos títulos de lacasa (con alto potencial redox y estabilidad térmica) acompañados de niveles significativos de MnP; usando a continuación una etapa de peróxido.

Con un diseño experimental Doehlert se comprobó que las tres variables independientes (pH, concentración de peróxido y tiempo de tratamiento en la etapa de peróxido) tenían un efecto importante sobre la luminancia (L^*), y el Chroma (C^*) de la pulpa tratada con enzima, y que no había efectos combinados entre las tres variables estudiadas. Coeficientes lineales positivos y negativos para L^* y C^* respectivamente indicaron que mientras la luminancia se eleva, el Chroma disminuye, al aumentar el tiempo, la concentración de H_2O_2 y el pH en el intervalo ensayado. Los mejores valores de L^* y C^* , estuvieron dentro del rango obtenido previamente por otros autores que usaron secuencias de bioblanqueo con sistemas lacasa-mediador. Cabe destacar que en esos estudios se trabajó con chips de madera de angiospermas, más exactamente de eucaliptus, cuya composición la hace más fácilmente blanqueables ya que la lignina de las angiospermas se caracteriza por una alta concentración de unidades siringilo mientras que la correspondiente a las gimnospermas posee una mayor concentración de unidades guayacilo que son más resistentes a degradación (Hatakka and Hammel, 2011a).

Adicionalmente, los sobrenadantes de *T. trogii* no requirieron ni purificación ni suplemento de mediadores, algo que vuelve a este sistema menos costoso y ambientalmente más amigable. Además todo el proceso incluyendo una etapa posterior de peróxido puede realizarse bajo condiciones moderadas (28°C), reduciendo así el consumo de energía y la pérdida de rendimiento en masa. Por todas estas cuestiones, el bi blanqueo de pulpa usando sobrenadantes de *T. trogii* podría posicionarse como una alternativa interesante para futuros estudios enfocados en la producción de papel ambientalmente amigable.



Fig. B 10. Pulpas sometidas a los distintos tratamientos según diseño experimental de Doehlert, a simple vista se observan las diferencias en el color obtenido.



Fig. B 11. Los mejores resultados obtenidos entre los ensayados se obtuvieron a pH 6, con H₂O₂ 2,5%, después de 96 h de incubación. La L* de la pulpa fue 94,45 con una C* de 9,85 (a*= 2,41 y b*= 9,55) (izquierda), a la derecha control de la pulpa tratada con agua.

Bi blanqueo con sobrenadantes de cultivo de *C. antarcticus* (BAFC 266)

Aunque los resultados con *C. antarcticus* y *T. villosa* en el primer ensayo no resultaron equiparables a los obtenidos con *T. trogii*, evaluamos otras condiciones de cultivo con el objetivo de verificar si en condiciones distintas se podrían obtener sobrenadantes con propiedades similares para el blanqueo a las conseguidas con sobrenadantes de *T. trogii*.

Organismo, medio y condiciones de cultivo

Los cultivos de *C. antarcticus* se realizaron en medio GA adicionado con tres suplementos distintos: CuSO₄ 0,5 o 1 mM, o 500 mg de aserrín de *P. taeda*, en Erlenmeyers de 250 ml con 50 ml de medio. El micelio fue cosechado a distintos días a partir del día 7, por filtración a presión reducida, la fuente de enzima fue el sobrenadante crudo de cultivo, que se obtuvo directamente de la filtración de los mismos.

Tratamiento enzimático de la pulpa Kraft

Muestras correspondientes a 1 g de pulpa Kraft de *P. taeda* lavada y secada de 12.5 % de consistencia), más 8 ml de crudo enzimático (pH final 7) se incubaron a distintos tiempos (entre 1 y 24 h) a 30°C y 50 rpm, en tubos de ensayo.

Blanqueo

Se varió la concentración de H₂O₂ entre 2 y 2,5%. Se analizaron los resultados obtenidos usando dos métodos distintos de incubación el primero a temperatura elevada 80°C y tiempos breves (1 y 2 h). El segundo a temperatura ambiente 28°C, y con tiempos largos de incubación (96 y 168 h). Los ensayos se realizaron en agua destilada. En las muestras control el extracto enzimático fue reemplazado por agua. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Se evaluaron las propiedades de la pulpa siguiendo la metodología previamente descrita.

Resultados y discusión

El medio suplementado con CuSO₄ 1 mM fue el que mayor actividad lacasa registró (1,9 Uml⁻¹ al día 28), el medio con 0.5 mM produjo un máximo de 1,3 Uml⁻¹ al día 21, y el medio con aserrín un pico de 0.8 Uml⁻¹ también ese día. La MnP alcanzó el valor máximo en el medio suplementado con aserrín 0,27 Uml⁻¹ al día 28 de incubación y máximos de 0.05 Uml⁻¹ también ese día en los otros medios. Durante la evaluación de los sobrenadantes para el blanqueo, el correspondiente a 28 días de cultivo del medio suplementado con cobre 0,5 mM exhibió los mejores resultados aunque, este medio no mostró los valores máximos para ninguna de las dos enzimas valoradas. Existe la posibilidad de que lacasa y MnP contribuyan al proceso de bioblanqueo cuando se utilizan los extractos crudos de *C. antarcticus*; sin embargo, la eficiencia en el blanqueo no puede ser atribuida pura y exclusivamente a estas enzimas ya que sobrenadantes con concentraciones más altas de las mismas, no necesariamente aseguran un mejor blanqueo. Esto permite suponer que además resultan indispensables otros factores como la concentración de mediadores naturales que puede variar en función del estado fisiológico del cultivo. En *T. trogii* se alcanzaron valores similares de Luminancia usando la misma secuencia de blanqueo propuesta aquí, con niveles de producción de enzimas ligninolíticas mucho más elevados. Otros enzimas no valoradas e incluso mecanismos no enzimáticos podrían estar involucrados en la degradación de la lignina por este hongo, Gómez-Toribio et al. (2009) describieron en un hongo de pudrición blanca *Pleurotus eryngii*, la inducción de la producción de radicales hidroxilo (OH) a través de un ciclo redox que involucra quinonas.

Tabla B 10: Variación del ΔL^* en función de la edad del cultivo.

Día de cultivo	L*	ΔL^*
7	84,2	0,38
14	87,11	3,29
18	87,89	4,07
21	88,8	4,98
24	89,9	6,08
28	95,4	11,58
32	89,71	5,89

ΔL^* (Incrementos de luminancia sobre el valor del control blanqueado sólo con peróxido)

El estudio de la influencia del tiempo de incubación sobre los valores de luminancia alcanzados no mostró diferencias importantes para los tiempos de incubación de 1 y 2 h, tanto para el blanqueo a 80°C (Fig. B.12) como para el realizado a 28°C (datos no mostrados).

Dado que se probó previamente la factibilidad de usar sobrenadantes recuperados después de un ciclo de incubación en *T. troglia*, se testaron sobrenadantes frescos y sobrenadantes recuperados después de un ciclo de *C. antarcticus*, haciendo uso durante la etapa de blanqueo de dos concentraciones diferentes de H₂O₂, 2 y 2,5% (Fig. B.13). Las diferencias de blanqueo resultaron mínimas entre sobrenadantes enzimáticos mientras que una diferencia de 0,5% en la concentración de H₂O₂ permite casi triplicar el delta de luminancia ($\Delta L^* = L^*_{\text{Muestra}} - L^*_{\text{Blanco}}$).

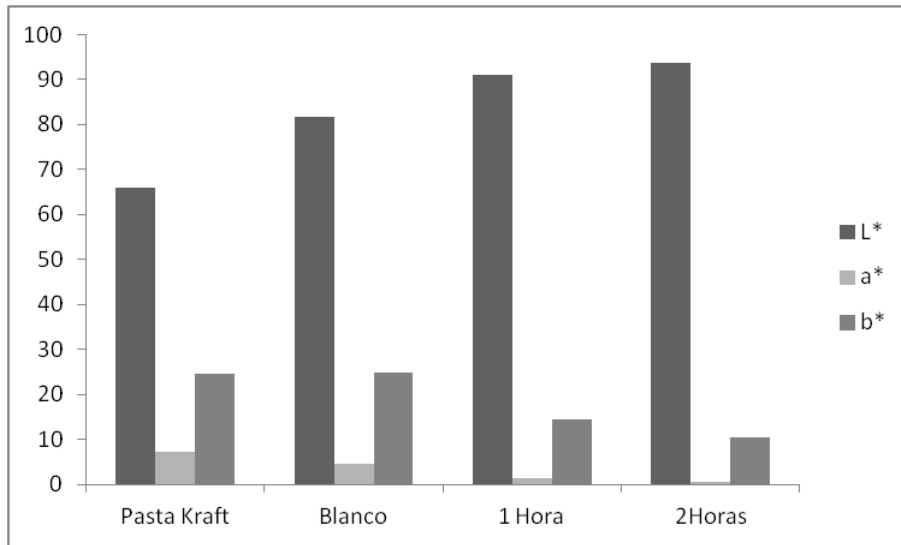


Fig. B 12: Valores de Luminancia. Pulpa Kraft corresponde a pulpa lavada con agua destilada. 1 y 2 h indican el tiempo de incubación con el sobrenadante enzimático. Blanco, 1 y 2 h de incubación blanqueados con H₂O₂ 2% durante 1 h a 80°C.

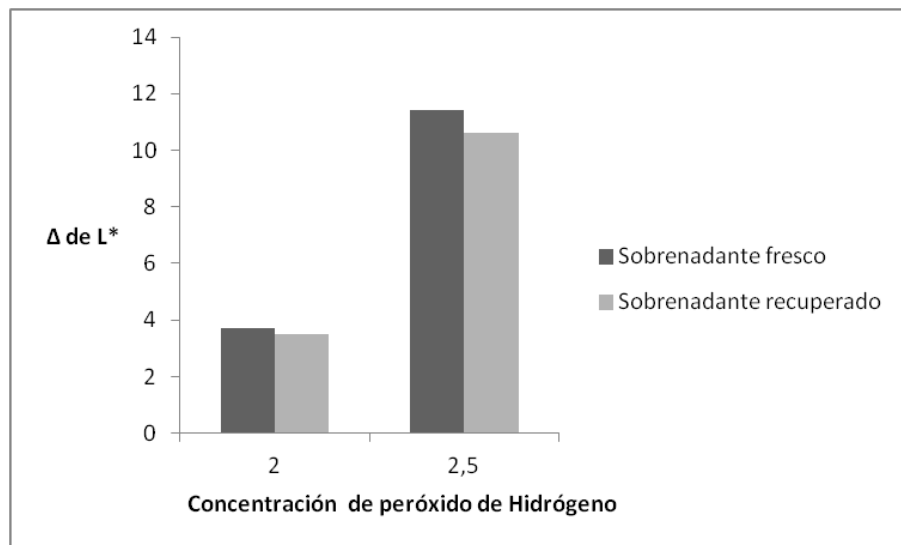


Fig. B. 13: Valores de Luminancia alcanzados usando sobrenadantes frescos y reciclados (28 días de cultivo, medio suplementado con CuSO₄ 0,5 mM). Blanqueo hecho usando dos concentraciones diferentes de H₂O₂.



Fig. B. 14: abajo a la derecha pulpa Kraft lavada; abajo izquierda blanco pulpa Kraft lavada y blanqueada con H_2O_2 2%; superior pulpa Kraft lavada, incubada 1 h con sobrenadante de cultivo de *C. antarcticus* y blanqueada con H_2O_2 2,5%. T° 28°C.

Conclusiones

La degradación de la lignina por parte de los hongos de pudrición blanca es un proceso complejo en el que intervienen múltiples enzimas, mediadores naturales y mecanismos indirectos como la inducción de la producción de radicales hidroxilo (OH) (Gómez-Toribio et al., 2009). Entre las enzimas modificadoras de la lignina podemos encontrar enzimas oxidativas que catalizan reacciones inespecíficas como la lacasa, lignin peroxidasa, manganeso peroxidasa y peroxidasa versátil. También pueden ser consideradas como parte de la batería enzimática que interviene en la degradación de la lignina algunas enzimas generadoras de H_2O_2 como la aril alcohol oxidasa y la glioxal oxidasa (Martinez et al., 2005). Esta complejidad imposibilita por el momento asignar un peso particular a cada uno de los componentes involucrados en el proceso de degradación de la lignina. Sobrenadantes de *T. trogii* y *C. antarcticus* estudiados en este trabajo demostraron potencial en bioblanqueo de pulpa Kraft de *P. taeda*. Uno de los enfoques más prometedores para la mejora de la economía de la producción de papel blanco a partir de pulpa Kraft consiste en el aumento

de rendimiento de la pulpa en general, y la reducción de la cantidad de pasos implicados en su procesamiento. En el presente estudio toda la secuencia de blanqueo se pudo llevar a cabo esencialmente bajo condiciones moderadas (28°C) para minimizar la pérdida de pulpa. Se utilizó una secuencia sencilla de pocos pasos, con bajo consumo de energía. También se trata de un tratamiento totalmente libre de cloro y que evita el costo elevado de la purificación enzimática y del uso de mediadores adicionales. Por todas estas razones, *C. antarcticus* y *T. trogii* parecen candidatos a ser tenidos en cuenta para las estrategias de bioblanqueo.

Los mecanismos enzimáticos implicados en el proceso de bioblanqueo en ambos hongos deben ser estudiados con mayor profundidad. También restan por optimizarse las condiciones del proceso para su escalado y aplicación a escala industrial.

5. Decoloración del Licor Negro.

Decoloración de licor negro dializado.

Introducción

La industria de pulpa y papel libera grandes cantidades de residuos capaces de afectar física, química y biológicamente al suelo, el agua y el aire. En países como India, esta industria es la principal fuente de contaminación acuática (Pathan et al., 2009). El proceso de cocción permite la emisión de gran cantidad de contaminantes aéreos como formaldehído, metanol, acetaldehído, etc. (Srivastava and Singh, 2015). Se han identificado más de 250 compuestos en efluentes de las distintas etapas de la producción del papel. Su naturaleza tóxica proviene tanto de moléculas naturalmente presentes en la materia prima, como de compuestos que se forman y se liberan durante las distintas etapas de producción (Swamy et al., 2011). La presencia de compuestos coloreados genera un problema extra, ya que afecta la productividad de los ecosistemas acuáticos, al inhibir la fotosíntesis alterando también a los primeros niveles de las redes tróficas. El color en los efluentes que se descargan a los cuerpos de agua trae aparejados problemas adicionales, ya que afecta también el uso municipal, recreativo e industrial del agua, cuyo tratamiento para volverla utilizable se encarece (Bajpai, 2012).

El licor negro es un residuo del proceso de producción industrial de pastas celulósicas más utilizado: el pulpado Kraft. Materiales lignocelulósicos como madera y otros no leñosos, se tratan a altas temperaturas (150-170°C) con una solución acuosa alcalina compuesta principalmente por hidróxido de sodio y sulfito de sodio. Todos estos materiales tratados tienen celulosa y lignina como componentes principales. La lignina, un polímero aromático compuesto de unidades estructurales derivadas del fenilpropano, que es la principal responsable de la cohesión entre las fibras en los tejidos vegetales, se degrada y disuelve casi completamente (90-95%) con este tratamiento. Esta solución acuosa que contiene subproductos orgánicos e inorgánicos constituye el licor negro. Durante el tratamiento de pulpado, se forman gran cantidad de compuestos coloreados además de lignina y cloroligninas y sus derivados, alcanzando así su color oscuro característico (Bergbauer et al., 1991).

El licor negro producto del proceso de fabricación de pasta Kraft contiene una mezcla de ligninas alcalinas; su intenso color marrón junto con su carácter recalitrante a la biodegradación hace de este residuo un tema de preocupación ambiental. Si bien la enorme mayoría de las plantas modernas reutilizan al licor negro quemándolo para abaratar sus costos de energía, muchas plantas de celulosa descargan en el entorno, sus efluentes de pulpado con insuficiente o ningún tratamiento (Sahoo and Gupta, 2005; Zhao et al., 2008) causando un aumento dramático en la contaminación del medio ambiente (Pokhrel and Viraraghavan, 2004), lo que resulta en especial dañino para los ecosistemas acuáticos (Hewitt et al., 2006). Habitualmente, se emplea un protocolo de precipitación con ácido de la lignina del licor negro, de esta manera más del 90% de la lignina se elimina de la solución como un material sólido (Gilarranz et al., 1998). Sin embargo, el porcentaje soluble restante se compone de lignina oxidada y parcialmente degradada (predominantemente compuesta de compuestos oligoméricos de lignina), cuyo color marrón oscuro no sólo es estéticamente inaceptable, sino que también podría inhibir el proceso de fotosíntesis en entornos acuáticos naturales debido al efecto barrera para la luz del sol. Además, la lignina precipitada, si no es usada para producir energía genera grandes volúmenes de lodos, que requieren tratamiento adicional para su eliminación.

La biodegradación de la lignina es un proceso dificultoso; los hongos de pudrición blanca son los únicos organismos en la naturaleza capaces de lograr una mineralización completa de la misma. En entornos naturales y en condiciones ambientales favorables, la madera atacada por estos hongos podría perder hasta un contenido del 90% de lignina (Dill and Kraepelin, 1986). La alta capacidad de los hongos de pudrición blanca para degradar la lignina se basa principalmente en la actividad de las enzimas ligninolíticas. Estos hongos secretan un sistema de enzimas extracelulares no específicas caracterizadas por poseer un alto potencial redox. El sistema ligninolítico generalmente está compuesto de al menos tres actividades enzimáticas: lignin peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP), y lacasa. Los mismos mecanismos no específicos únicos que dan a estos hongos la capacidad de degradar a la lignina también les permiten degradar una amplia gama de contaminantes. De hecho, estas enzimas han demostrado ser capaces de degradar un gran número de diferentes contaminantes ambientales, entre ellos: colorantes, bifenilos policlorados y pesticidas (Pointing, 2001), tornando a las enzimas ligninolíticas

en herramientas eficientes en vista a posibles procesos biotecnológicos de biorremediación.

En este trabajo, las dos variedades de licor negro que se usaron provenían del pulpado Kraft de *P. taeda*, con lo que además se debe tener en cuenta no sólo a la lignina sino a otros compuestos presentes en la materia prima. Componentes naturales de la madera son fuente significativa de toxicidad en los efluentes, entre los componentes tóxicos las resinas ácidas se han reportado consistentemente como responsables principales de esa toxicidad. (Liss et al., 1997). Resinas y ácidos grasos son componentes normales de la madera de coníferas y cumplen con la función de protegerlas del daño causado por microorganismos e insectos. Estos compuestos son liberados de la madera durante el proceso de cocción y una fracción de los mismos llega a la zona de tratamiento de efluentes. Resinas ácidas y ácidos carboxílicos de terpenoides son componentes dominantes presentes en los canales resiníferos de las gimnospermas. Dado que su función es proteger a la madera del biodeterioro no resulta sorprendente que constituyan una fuente de toxicidad aguda para otros organismos acuáticos. Durante el pulpado, la hidrólisis de ésteres genera ácidos grasos como palmítico y esteárico (saturados) más oleico y linoleico (insaturados) (Makris, 2004).

El objetivo de este trabajo fue valorar la capacidad de las cepas seleccionadas de hongos de pudrición blanca para decolorar licor negro en tres sistemas diferentes: medios agarizados en placa, fermentación sumergida y fermentación en estado sólido. Se testearon diferentes condiciones de cultivo, así como diferentes concentraciones de licor negro. Se evaluó el crecimiento, la capacidad de decoloración del licor negro y la producción de enzimas ligninolíticas.

Materiales y métodos

Organismos

C. antarcticus BAFC 266, *Phanerochaete sordida* BAFC 2122, *P. sanguineus* BAFC 2126, *I. lacteus* BAFC 1171, y *Lenzites elegans* 2127. Todas las cepas están depositadas en la Colección de cultivos de la Universidad de Buenos Aires (BAFC). Los cultivos stock se mantuvieron en medio extracto de malta (1,2%), agar (2%) en tubos pico de flauta a 4°C con transferencia periódica.

Decoloración del licor negro:

a- El contenido de sólidos del licor negro industrial proveniente del pulpado Kraft se determinó secando 1 ml de licor negro a 80°C hasta alcanzar peso constante.

b -El licor negro se dializó frente a agua destilada a 1: 1.000 relación (v/v) usando una membrana de látex de corte de 2,5 kDa. El agua destilada se reemplazó cada 24 h.

Decoloración en placas con medios agarizados

Como paso preliminar, placas de agar suplementado con 2%, 4% y 10% v/v de licor negro se inocularon con las cinco cepas. Se ensayaron dos medios de cultivo: MG y AG. Medio AG contenía la siguiente constitución por litro: Glucosa 10 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g; KH_2PO_4 , 0,5 g; K_2HPO_4 , 0,6 g; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,4 mg; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,09 mg; H_3BO_3 , 0,07 mg; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,02 mg; FeCl_3 , 1 mg; ZnCl_2 , 3,5 mg; clorhidrato de tiamina, 0,1 mg; y monohidrato de asparagina, 4 g. Medio MG: constituido por: 10 g de glucosa y extracto de malta 13 g por litro. Ambos medios se ajustaron a pH 6,5 con HCl 1 N. El inóculo consistió en un cuadrado de agar de 25 mm² de un cultivo de 10 días en MG.

Se llevaron a cabo dos tipos de controles, por un lado placas sin licor negro añadido fueron inoculadas con cada cepa, y además placas no inoculadas sirvieron como controles para estimar la posible existencia de decoloración abiótica. Las placas se incubaron a 28°C durante 45 días. El crecimiento fue seguido por la medición de la extensión radial de micelio. Un halo de decoloración indicó la capacidad de cada una de las cepas para degradar el licor negro. Mediciones diarias de las colonias y de los halos de decoloración (cuando los hubo) se realizaron para cada cepa. Las mediciones terminaron cuando los cultivos alcanzaron el borde de la placa. Las velocidades reportadas (día cm⁻¹) corresponden a la media de los ensayos por triplicado con una desviación estándar menor al 5%.

Decoloración en medio líquido

La decoloración en cultivos líquidos se realizó en Erlenmeyers utilizando medios GA y ME suplementados con diferentes concentraciones de licor negro: entre 2%, 4%, y 10% (v/v). Estos tratamientos también se aplicaron a cultivos crecidos durante 15 días. Los cultivos se filtraron, y los sobrenadantes se

centrifugaron a 3.000 x g durante 10 min; se recogieron las fases acuosas, y se estimó la decoloración.

Decoloración bajo condiciones de fermentación en estado sólido

La decoloración en fermentación en estado sólido (SSF) se probó en Erlenmeyers de 125 ml mediante el uso de dos medios sólidos: vermiculita (1 g) más medios GA o ME. El porcentaje de humedad inicial de todos estos medios sólidos fue del 85% (v/w).

Se ensayaron tres concentraciones acuosas de licor negro 10%, 4% y 2% (v/v). Posteriormente, los medios fueron autoclavados durante 20 min a 121°C. Los Erlenmeyers se inocularon con un taco de agar de 25 mm² proveniente de cultivos en MEA de 10 días de cada cepa fúngica. Un control sin licor negro añadido también se inoculó con cada una de las cepas. Frascos no inoculados sirvieron como controles para evaluar la posible transformación abiótica del color y fueron usados como blancos de color. Cada hongo se puso a prueba en tres experimentos independientes. Los Erlenmeyers se incubaron a 28°C, los experimentos duraron 2 meses. Después de 15, 30, y 60 días, se cosecharon tres frascos de cultivo de cada tratamiento, junto con tres frascos no tratados. Los extractos crudos se obtuvieron mediante la adición de 5 ml de agua destilada (g medio húmedo)⁻¹ a los contenidos de cada uno de los Erlenmeyers, se agitaron durante 20 min, y posteriormente se procedió a la filtración y centrifugación. Los extractos crudos se almacenaron a -20°C hasta el momento de su uso. Todas las determinaciones analíticas se realizaron mediante el uso de estos extractos crudos.

Estimación de la decoloración del licor negro.

Para el análisis de los extractos crudos se utilizó un espectrofotómetro UV-VIS (PerkinElmer WinLab-5.1). Las áreas bajo las curvas espectrales (AUC) se obtuvieron utilizando la versión 1.42q del programa Image J. La decoloración se expresó como porcentaje de reducción en el área de la absorbancia de acuerdo con la ecuación:

$$\text{Decoloración (\%)} = \text{AUC}_x \times (\text{AUC}_{\text{control}})^{-1} \times 100$$

Donde AUC_x = área bajo la curva espectral del extracto crudo tratado con la cepa x; $\text{AUC}_{\text{control}}$ = área bajo la curva del espectro del extracto crudo de los matraces no inoculados. En la primera etapa se escaneó dentro del rango visible entre los 400-680 nm. Las soluciones con diferentes concentraciones de licor

negro fueron escaneadas para determinar diferencias en las curvas espectrales. El área bajo las curvas se representó en función de la concentración de licor negro y la curva de calibración se estimó por regresión lineal. Para los diferentes tratamientos fúngicos, una línea de base recta se dibujó desde el punto más bajo entre 400 y 680 nm. Con el licor negro sin dializar, se hicieron diluciones en agua destilada 1:100 a fin de estudiar los cambios en la región correspondiente al UV y se midió entre los 250 y los 400 nanómetros. Para la región del visible, las diluciones fueron 1:25 y se midió entre 400 y 700 nanómetros.

Actividades enzimáticas

Todas las actividades enzimáticas se ensayaron a 30°C. La actividad lacasa fue determinada por la oxidación de DMP (2,6 dimetoxifenol) ($\epsilon_{469} = 27 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La mezcla de reacción contenía 0,1 M de buffer acetato de sodio, pH 3,6 y 5 mM DMP (Shuttleworth et al., 1986). La actividad MnP fue determinada por la oxidación de rojo de fenol (0,01%). El producto de reacción se midió a 610 nm ($\epsilon_{610} = 22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La mezcla de reacción contenía 0,05 M buffer succinato pH 4,8 y 0,1 mM MnSO_4 ; la reacción se inició por la adición de 0,1 mM H_2O_2 (Glenn and Gold, 1985). Una unidad de actividad enzimática (UE) fue definida como la cantidad de enzima requerida para oxidar 1 μmol de sustrato en 1 min.

Resultados

Decoloración en placas de Petri con medio agarizado

Una alícuota de licor negro original se dializó a través de una membrana de látex (corte de 2,5 kDa) frente a agua destilada con la finalidad de eliminar las sales. Los contenidos sólidos de la muestra dializada y el licor negro original fueron de 140 y 270 g L^{-1} respectivamente. Placas con el licor negro original (no dializado) de 0,5% v/v de concentración se inocularon con los distintos hongos, pero ninguno de ellos pudo crecer durante el transcurso de este ensayo (de 30 días de período de incubación). Entonces, las sales de licor negro original se eliminaron a través de la diálisis; como consecuencia, se redujo el pH a 8. Por consiguiente, los experimentos posteriores se realizaron mediante el uso de licor negro dializado. Se estudió el crecimiento de diferentes hongos en diferentes medios de cultivo, en un medio definido AG y en un medio natural MG, a tres concentraciones diferentes de licor negro dializado (2%, 4% y 10% [v/v]). Estas concentraciones de licor negro fueron equivalentes a 0,28%, 0,56% y 1,4% (w/v), respectivamente. Se midieron diariamente los halos de

crecimiento del micelio y los de decoloración del licor negro. Las cepas estudiadas fueron capaces de crecer en todas las condiciones ensayadas, incluso en la de mayor concentración de licor negro, aunque no todas ellas pudieron producir una decoloración apreciable (Tabla L.1). Los cultivos en MG mostraron que entre las cinco cepas usadas, *P. sordida*, *P. sanguineus*, y *L. elegans* fueron capaces de decolorar el licor negro a las dos concentraciones ensayadas. Sin embargo ninguno de los cultivos sobre AG logró decolorar el licor negro en las concentraciones evaluadas.

Tabla L 1. Crecimiento y decoloración en las placas por las cinco cepas de hongos seleccionados utilizando dos concentraciones de licor negro en el medio de cultivo, 4% y 2% (v/v)

Cepa	Medio	Dilución (% v/v)	Tasa crecimiento ^a (cm día ⁻¹)	Tasa decoloración (cm día ⁻¹)
<i>C. antarcticus</i> BAFC 266	AG	2	0.84 b	ND
		4	1.20 c	ND
	MG	2	0.72 b	ND
		4	1.04 c	ND
<i>I. lacteus</i> BAFC 1171	AG	2	1.46 d	ND
		4	1.50 d	ND
	MG	2	1.56 d	ND
		4	1.56 d	ND
<i>P. sordida</i> BAFC 2122	AG	2	1.12 c	ND
		4	1.33 c	ND
	MG	2	1.06 c	1.25 c (9)
		4	1.10 c	0.61 a (7)
<i>P. sanguineus</i> BAFC 2126	AG	2	0.65 a	ND
		4	0.96 c	ND
	MG	2	0.82 b	0.83 b (11)
		4	1.13 c	1.25 c (7)
<i>L. elegans</i> BAFC 2127	AG	2	1.27 c	ND
		4	1.31 c	ND
	MG	2	1.00 b c	0.53 a (11)
		4	1.10 c	0.45 a (9)

Los valores son medias de tres experimentos independientes (SD <5%). El primer día en el que se observó y midió el halo decoloración se indica entre paréntesis.

ND no se observó decoloración, AG medio glucosa -asparagina, MG medio de extracto de malta-glucosa.

^aMedias con la misma letra no son significativamente diferentes (p <0,05)

Con respecto a la velocidad de crecimiento, basándose en el test de Tukey, los hongos testeados podrían agruparse en cuatro categorías (Tabla L.1). *I. lacteus* exhibió el crecimiento más rápido entre las cepas ensayadas, pero no

se observó decoloración apreciable. Por otro lado, *P. sordida* y *P. sanguineus* generaron un halo de decoloración evidente en las placas de licor negro, pero sus velocidades de crecimiento resultaron ligeramente menores.

Decoloración en medio líquido

Se probaron dos medios de cultivo diferentes (GA y ME) junto con tres concentraciones de licor negro (2%, 4% y 10% [v/v]), pero ninguno de los hongos fue capaz de decolorar el licor negro en esas condiciones. Los valores de recuperación de hasta 100% demostraron que ni se produjo decoloración ni los micelios fúngicos adsorbieron el licor negro. Tampoco fueron capaces de decolorarlo los cultivos crecidos durante 15 días en medio líquido sin licor negro, transferidos luego a medio fresco con este efluente (datos no mostrados).

Decoloración bajo condiciones de fermentación en estado sólido

Se examinó también la capacidad de los hongos para decolorar licor negro en SSF, mediante el uso de vermiculita como sólido de apoyo. El crecimiento de hongos en SSF fue seguido diariamente a ojo desnudo; las cepas exhibieron velocidad similar en la colonización del sustrato por el micelio. El micelio de *P. sanguineus* mostró en el día 30 de crecimiento un color naranja intenso debido a la producción de cinnabarina (Rohr et al., 2013). *C. antarcticus* produjo un micelio compacto y blanco que cubrió completamente al sustrato. *P. sordida*, *L. elegans*, e *I. lacteus* mostraron sus desarrollos miceliares típicos con hifas laxas. Los cultivos en medios sólidos presentaron un grado variable de decoloración del licor negro dependiendo del día la cosecha, la cepa fúngica, los medios de cultivo y la concentración del licor negro. Se estimaron porcentajes de decoloración en extractos crudos obtenidos de los cultivos en SSF en tres intervalos de tiempo (15, 30 y 60 días). Para el propósito de estos análisis, los espectros de diluciones en serie de licor negro se determinaron espectrofotométricamente en el rango de 400 a 680 nm. Las diluciones en serie del licor negro en agua destilada incluyeron 0,5%, 2% y 4% (v/v). Se realizó una regresión lineal con los valores de las áreas medidas frente a la concentración del licor negro (Fig. L.1) ($R^2 = 0.99$). Los espectros del licor negro después del paso de decoloración con hongos en comparación con los espectros de diluciones del licor negro original demostraron ser casi paralelos en el rango de 430 a 520 nm; mientras que en el rango entre los 400-430 nm, el licor negro decolorado mostró un aumento más pronunciado a medida que disminuye la longitud de onda (Fig. L.2). Las diferencias en los valores de las áreas de

diferente concentración de licor negro en el rango espectral de 400-520 nm en comparación con las de 400 a 680 fueron similares, por lo que se adoptó el rango de 400 a 520 nm como los límites para el cálculo de las áreas bajo las curvas espectrales. Dado que el licor negro es una mezcla compleja constituida por una gran diversidad de moléculas, se puede estimar de manera más representativa la decoloración utilizando un rango amplio de longitudes de onda. Dado que ambas áreas espectrales de las diluciones seriales demostraron ser funciones lineales de la concentración del licor negro y las curvas espectrales de las distintas concentraciones del licor negro resultaron semejantes a aquellas del licor negro decolorado, se estimó la decoloración midiendo las áreas bajo las curvas espectrales. Se midió así la decoloración comparando las áreas espectrales del blanco de concentración del licor negro correspondiente, con las obtenidas tras el tratamiento fúngico. La decoloración del licor negro en cultivos SSF demostró que este subproducto recalcitrante de la industria papelera podría ser decolorado con eficacia por la totalidad de las cepas ensayadas en este estudio (Tabla L.2). Estos hongos evaluados demostraron que son capaces de decolorar significativamente al licor negro después de 15 días de cultivo. *P. sordida* y *L. elegans* mostraron los valores más altos de decoloración en MG y AG, respectivamente. Mientras que *I. lacteus* fue capaz de decolorar hasta el 92% (520 mg mL^{-1}) después de 60 días de cultivo, el porcentaje de decoloración más alto alcanzado entre los cinco hongos ensayados en ese período.

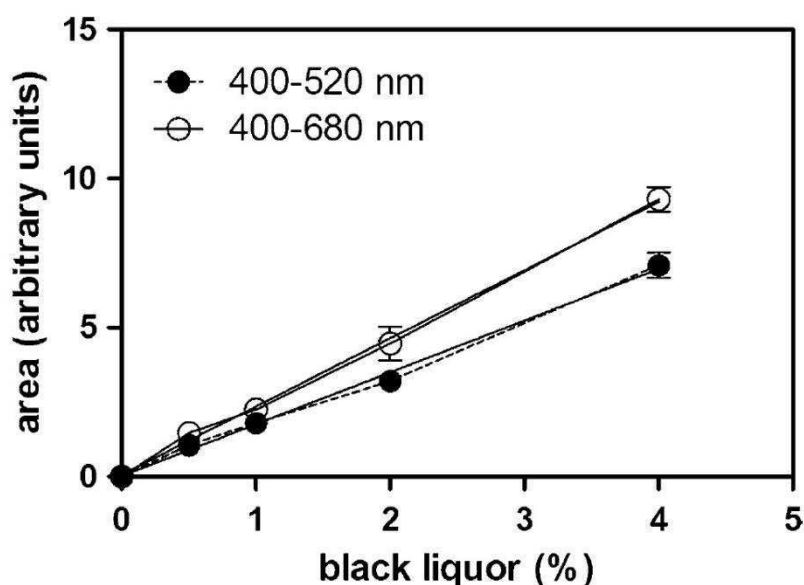


Fig.L 1 Regresión lineal de las áreas medidas versus concentración de licor negro.

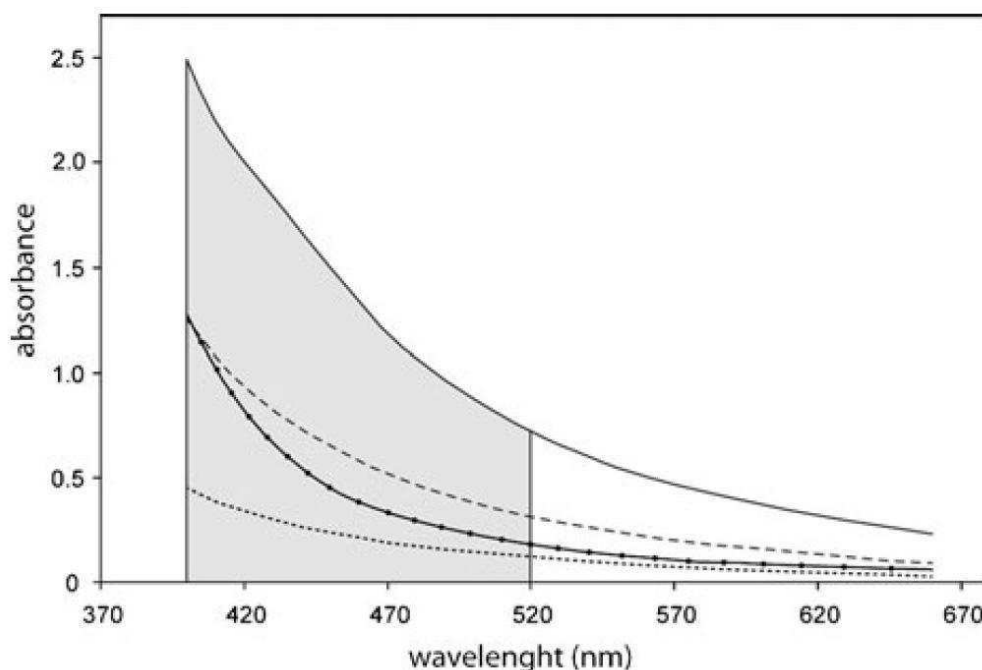


Fig. L 2: Área bajo la curva espectral (AUC) de las siguientes concentraciones de licor negro: Línea sólida: 4%; línea discontinua: 2% línea punteada 0.5%. Como un ejemplo de la curva espectral del licor negro decolorado (cepa 2122 luego de 60 días de incubación en medio MG con LN 4%)(círculos). El área gris indica la región seleccionada como el área representativa para calcular la decoloración efectuada por el hongo.

Actividades ligninolíticas

Durante los diferentes experimentos, se detectó actividad lacasa en todas las cepas, pero no se detectaron ni actividades LiP ni MnP. Se observaron valores similares y baja producción de lacasa para todos los hongos (Tabla L.3). Los valores más altos se obtuvieron después de 60 días de cultivo en *C. antarcticus* y *P. sanguineus* en medios conteniendo el 2% y el 4% de licor negro respectivamente.

Tabla L 2 Porcentajes de decoloración a los 15 y 60 días por las cinco cepas seleccionadas usando dos concentraciones de licor negro (2% y 4% [v/v]) en fermentación de estado sólido con MG o AG como medio nutritivo.

Cepa	AG 4%		AG 2%		MG 4%		MG2%	
	15 d	60 d	15 d	60 d	15 d	60 d	15 d	60 d
<i>C. antarcticus</i>	37.27	44.00	ND	ND	32.00	88.52	35.36	76.53
<i>I. lacteus</i>	15.82	42.69	17.38	39.09	29.36	91.86	30.95	87.64
<i>P. sordida</i>	23.80	33.69	56.13	52.29	55.59	60.08	60.43	85.24
<i>P. sanguineus</i>	21.11	19.77	20.24	18.68	6.14	82.03	34.31	72.91
<i>L. elegans</i>	39.25	31.96	53.18	56.56	ND	ND	17.59	70.06

Los valores son la media de tres repeticiones independientes, SD <5%. Dado que los datos de decoloración a los 30 días fueron similares pero inferiores a los observados a los 60 días, estos datos no se muestran. ND no detectada.

Tabla L 3 Producción de lacasa (U g⁻¹ vermiculita) a los 15 y 60 días por las 5 cepas seleccionadas durante la decoloración de 2 concentraciones de licor negro (2% y 4% [v/v]) bajo condiciones de fermentación de estado sólido con MG o AG como medio nutritivo.

Cepa	AG 4%		AG 2%		MG 4%		MG2%	
	15 d	60 d	15 d	60 d	15 d	60 d	15 d	60 d
<i>C. antarcticus</i>	1.29	3.49	0.96	5.41	1.18	2.14	0.95	2.55
<i>I. lacteus</i>	0.5	0.80	0.33	0.52	1.42	2.22	0.56	3.22
<i>P. sordida</i>	0.45	0.77	0.32	0.38	1.55	1.94	0.72	2.22
<i>P. sanguineus</i>	1.26	3.99	0.55	1.77	0.86	2.38	0.75	2.41
<i>L. elegans</i>	ND	0.64	ND	ND	0.92	2.49	0.75	1.8

Los valores son la media de tres repeticiones independientes, SD <5%. ND no detectada

Discusión

Una de las fuentes más importante de contaminación entre las diferentes etapas de la fabricación de papel es la fabricación de pulpa, que genera licor negro, un efluente recalcitrante. Si bien en las plantas modernas de fabricación de papel se prefiere recuperar el licor negro quemándolo para abaratar costos de energía, no todas las plantas trabajan con este sistema y además en las que si lo hacen, desgraciadamente pueden ocurrir accidentes que producen fugas de este material, convirtiéndose en un contaminante recalcitrante, de muy difícil degradación y que por su coloración oscura así como por su elevado pH, afecta gravemente la vida acuática. El problema más importante que la industria papelera debe enfrentar hoy, es la disposición de enormes volúmenes de agua contaminada con sólidos disueltos como cloruros y sulfitos, iones como calcio y sodio, compuestos orgánicos suspendidos a los que se suman trazas de metales como el mercurio, el plomo y el cromo. Si bien tanto el pulpado como el blanqueo generan efluentes coloreados, el proceso de pulpado es el más contaminante (Srivastava and Singh, 2015).

La constitución del licor negro varía dependiendo de las condiciones de pulpado así como de la materia prima utilizada., este efluente contiene pequeños fragmentos de madera suspendidos, componentes de madera solubilizadas (predominantemente lignina) y sales. En nuestro caso, trabajamos con licor negro de pino con lo que además se encontrarían presentes también lípidos provenientes de las resinas. Las características generales de las aguas residuales de la fabricación de papel fueron resumidas por Pokhrel and Viraraghavan (2004).

Puesto que la alta concentración de sales en el licor negro Kraft utilizado en este trabajo inhibió el crecimiento de todos los hongos ensayados, la eliminación de las sales presentes en este efluente resulta un prerrequisito para intentar su biodegradación. Con este propósito, el uso de membranas en el proceso de tratamiento de aguas residuales y aguas subterráneas que contienen iones metálicos tóxicos ha demostrado ser una técnica adecuada. Afortunadamente, estos procesos de dializado están siendo investigados y mejorados para fines similares (Arthanareeswaran et al., 2007).

Los experimentos de decoloración mostraron diferentes patrones de alteración de este efluente que probablemente estén asociados a las estrategias fisiológicas alternativas de cada cepa a la hora de enfrentarse al licor negro. Así, algunas cepas como *L. elegans* BAFC 2127 inician la decoloración del licor negro

con ligero retraso con respecto al crecimiento, mientras que otros como *C. antarcticus* BAFC 266 comienzan la decoloración rezagada con respecto a la llegada del micelio al borde de la placa, dando un patrón de desteñido que se extiende principalmente desde la periferia al centro. Otras placas exhibieron un halo oscuro, probablemente debido a productos de polimerización fenólicos, que aparecía antes de que ocurriera la decoloración (Fig. L.3). Font et al (2003) también observaron substancial polimerización y la formación de compuestos oligoméricos y de alto peso molecular cuando trataron el licor negro con *T. versicolor*. Actividades de polimerización similares llevadas a cabo por la lacasa también se reportaron cuando se utilizó lignina ultra-filtrada de licor negro (Elegir et al., 2007). Estos dos pasos secuenciales, oscurecimiento seguido de decoloración, sugirieron que al menos dos reacciones pueden ocurrir antes de poder observar la decoloración. En trabajos previos, analizando la capacidad de degradación en placa de diferentes colorantes, otros autores ya encontraron diferencias entre géneros, entre especies e incluso intraespecíficas, entre el halo de crecimiento y el de decoloración, sugiriendo también diferencias fisiológicas (Freitag and Morrell, 1992; Levin et al., 2004).

Al tratarse de LN proveniente del pulpado de madera de coníferas, se debe tener en cuenta la presencia de otras moléculas además de la lignina. Dado el rol protector frente al ataque de biodegradadores de las resinas ácidas y otros extractivos (Makris, 2004), sensibilidades diferenciales a estos compuestos también podrían estar implicadas en la variedad de patrones de decoloración. Este punto deberá ser elucidado con estudios bioquímicos en el futuro.

La eliminación casi completa de las principales áreas de absorbancia de luz visible observada después del tratamiento con los hongos seleccionados sugiere una degradación de todas las moléculas cromogénicas contenidas en el licor negro. Aunque los hongos pueden ser capaces de decolorar tintes, la mineralización de ellos es incierta; ya que la decoloración implica, al menos, la degradación o destrucción de la molécula cromogénica, mientras que la mineralización implica la degradación a dióxido de carbono y agua (Knapp et al., 1995; Knutson, 2004). A diferencia de lo que ocurre al estudiar la eliminación de algunos colorantes, en donde se puede seguir este proceso midiendo una longitud de onda determinada para estimar cuantitativamente la decoloración, un problema serio surge, cuando se busca analizar la decoloración de las mezclas complejas de moléculas cromogénicas en donde una longitud de onda única, carece de representatividad. En este estudio, de acuerdo con otros

metodologías relevadas en la bibliografía (Knutson, 2004; Knutson et al., 2005; Faraco et al., 2009), se estimaron los porcentajes de decoloración de la zona de las curvas espectrales en el rango del visible; estas medidas deberían ser más representativas ya que se consideró la decoloración del conjunto de las moléculas cromogénicas.

Además de la decoloración por hongos de pudrición blanca, también se ha propuesto la adsorción del licor negro a materiales lignocelulósicos como metodología de biorremediación de este efluente (Norgren and Bergfors, 2005), pero una limitación habitual de ese procedimiento reside en el depósito final de los sólidos utilizados (Grover et al., 1999). El tratamiento anaeróbico del licor negro también fue propuesto por varios autores (Schnell et al., 1992; Rajeshwari et al., 2000; Pokhrel and Viraraghavan, 2004). Sobre la base de los porcentajes de decoloración obtenidos (hasta 92%) por los hongos probados, la decoloración de efluentes por hongos de pudrición blanca podría ser una alternativa atractiva o bien un complemento de las tecnologías existentes, tales como adsorción, precipitación, y el uso de membranas de filtración. Numerosas investigaciones han mostrado que los hongos de pudrición blanca son capaces de decolorar efluentes de la industria papelera. Muchas de estas investigaciones están centradas en los efluentes provenientes del proceso de blanqueado de la pulpa, que contiene muchas menos moléculas cromogénicas que los que provienen del pulpado. Entre los hongos utilizados, *T. versicolor* ha alcanzado una reducción de color del 92% (Bergbauer et al., 1991). En términos de la cantidad de lignina decolorada, los valores obtenidos por las cinco cepas ensayadas en este trabajo fueron los más altos obtenidos hasta la fecha (hasta 5,2 g L⁻¹ observada en los cultivos de *I. lacteus* y *C. antarcticus*).

Se han realizado algunos estudios sobre la optimización de la producción de enzimas ligninolíticas de hongos de pudrición blanca con miras a mejorar los procesos de decoloración del licor negro (Marwaha et al., 1998; Raghukumar and Rivonkar, 2001). El rol de las enzimas ligninolíticas en procesos de decoloración de este efluente, aún no ha sido establecido. Font et al. (2003) comprobaron que *T. versicolor* no produjo ni LiP ni MnP, aunque sí lacasa, en cultivos que contenían licor negro proponiendo entonces a la lacasa como la enzima responsable de la detoxificación observada. En concordancia con este trabajo, ninguno de los hongos ensayados produjo peroxidasa y la única enzima ligninolítica detectada fue la lacasa. Existe una vasta bibliografía que reseña la capacidad de los mediadores redox para expandir el rango de

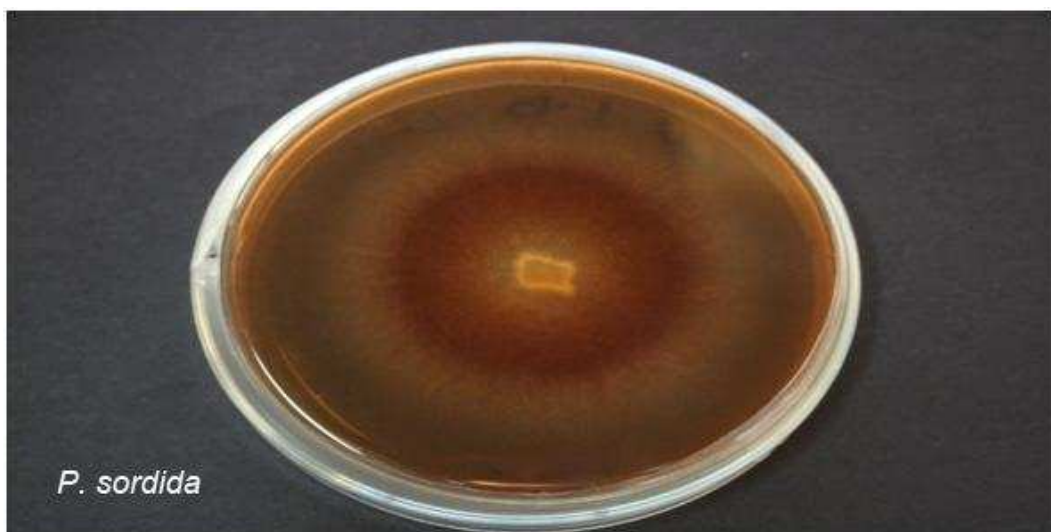
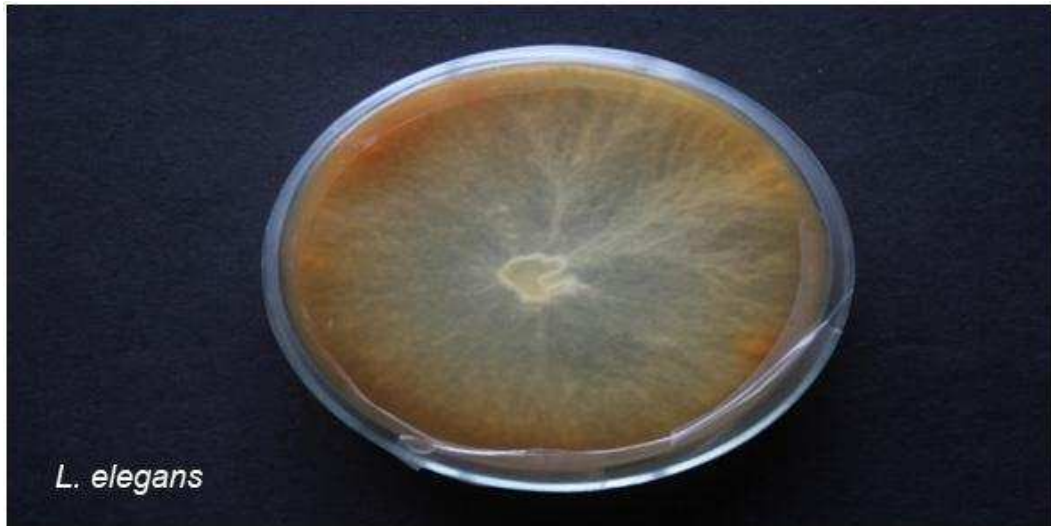


Fig. L 3 Placas de Petri mostrando los distintos patrones de decoloración del licor negro encontrados. a *L. elegans* mostrando decoloración concomitante con el crecimiento del micelio. b *P.sordida* exhibiendo halo oscuro. c *C.antarcticus* mostrando decoloración desde el borde de la placa hacia el centro.

sustratos de la lacasa. En presencia de estos compuestos, la enzima puede oxidar a los compuestos aromáticos no fenólicos que representan el 80% del polímero de lignina. Por lo tanto, las discrepancias aparentes observadas después de comparar las actividades lacasa y los correspondientes porcentajes de decoloración en los medios AG y MG (la mayor actividad lacasa se observó en las cepas BAFC 266 y BAFC 2126, pero el porcentaje de decoloración resultó bajo) podría explicarse no sólo en términos de los títulos de actividad lacasa, sino también debido a la presencia o ausencia de mediadores de origen natural en el extracto de malta o probablemente a los producidos por el mismo hongo.

Evaluación de la capacidad de decolorar licor negro no dializado.

Materiales y métodos

Organismos

A los hongos utilizados en la primera etapa se sumaron *T. trogii* (BAFC 463), *P. brevispora* (BAFC 633), *Corioloopsis floccosa* (BAFC 2101), *T. villosa* (BAFC2755) y una cepa de *Laetiporus sulphureus* (MEX 31227).

Todas las cepas están depositadas en la Colección de cultivos de la Universidad de Buenos Aires (BAFC). Los cultivos stock se mantuvieron en medio extracto de malta (1,2%), agar (2%) en tubos pico de flauta a 4°C con transferencia periódica.

Decoloración en placa con medios agarizados usando LN sin dializar.

Se prepararon los medios MG con dos tipos de licor negro sin dializar al 4% (uno proveniente de laboratorio y el otro de origen industrial) y se los llevó a pH 6 con ácido cítrico 1M. Se sembraron inóculos de 25mm² provenientes de placas de medio MG de 10 días de crecimiento. Placas no inoculadas sirvieron como controles para estimar la posible existencia de decoloración abiótica. Las placas se incubaron a 28°C durante 45 días. La medición de color se llevó a cabo el día 30.

Para asegurar que las diferencias de nivel de decoloración no se debieran a diferencias de espesor, el contenido de medio de cada placa (25 ml) se autoclavó individualmente. La medición de los cambios de coloración se realizó usando un espectrofotómetro esférico portátil ColorMunki (D65) (10 mediciones aleatorias por placa).

Decoloración en medio líquido.

Se sembraron inóculos provenientes de placas en medio MG del *L. elegans* y *L. sulphureus* en medios malta que contenía licor negro al 4% y se ajustó el pH a 6 con ácido cítrico 1M.

Se evaluaron tanto el LN1 como el LN2. Cada Erlenmeyer contenía 50 ml de medio y 1 g. de cubos de esponja de poliuretano dispuestos para dar soporte a los hongos. Los Erlenmeyers se mantuvieron a 28°C con agitación de 100 revoluciones por minuto durante 60 días. El cambio de color se determinó comparando los espectros obtenidos y midiendo las áreas bajo las curvas usando el programa ImageJ.

Resultados y discusión

Una de las demandas que la sociedad le hace a la industria papelera está vinculada con la reducción de los volúmenes de agua que consume, teniendo en cuenta este aspecto se avanzó en búsqueda de un modo de contribuir al proceso de degradación de este efluente sin aplicar un paso de diálisis previa.

Las características del licor negro dependen de gran número de variables: de la materia prima empleada, de las condiciones del pulpado, del equipamiento usado, del tratamiento que se le dé después del pulpado, etc. Las propiedades del LN no son constantes tampoco temporalmente, ya que van cambiando a medida que éste fluye por los digestores. (Vakkilainen, 2000). Por ese motivo en esta etapa se evaluaron dos variedades de licor negro, provenientes de distintas fuentes, ambas producto de cocción de madera de *P. taeda*, una proveniente de laboratorio (LN1) y la otra de origen industrial (LN2).

Dado que a partir de los resultados previos no se pudo establecer una vinculación directa entre la decoloración del efluente y la actividad lacasa, (Tablas L.2 y L.3), resultados que coinciden con los obtenidos por Fonseca et al. (2015), se decidió evaluar en esta etapa a otros hongos no incluidos previamente: *T. trogii* (BAFC 463), *C. floccosa*, (BAFC 2101), *T. villosa* (2755), y *L. sulphureus* (MEX 31227).

El avance de los estudios sobre los efluentes de la industria papelera permitió reconocer que no se trata solamente de derivados del proceso industrial sino que por el contrario, muchos de los componentes tóxicos para el medioambiente forman parte constitutiva de la materia prima que pasa a ser liberada en el proceso de fabricación de pulpa. Algunos de los extractivos, como

el β sitosterol y el estigmasterol tienen la capacidad de unirse a receptores de estrógenos afectando las funciones reproductivas de los alevinos de trucha arcoíris (Ratia et al., 2013). Algunos extractivos de la madera son altamente hidrofóbicos por lo que tienden a ser absorbidos por los sedimentos siendo accesibles para la fauna bentónica.

El licor negro que se utilizó proviene del procesamiento de *P. taeda* que es una especie con alta concentración de extractivos liposolubles. Estudios realizados sobre seis especies diferentes de árboles usados en la producción de papel: *P. taeda*, *Pinus sylvestris* var. *silvestris*, *Picea abies*, *Larix sibirica*, *Betula pendula* y *Pinus palustris* encontraron que *taeda* y *silvestris* son los que contienen la mayor concentración de extractivos lipofílicos (Vikström et al., 2005). Dentro de los extractivos lipofílicos, además de los nombrados en la primera parte de este capítulo se ha registrado la presencia de disruptores hormonales. Un estudio evaluó efluentes y se pudo verificar la existencia de progesterona, androstenediona, y androstadiendiona en el agua y los sedimentos del río Fenholloway (Taylor County, FL, EE.UU.), un río que contiene poblaciones de peces mosquito hembra masculinizadas aguas abajo de una fábrica de papel, a niveles más altos que los encontrados río arriba. Los esteroides vegetales, tales como beta-sitosterol presentes en efluente de la planta derivados de la madera de *P. taeda*, se sugirieron como posibles precursores metabólicos bacterianos de progesterona y andrógenos que resultarían causantes del fenómeno de masculinización. Sin embargo, estudios realizados sobre la madera de *P. taeda* hallaron concentraciones de progesterona de 49.34 +/- 4.1 nmol/g de madera madura seca y concentraciones menores en acículas y corteza, lo que sugiere que niveles naturales de progesterona en la materia prima resultan en los elevados niveles río debajo de la fábrica de pulpa, pudiendo servir como precursores naturales de andrógenos responsables de la masculinización de las hembras de pez mosquito (Carson et al., 2008).

Hasta este momento se habían testeado exclusivamente hongos de pudrición blanca, pero atendiendo a que la materia cruda de origen pertenece a coníferas, y que como señala Schwarze (2007) la correlación entre los hongos de pudrición castaña y las coníferas coincide con la distribución predominante de hongos de pudrición castaña en el hemisferio norte en donde parecen haberse adaptado a las coníferas ya que son sus descomponedores predominantes (Gilbertson, 1980). Esta vinculación entre hongos de pudrición castaña y coníferas en América del norte, cuenta con descripciones ya mencionadas en

1930. *L. sulphureus*, es un hongo de pudrición castaña, que se encuentra registrado como uno de los principales patógenos de especies como *Larix occidentalis* y *Pseudotsuga taxifolia* (Boyce et al., 1930). Esta asociación de *L. sulphureus* con las coníferas permite pensar en la posibilidad de que este hongo sea capaz de tolerar aquellos extractivos lipofílicos potencialmente tóxicos y por ese motivo se incluyó una cepa de esta especie en esta etapa.

Tabla L 4 Tasas de crecimiento y decoloración en 2 medios agarizados conteniendo 2 variedades de licor negro 1= licor negro producido en condiciones de laboratorio, 2 licor negro industrial. Concentración 4% v/v.

Cepa	Tipo de Licor negro	Tasa de crecimiento (cm/día)	Tasa de decoloración (cm/día)	ΔL^* (Cultivo de 30 días de edad)
<i>Coriolus antacticus</i>	1	0.83	0.34	3.17
BAFC 266	2	0.83	0.66	33.03
<i>Trametes trogii</i>	1	0.36	0.22	0.83
BAFC 463	2	0.43	0.36	1.9
<i>Phanerochaete sordida</i>	1	nd	nd	1.97
633	2	nd	nd	-2.37
<i>Irpex lacteus</i>	1	0.77	0.5	1.9
1171	2	0.76	0.5	12.17
<i>Coriolopsis floccosa</i>	1	nd	0.5	3.17
2101	2	0.76	0.5	10.04
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	1	0.76	0.5	13.17
2126	2	0.76	0.5	36.3
<i>Lenzites elegans</i>	1	0.76	0.66	7.9
2127	2	0.76	0.66	35
<i>Trametes villosa</i>	1	0.72	0.5	1
2755	2	0.72	0.5	8.4
<i>Laetiporus sulphureus</i>	1	0.83	0.5	13.1
MEX 31227	2	0.83	0.5	43.37

Los crecimientos más notables se observaron en *C. antarcticus* y *L. sulphureus*. Todas las cepas que crecieron lograron algún nivel de decoloración. Los niveles máximos correspondieron a *L. sulphureus*, *P. sanguineus* y *L. elegans*.

Se seleccionó a *L. sulphureus* que mostró una diferencia de valores de luminancia de 43 puntos con respecto al blanco y a *L. elegans*, que si bien alcanzó un punto menos de diferencia con *P. sanguineus*, resultó más veloz a la hora de decolorar al efluente, lo que se constata con una tasa de decoloración ligeramente superior, para la etapa siguiente en la cual se sembraron inóculos de ambos en Erlenmeyers con 50 ml de medio malta que contenía licor negro al 25% y 1 g de cubos de esponja de poliuretano dispuestos para dar soporte a los hongos, y se ajustó el pH a 6 con ácido cítrico 1M. Los Erlenmeyers se mantuvieron a 28°C con agitación de 100 revoluciones por minuto durante 60 días. El cambio de color se determinó comparando los espectros obtenidos y midiendo las áreas bajo las curvas usando el programa Image J. Se midió la absorbancia en el espectro visible entre 700 y 400 nanómetros y se encontró muy escasa disminución del color en el caso de *L. sulphureus*, pero con *T. elegans* la pérdida de color estuvo en el 70%. En el caso de las mediciones en ultravioleta, el medio con *L. sulphureus* no mostró cambios significativos, mientras que el espectro correspondiente a *T. elegans* mostró un 50% de disminución. Estos resultados permiten pensar en *T. elegans* como un candidato posible para usar en estrategias de biorremediación del licor negro.



Licor negro sin inocular
placa control



Laetiporus sulphureus



Lenzites elegans

Fig L 4. Fotografía de las placas de petri coneniendo LN 1:25. Fotos tomadas al día 45 de cultivo. Las placas contenían medio MG con licor negro industrial 1:25 (v/v)

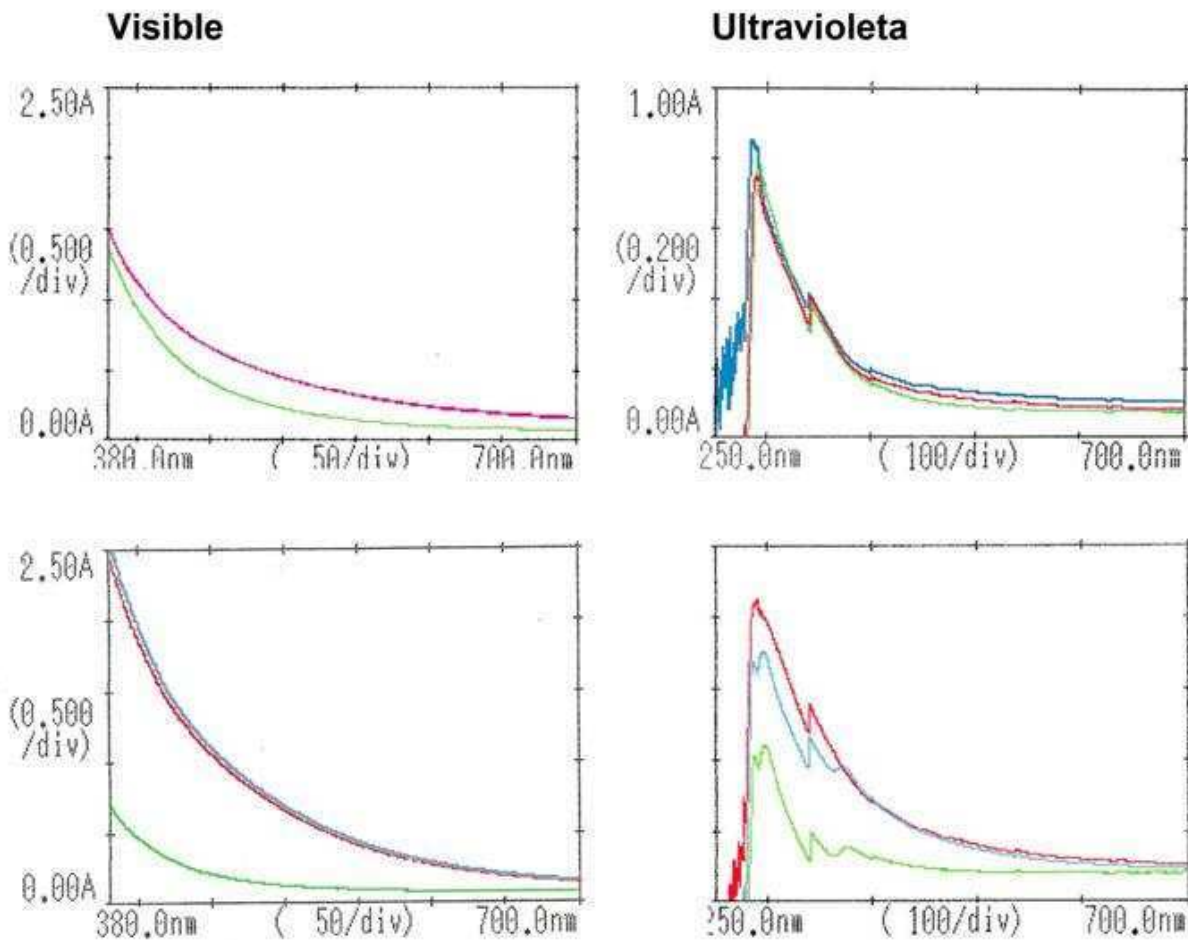


Figura L5: Fila superior corresponde a licor negro producido en laboratorio, la hilera inferior corresponde al licor negro industrial. Sector izquierdo corresponde a la medición en la región visible del espectro mientras que el sector derecho corresponde a la medición de la región ultravioleta. (Los términos visible y ultravioleta hacen referencia a la región del espectro cuantificada, no a la graficada). Para las mediciones en el rango del visible el licor negro se diluyó 1:25 (v/v), mientras que para el UV se diluyó 1:100 (v/v). Línea azul corresponde al blanco sin tratamiento fúngico; línea roja *L. sulphureus*; línea verde *L. elegans*. La línea magenta se utilizó para el caso en el que las curvas del blanco y de *L. sulphureus* fueron idénticas.

Tabla L 5: Porcentaje de variación de la absorbancia en muestras de dos variedades de licor negro en fermentación en medio líquido malta con licor negro al 4% inmovilizadas sobre esponja de poliuretano

	Porcentajes de variación de la absorbancia medida en unidades arbitrarias			
	Ultravioleta		Visible	
	LN 1	LN2	LN1	LN2
<i>L sulphureus</i>	20.32	26.15*	0	8.2
<i>L elegans</i>	21.87	56.89	44.33	78.4
BAFC 2127				

Los porcentajes de variación están calculados como unidades arbitrarias medidas en función de la disminución del área espectral. Concentración inicial del LN 4% (v/v). * indica que ese valor es un aumento de la absorbancia, mientras en el resto de los casos se trató de descensos.

Trabajar con licor negro no resulta fácil, y dadas sus características organolépticas tampoco es agradable. Se trata de una mezcla compleja, cuya composición varía de un proceso de fabricación a otro, y de un momento de la fabricación al que sigue. El efluente tal cual, resulta altamente tóxico para los hongos y se mueren al entrar en contacto con él si no se lo modifica dializándolo o disminuyendo su pH. Algunas pruebas son imposibles de realizar, por ejemplo no se puede medir la actividad lacasa con ABTS en medios que lo contengan ya que oxida al sustrato sin necesidad de presencia enzimática. No se pueden medir proteínas con Bradford por motivos similares. No se puede saber que parte de la mezcla se adsorbe a un sustrato, por lo que no se pueden usar medios que lo capturen para hacer fermentación en estado sólido. Además los datos bibliográficos sobre las moléculas presentes en el licor negro suelen ser escasos.

Las tasas de crecimiento encontradas en este trabajo para el licor negro dializado y sin dializar (en aquellas cepas que se repiten) muestra un crecimiento más lento en el segundo. Este resultado permite suponer que moléculas que lograron atravesar la membrana podrían tener algún efecto tóxico sobre los hongos.

Entre los hongos evaluados con el LN sin dializar, *C. antarcticus* (BAFC 266) y *L. sulphureus* fueron los que mostraron mayor tasa de crecimiento, mientras que *P. sordida* (BAFC 2122) no logró crecer más allá del desarrollo de hifas sobre la zona del inóculo, alejadas del medio con el efluente.

L. elegans (BAFC 2127) mostró un comportamiento eficiente de decoloración en todas las condiciones propuestas salvo medio AG. La estabilidad de esta performance, lo vuelve un candidato sumamente atractivo a la hora de pensar en la utilización de esta cepa en estrategias de biorremediación de efluentes altamente variables como el licor negro. *C. antarcticus* (BAFC 266) y *P. sanguineus* (BAFC 2126) compartieron en gran medida este comportamiento homogéneo. La existencia de varios hongos con estas características, torna más viable el uso de estrategias fúngicas de bioremediación ya que amplía el abanico de posibilidades para enfrentar a aquellos efluentes que constituyan mezclas complejas y variables, habilitando además la posibilidad de usarlos de manera secuencial.

A pesar del admirable resultado obtenido en el medio agarizado, *L. sulphureus* no repitió ese comportamiento en medio líquido. Con el LN2, se observa que en la región del UV, el área bajo la curva del tratamiento con hongo es superior a la del blanco cuya curva acompaña sólo parcialmente, esto podría deberse a la ausencia de degradación de lignina o de fragmentos aromáticos solubles que se detectan a los 280 nm (Reina et al., 2013), a pesar de que estudios anteriores registraron una actividad ligninolítica modesta en esta especie (Ferraz et al., 2001). El escaso grado de acompañamiento entre ambas curvas podría estar indicando la presencia de moléculas de síntesis fúngica. Si bien *L. sulphureus* es un conspicuo productor de sustancias pigmentadas tanto carotenoides (Valadon and Mummery, 1969) como no carotenoides (pigmentos poliénicos) (Davoli et al., 2005) como los ácidos laetipóricos A, B y C y el ácido 2-dehidro-3 deoxilaetipórico, en la zona del visible, las curvas correspondientes al hongo acompañan casi a la perfección a la curva del blanco de LN, no evidenciando ningún tipo de decoloración ni de producción de pigmentos que sea significativa en el contexto de coloración del licor negro. Sin embargo con el LN1, la disminución del área bajo la curva es comparable a la de *L. elegans*, algo que pone en evidencia la escasa predictibilidad de las interacciones hongo-efluente.

La decoloración de mezclas complejas y variables (licor negro, molasas, petróleo, etc.) requiere disponibilidad de herramientas flexibles que puedan

actuar en un rango amplio de variación. En este trabajo, de las 10 cepas probadas, 3 fueron capaces de degradar al licor negro en varias de las condiciones ensayadas. Otra cepa de *C. antarcticus* ha sido testada para la degradación de otra mezcla compleja: las molasas de la industria azucarera (Aoshima et al., 1985), mientras que otro de *P. sanguineus* ha sido aislado de suelos contaminados con 30 000 ppm de crudo. (González et al., 2008). Todo esto permite pensar que se trata de tres cepas a ser tenidas en cuenta a la hora de diseñar estrategias de biorremediación de mezclas complejas.

Dado que las diferentes condiciones de pulpado, incluidos el tipo de madera utilizado y el tratamiento efectuado, afectan la composición del licor negro, existen varios parámetros como producción de enzimas, estrategias de cultivo etc., que deberían ser estudiados en un esfuerzo para desarrollar tratamientos exitosos.

6. Discusión final y conclusiones

Si un observador de la civilización humana analizara el rol de los materiales en nuestra cultura, podría concluir sin demasiado temor al desacierto que somos la civilización de la lignocelulosa, ya que buena parte de nuestra existencia se encuentra rodeada por ella. Los materiales lignocelulósicos forman parte de nuestras viviendas, nuestros muebles, nuestros utensilios, de la dieta de nuestro ganado, etc. Nos vería ligados a la celulosa desde los tiempos del antiguo Egipto hasta ahora. Con celulosa nos vestimos, nos secamos, transmitimos nuestra cultura, sobre ella escribimos nuestra historia, documentamos nuestros actos, elegimos a nuestros representantes y con ella mediamos nuestras transacciones comerciales. Excluyendo a las moléculas que nos constituyen o forman parte de nuestro metabolismo, ninguna molécula está tan ubicuamente vinculada con nosotros. Este entramado histórico que tenemos con los materiales lignocelulósicos, ha tomado de un tiempo a esta parte un renovado y espectacular impulso. Empujado por la noción cada vez más clara de la necesidad de moverse hacia modos de producción que generen menor daño ambiental, la premura por acceder a recursos energéticos renovables, las necesidades soberanas de países no productores de energía de combustible fósil de alcanzar el autoabastecimiento energético, el requerimiento de nuevos materiales y el precio del barril de petróleo por encima de los 120 dólares hasta hace poco tiempo, ha aportado interés para generar una mirada atenta sobre la biomasa y sus posibilidades. La lignocelulosa es un material generoso que ofrece una amplísima gama de posibilidades, pero no las entrega con facilidad. Su elevada complejidad estructural la vuelve un material recalcitrante de muy difícil separación, un paso clave para industrias como la papelera y también para cualquier otra que quiera aprovechar a los componentes de la biomasa por separado es conocer y disponer de enzimas capaces de llevar a cabo esta separación. En este punto, los hongos degradadores de la madera y sus complejos enzimáticos tienen un altísimo potencial para posicionarse como herramientas vitales para poner en disponibilidad moléculas de interés. Por tratarse en muchos casos de exoenzimas altamente glicosiladas capaces de enfrentar las dificultades e irregularidades del medio extracelular, su utilización industrial se ve favorecida. En el ámbito de la industria papelera, los hongos pueden resultar útiles en distintos pasos de la fabricación de papel, e incluso anteriores a ésta, ya que algunos inoculados en el árbol en pie, pueden mejorar el descortezado (Singh et

al., 2010). En este trabajo se investigó su posible utilización en tres etapas de la fabricación de pulpa y papel propiamente dichas: biopulpado, bioblanqueo y degradación de efluentes. Se comenzó relevando la capacidad de cepas argentinas de hongos causantes de pudrición blanca para degradar diferentes colorantes industriales; los más eficientes se probaron en procesos de biopulpado. Se seleccionó una cepa de *P. sanguineus* (BAFC 2126) que redujo el contenido de lignina en la madera de *P. taeda* en un 11% en 14 días de tratamiento, e incrementó su porosidad en un 15%. Ambos efectos combinados producen un incremento en la velocidad de reacción, lo que se traduce en un tiempo de cocción más corto o la posibilidad de disminuir la dependencia de químicos en el pulpado Kraft, con la consecuente reducción en el impacto ambiental. También se obtuvieron resultados promisorios mediante una secuencia de bioblanqueo que involucró crudos enzimáticos de *T.trogii* (BAFC 463) y peróxido de hidrógeno y se optimizaron distintos parámetros que afectan dicho proceso, utilizando diseños experimentales estadísticos orientados a aumentar la luminancia y disminuir la pérdida de masa del papel resultante, logrando una luminancia superior al 94%, con una pérdida de masa inferior al 5% en un proceso a temperatura ambiente que no requirió del agregado de mediadores de actividad ligninolítica lacasa que tienen un costo elevado y son potencialmente tóxicos. En cuanto al licor negro, un efluente recalcitrante de abordaje dificultoso, de los 10 cepas evaluadas, tres de ellas: *L. elegans* (BAFC 2127), *P. sanguineus* (BAFC 2126) y *C. antarcticus* (BAFC 266) mostraron capacidad de decolorarlo en varias de las condiciones ensayadas. Se encontraron condiciones de cultivo que permitieron trabajar sin necesidad de consumir agua para el dializado y se consiguieron elevados niveles de decoloración en torno al 90% con *I. lacteus* (BAFC 1171) en el caso del licor negro industrial dializado y del 78% en el caso de *L. elegans* usando licor negro industrial sin dializar.

Desde los inicios de la investigación sobre la factibilidad de utilizar a los hongos lignocelulolíticos en la industria papelera, la exploración estuvo centrada fuertemente en dos Basidiomycota: *P. chrysosporium* y *C. subvermispora*. Resulta interesante investigar nuevos organismos que puedan presentar características más beneficiosas para su aplicación en la industria papelera. Uno de los aspectos valiosos de este trabajo, fue el estudio de 36 nuevas cepas de Basidiomycota degradadoras de madera provenientes de la República Argentina. Como resultado de la investigación realizada se identificaron algunas cepas que mostraron buenas perspectivas para ser

utilizadas en tres etapas diferentes durante la industrialización de la pulpa y el papel.

7. Referencias

- Abdel-Hamid, A.M., Solbiati, J.O., and Cann, I.K. (2013). Insights into lignin degradation and its potential industrial applications. *Adv Appl Microbiol* 82, 1–28.
- Agosin, E., Blanchette, R.A., Silva, H., Lapierre, C., Cease, K.R., Ibach, R.E., Abad, A.R., and Muga, P. (1990). Characterization of palo podrido, a natural process of delignification in wood. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 65–74.
- Akhtar, M., Scott, G.M., Swaney, R.E., and Shipley, D.F. (2000). Biomechanical pulping: a mill-scale evaluation. *Resour. Conserv. Recycl.* 28, 241–252.
- Altıparmak, D., Keskin, A., Koca, A., and Gürü, M. (2007). Alternative fuel properties of tall oil fatty acid methyl ester–diesel fuel blends. *Bioresour. Technol.* 98, 241–246.
- Aoshima, I., Tozawa, Y., Ohmomo, S., and Ueda, K. (1985). Production of decolorizing activity for molasses pigment by *Coriolus versicolor* Ps4a. *Agric. Biol. Chem.* 49, 2041–2045.
- Arantes, V., and Milagres, A.M.F. (2007). The synergistic action of ligninolytic enzymes (MnP and Laccase) and Fe³⁺-reducing activity from white-rot fungi for degradation of Azure B. *Enzyme Microb. Technol.* 42, 17–22.
- Archibald, F.S. (1992). A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye azure B. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3110–3116.
- Area, M. (2005). Tecnologías limpias para la producción de pulpa y papel de Eucalyptus. XX Jorn. For. Entre Ríos.
- Arthanareeswaran, G., Thanikaivelan, P., Jaya, N., Mohan, D., and Raajenthiren, M. (2007). Removal of chromium from aqueous solution using cellulose acetate and sulfonated poly (ether ether ketone) blend ultrafiltration membranes. *J. Hazard. Mater.* 139, 44–49.
- Backa, S., Gierer, J., Reitberger, T., and Nilsson, T. (1993). Hydroxyl radical activity associated with the growth of white-rot fungi. *Holzforsch.-Int. J. Biol. Chem. Phys. Technol. Wood* 47, 181–187.
- Bajpai, P. (1999). Application of enzymes in the pulp and paper industry. *Biotechnol. Prog.* 15, 147–157.
- Bajpai, P. (2004). Biological bleaching of chemical pulps. *Crit. Rev. Biotechnol.* 24, 1–58.
- Bajpai, P. (2011). *Biotechnology for pulp and paper processing* (Springer Science & Business Media).
- Bajpai, P. (2012). Biological treatment of pulp and paper mill effluents. In *Biotechnology for Pulp and Paper Processing*, (Springer), pp. 211–261.
- Baldrian, P., and Gabriel, J. (2002). Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 206, 69–74.

- Bao, W., Fukushima, Y., Jensen, K.A., Moen, M.A., and Hammel, K.E. (1994). Oxidative degradation of non-phenolic lignin during lipid peroxidation by fungal manganese peroxidase. *FEBS Lett.* *354*, 297–300.
- Behrendt, C.J., and Blanchette, R.A. (1997). Biological Processing of Pine Logs for Pulp and Paper Production with *Phlebiopsis gigantea*. *Appl. Environ. Microbiol.* *63*, 1995–2000.
- Bergbauer, M., Eggert, C., and Kraepelin, G. (1991). Degradation of chlorinated lignin compounds in a bleach plant effluent by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *35*, 105–109.
- Bermek, H., Li, K., and Eriksson, K.-E.L. (2002). Studies on mediators of manganese peroxidase for bleaching of wood pulps. *Bioresour. Technol.* *85*, 249–252.
- Blanchette, R.A. (1984). Selective delignification of eastern hemlock by *Ganoderma tsugae*. *Phytopathology* *74*, 153–160.
- Blanchette, R.A., and Reid, I.D. (1986). Ultrastructural aspects of wood delignification by *Phlebia* (*Merulius*) *tremellosus*. *Appl. Environ. Microbiol.* *52*, 239–245.
- Blanchette, R.A., Krueger, E.W., Haight, J.E., Akhtar, M., and Akin, D.E. (1997). Cell wall alterations in loblolly pine wood decayed by the white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*. *J. Biotechnol.* *53*, 203–213.
- Blanquéz, P., Sarrà, M., and Vicent, T. (2008). Development of a continuous process to adapt the textile wastewater treatment by fungi to industrial conditions. *Process Biochem.* *43*, 1–7.
- Boer, C.G., Obici, L., De Souza, C.G.M., and Peralta, R.M. (2006). Purification and some properties of Mn peroxidase from *Lentinula edodes*. *Process Biochem.* *41*, 1203–1207.
- Bourbonnais, R., and Paice, M.G. (1990). Oxidation of non-phenolic substrates: an expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett.* *267*, 99–102.
- Bourbonnais, R., Paice, M.G., Reid, I.D., Lanthier, P., and Yaguchi, M. (1995). Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2, 2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. *Appl. Environ. Microbiol.* *61*, 1876–1880.
- Bourbonnais, R., Paice, M.G., Freiermuth, B., Bodie, E., and Borneman, S. (1997). Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* *63*, 4627–4632.
- Boyce, J.S., and others (1930). Decay in Pacific Northwest conifers. *Yale Univ Osborn Bot Lab Bull.*
- Brändström, J. (2001). Micro-and ultrastructural aspects of Norway spruce tracheids: a review. *Iawa J.* *22*, 333–353.
- Camarero, S., Sarkar, S., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., and Martínez, Á.T. (1999). Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. *J. Biol. Chem.* *274*, 10324–10330.

- Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, M.J., and Martínez, Á.T. (2005). Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Appl. Environ. Microbiol.* *71*, 1775–1784.
- Capek, P., Alföldi, J., and Lišková, D. (2002). An acetylated galactoglucomannan from *Picea abies* L. Karst. *Carbohydr. Res.* *337*, 1033–1037.
- Carson, J.D., Jenkins, R.L., Wilson, E.M., Howell, W.M., and Moore, R. (2008). Naturally occurring progesterone in loblolly pine (*Pinus taeda* L.): A major steroid precursor of environmental androgens. *Environ. Toxicol. Chem.* *27*, 1273–1278.
- Catalán, D.A.P. (2004). Evaluación técnico-económica de la aplicación de hongos de pudrición blanca (HPB) en pulpage kraft. Universidad de Chile.
- Chandra, R.P., and Ragauskas, A.J. (2005). Modification of High-Lignin Kraft Pulps with Laccase. Part 2. Xylanase-Enhanced Strength Benefits. *Biotechnol. Prog.* *21*, 1302–1306.
- Chang, Y., Wang, S., Sekimoto, S., Aerts, A.L., Choi, C., Clum, A., LaButti, K.M., Lindquist, E.A., Ngan, C.Y., Ohm, R.A., et al. (2015). Phylogenomic analyses indicate that early fungi evolved digesting cell walls of algal ancestors of land plants. *Genome Biol. Evol.* *7*, 1590–1601.
- Claus, H. (2004). Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron* *35*, 93–96.
- Collins, P.J., and Dobson, A. (1997). Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* *63*, 3444–3450.
- Colpa, D.I., Fraaije, M.W., and van Bloois, E. (2014). DyP-type peroxidases: a promising and versatile class of enzymes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* *41*, 1–7.
- Da Re, V., Papinutti, L., Villalba, L., Forchiassin, F., and Levin, L. (2008). Preliminary studies on the biobleaching of loblolly pine Kraft pulp with *Trametes trogii* crude extracts. *Enzyme Microb. Technol.* *43*, 164–168.
- Davoli, P., Mucci, A., Schenetti, L., and Weber, R.W. (2005). Laetiporic acids, a family of non-carotenoid polyene pigments from fruit-bodies and liquid cultures of *Laetiporus sulphureus* (Polyporales, Fungi). *Phytochemistry* *66*, 817–823.
- Dill, I., and Kraepelin, G. (1986). Palo podrido: model for extensive delignification of wood by *Ganoderma applanatum*. *Appl. Environ. Microbiol.* *52*, 1305–1312.
- Diouf, P.N., Delbarre, N., Perrin, D., Gerardin, P., Rapin, C., Jacquot, J.P., and Gelhaye, E. (2002). Influence of tropolone on *Poria placenta* wood degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* *68*, 4377–4382.
- Doehlert, D.H. (1970). Uniform shell designs. *Appl. Stat.* 231–239.
- Eggert, C., Temp, U., Dean, J.F., and Eriksson, K.-E.L. (1996). A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Lett.* *391*, 144–148.
- Eichlerová, I., Homolka, L., and Nerud, F. (2006). Ability of industrial dyes decolorization and ligninolytic enzymes production by different *Pleurotus* species with special attention on *Pleurotus calyprtratus*, strain CCBAS 461. *Process Biochem.* *41*, 941–946.

Elegir, G., Bussini, D., Antonsson, S., Lindström, M.E., and Zoia, L. (2007). Laccase-initiated cross-linking of lignocellulose fibres using a ultra-filtered lignin isolated from kraft black liquor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *77*, 809–817.

Eriksson, K.-E.L., Blanchette, R.A., and Ander, P. (1990a). Morphological aspects of wood degradation by fungi and bacteria. In *Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components*, (Springer), pp. 1–87.

Eriksson, K.-E.L., Blanchette, R.A., and Ander, P. (1990b). Biodegradation of cellulose. In *Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components*, (Springer), pp. 89–180.

Eriksson, K.-E.L., Blanchette, R., and Ander, P. (2012). *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components* (Springer Science & Business Media).

Evans, C.S., Dutton, M.V., Guillén, F., and Veness, R.G. (1994). Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocellulose degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* *13*, 235–239.

Fackler, K., Gradinger, C., Hinterstoisser, B., Messner, K., and Schwanninger, M. (2006). Lignin degradation by white rot fungi on spruce wood shavings during short-time solid-state fermentations monitored by near infrared spectroscopy. *Enzyme Microb. Technol.* *39*, 1476–1483.

Faraco, V., Pezzella, C., Miele, A., Giardina, P., and Sanna, G. (2009). Bio-remediation of colored industrial wastewaters by the white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus ostreatus* and their enzymes. *Biodegradation* *20*, 209–220.

Fengel, D., and Wegener, G. (1983). *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions* (Walter de Gruyter).

Ferraz, A., Rodriguez, J., Freer, J., and Baeza, J. (2001). Biodegradation of *Pinus radiata* softwood by white- and brown-rot fungi. *World J. Microbiol. Biotechnol.* *17*, 31–34.

Ferraz, A., Guerra, A., Souza-Cruz, P.B., and Mendonça, R. (2002). Attempts to correlate biopulping benefits with changes in the chemical structure of wood components and enzymes produced during the wood biotreatment with *Ceriporiopsis subvermispota*. *Prog. Biotechnol.* *21*, 73–80.

Ferraz, A., Córdova, A.M., and Machuca, A. (2003). Wood biodegradation and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispota* during solid-state fermentation of *Eucalyptus grandis*. *Enzyme Microb. Technol.* *32*, 59–65.

Ferraz A, Guerra A, Mendonça R, Masarin F, Vicentim MP, Aguiar A, Pavan PC. (2008). Technological advances and mechanistic basis for fungal biopulping. *Enzyme Microb. Technol.* *43*, 178-185.

Field, J.A., de Jong, E., Feijoo-Costa, G., and de Bont, J.A. (1993). Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Trends Biotechnol.* *11*, 44–49.

Fillat, U., and Roncero, M.B. (2010). Optimization of laccase–mediator system in producing biobleached flax pulp. *Bioresour. Technol.* *101*, 181–187.

- Fischer, K., Akhtar, M., Blanchette, R.A., Burnes, T.A., Messner, K., and Kirk, T.K. (1994). Reduction of resin content in wood chips during experimental biological pulping processes. *Holzforsch.-Int. J. Biol. Chem. Phys. Technol. Wood* 48, 285–290.
- Floudas, D., Binder, M., Riley, R., Barry, K., Blanchette, R.A., Henrissat, B., Martínez, A.T., Otilar, R., Spatafora, J.W., Yadav, J.S., et al. (2012). The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science* 336, 1715–1719.
- Floudas, D., Held, B.W., Riley, R., Nagy, L.G., Koehler, G., Ransdell, A.S., Younus, H., Chow, J., Chiniquy, J., Lipzen, A., et al. (2015). Evolution of novel wood decay mechanisms in Agaricales revealed by the genome sequences of *Fistulina hepatica* and *Cylindrobasidium torrendii*. *Fungal Genet. Biol.* 76, 78–92.
- Font, X., Caminal, G., Gabarrell, X., Romero, S., and Vicent, M.T. (2003). Black liquor detoxification by laccase of *Trametes versicolor* pellets. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 78, 548–554.
- Forney, L.J., Reddy, C.A., Tien, M., and Aust, S.D. (1982). The involvement of hydroxyl radical derived from hydrogen peroxide in lignin degradation by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* 257, 11455–11462.
- Fraaije, M.W., and van Bloois, E. (2013). DyP-type Peroxidases: A Promising and Versatile Class of Enzymes. *Enzyme Eng.* 2012.
- Freitag, M., and Morrell, J.J. (1992). Decolorization of the polymeric dye Poly R-478 by wood-inhabiting fungi. *Can. J. Microbiol.* 38, 811–822.
- Fukazawa, K. (1992). Ultraviolet microscopy. In *Methods in Lignin Chemistry*, (Springer), pp. 110–121.
- Galliano, H., Gas, G., Seris, J.L., and Boudet, A.M. (1991). Lignin degradation by *Rigidoporus lignosus* involves synergistic action of two oxidizing enzymes: Mn peroxidase and laccase. *Enzyme Microb. Technol.* 13, 478–482.
- García, O., Camarero, S., Colom, J.F., Martínez, Á.T., Martínez, M.J., Monje, R., and Vidal, T. (2003). Optimization of a laccase-mediator stage for TCF bleaching of flax pulp. *Holzforschung* 57, 513–519.
- Garzillo, A.M., Colao, M.C., Buonocore, V., Oliva, R., Falcigno, L., Saviano, M., Santoro, A.M., Zappala, R., Bonomo, R.P., Bianco, C., et al. (2001). Structural and kinetic characterization of native laccases from *Pleurotus ostreatus*, *Rigidoporus lignosus*, and *Trametes trogii*. *J. Protein Chem.* 20, 191–201.
- Gellerstedt, G., Sjöholm, E., and Brodin, I. (2010). The wood-based biorefinery: A source of carbon fiber? *Open Agric. J.* 4, 119-124
- Geng, X., Li, K., and Xu, F. (2004). Investigation of hydroxamic acids as laccase-mediators for pulp bleaching. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 493–496.
- Gilarranz, M.A., Rodriguez, F., Oliet, M., and Revenga, J.A. (1998). Acid precipitation and purification of wheat straw lignin. *Sep. Sci. Technol.* 33, 1359–1377.
- Gilbertson, R.L. (1980). Wood-rotting fungi of North America. *Mycologia* 72, 1–49.

Glenn, J.K., and Gold, M.H. (1985). Purification and characterization of an extracellular Mn (II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Biochem. Biophys. 242, 329–341.

Glenn, J.K., Morgan, M.A., Mayfield, M.B., Kuwahara, M., and Gold, M.H. (1983). An extracellular H₂O₂-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 114, 1077–1083.

Gold, M.H., and Alic, M. (1993). Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Microbiol. Rev. 57, 605–622.

González, E.D., Vallejo, O.V., Anaya, C.M., Sánchez, M.M., González, M.C., Palomares, L.A., and Mallol, J.F. (2008). Production of two novel laccase isoforms by a thermotolerant strain of “*Pycnoporus sanguineus*” isolated from an oil-polluted tropical habitat. Int. Microbiol. Off. J. Span. Soc. Microbiol. 11, 163–170.

Green, F., and Highley, T.L. (1997). Mechanism of brown-rot decay: paradigm or paradox. Int. Biodeterior. Biodegrad. 39, 113–124.

Grönqvist, S., Buchert, J., Rantanen, K., Viikari, L., and Suurnäkki, A. (2003). Activity of laccase on unbleached and bleached thermomechanical pulp. Enzyme Microb. Technol. 32, 439–445.

Grover, R., Marwaha, S.S., and Kennedy, J.F. (1999). Studies on the use of an anaerobic baffled reactor for the continuous anaerobic digestion of pulp and paper mill black liquors. Process Biochem. 34, 653–657.

Guerra, A., Mendonça, R., and Ferraz, A. (2002). Characterization of the residual lignins in *Pinus taeda* biodegraded by *Ceriporiopsis subvermispota* by using in situ CuO oxidation and DFRC methods. Holzforschung 56, 157–160.

Guerra, A., Mendonça, R., Ferraz, A., Lu, F., and Ralph, J. (2004). Structural characterization of lignin during *Pinus taeda* wood treatment with *Ceriporiopsis subvermispota*. Appl. Environ. Microbiol. 70, 4073–4078.

Hakala, T.K., Maijala, P., Konn, J., and Hatakka, A. (2004). Evaluation of novel wood-rotting polypores and corticioid fungi for the decay and biopulping of Norway spruce (*Picea abies*) wood. Enzyme Microb. Technol. 34, 255–263.

Hammel, K.E., and Cullen, D. (2008). Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. Curr. Opin. Plant Biol. 11, 349–355.

Hammel, K.E., Kapich, A.N., Jensen, K.A., and Ryan, Z.C. (2002). Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. Enzyme Microb. Technol. 30, 445–453.

Hatakka, A. (1994). Lignin-modifying enzymes fungi: production and role. FEMS Microbiol. Rev. 13, 125–135.

Hatakka, A. (2005). Biodegradation of lignin. Biopolym. Online.

Hatakka, A., and Hammel, K.E. (2011a). Fungal biodegradation of lignocelluloses. In Industrial Applications, (Springer), pp. 319–340.

Hatakka, A., and Hammel, K.E. (2011b). Fungal biodegradation of lignocelluloses. In *Industrial Applications*, (Springer), pp. 319–340.

Hatakka, A., Maijala, P., Hakala, T.K., Hauhio, L., and Ellmén, J. (2003). Novel white-rot fungus and use thereof in wood pretreatment. *Int. Pat. Appl. WO 3, 080812*.

ten Have, R., Hartmans, S., Teunissen, P.J., and Field, J.A. (1998). Purification and characterization of two lignin peroxidase isozymes produced by *Bjerkandera* sp. strain BOS55. *FEBS Lett.* **422**, 391–394.

Hawkes, G.E., Smith, C.Z., Utley, J.H., Vargas, R.R., and Viertler, H. (1993). A comparison of solution and solid state ¹³C NMR spectra of lignins and lignin model compounds. *Holzforsch.-Int. J. Biol. Chem. Phys. Technol. Wood* **47**, 302–312.

Heck, J.X., Hertz, P.F., and Ayub, M.A.Z. (2005). Extraction optimization of xylanases obtained by solid-state cultivation of *Bacillus circulans* BL53. *Process Biochem.* **40**, 2891–2895.

Hoegger, P.J., Kilaru, S., James, T.Y., Thacker, J.R., and Kües, U. (2006). Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *Febs J.* **273**, 2308–2326.

Hofrichter, M. (2002). Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme Microb. Technol.* **30**, 454–466.

Hori, C., Gaskell, J., Igarashi, K., Kersten, P., Mozuch, M., Samejima, M., and Cullen, D. (2014). Temporal alterations in the secretome of the selective ligninolytic fungus *Ceriporiopsis subvermispora* during growth on aspen wood reveal this organism's strategy for degrading lignocellulose. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 2062–2070.

Horn, S.J., Sikorski, P., Cederkvist, J.B., Vaaje-Kolstad, G., Sørli, M., Synstad, B., Vriend, G., Vaara, K.M., and Eijsink, V.G. (2006). Costs and benefits of processivity in enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 18089–18094.

Horn, S.J., Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., and Eijsink, V.G. (2012). Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnol. Biofuels* **5**, 1–13.

Hou, H., Zhou, J., Wang, J., Du, C., and Yan, B. (2004). Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Process Biochem.* **39**, 1415–1419.

Ibarra, D., Camarero, S., Romero, J., Martínez, M.J., and Martínez, A.T. (2006a). Integrating laccase–mediator treatment into an industrial-type sequence for totally chlorine-free bleaching of eucalypt kraft pulp. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **81**, 1159–1165.

Ibarra, D., Romero, J., Martínez, M.J., Martínez, A.T., and Camarero, S. (2006b). Exploring the enzymatic parameters for optimal delignification of eucalypt pulp by laccase–mediator. *Enzyme Microb. Technol.* **39**, 1319–1327.

Ikehata K, Buchanan ID, Smith DW. (2004). Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. *J. Environ. Eng. Sci.* **3**,1-19.

- Isroi, I., Millati, R., Niklasson, C., Cayanto, C., Taherzadeh, M.J., Lundquist, K., and others (2011). Biological treatment of Lignocelluloses with white-rot funghi and its applications: Review. *BioResources* 6, 5224–5259.
- Kapich, A., Hofrichter, M., Vares, T., and Hatakka, A. (1999a). Coupling of manganese peroxidase-mediated lipid peroxidation with destruction of nonphenolic lignin model compounds and 14 C-labeled lignins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 259, 212–219.
- Kapich, A.N., Jensen, K.A., and Hammel, K.E. (1999b). Peroxyl radicals are potential agents of lignin biodegradation. *FEBS Lett.* 461, 115–119.
- Kersten, P.J. (1990). Glyoxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: its characterization and activation by lignin peroxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 2936–2940.
- Kersten, P., and Cullen, D. (2007). Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Fungal Genet. Biol.* 44, 77–87.
- Kirk, T.K. (1975). Effects of a brown-rot fungus, *Lenzites trabea*, on lignin in spruce wood. *Holzforsch.-Int. J. Biol. Chem. Phys. Technol. Wood* 29, 99–107.
- Kirk, T.K., and Chang, H. (1975). Decomposition of lignin by white-rot fungi. II. Characterization of heavily degraded lignins from decayed spruce. *Holzforsch.-Int. J. Biol. Chem. Phys. Technol. Wood* 29, 56–64.
- Kirk, T.K., and Farrell, R.L. (1987). Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* 41, 465–501.
- Knapp, J.S., Newby, P.S., and Reece, L.P. (1995). Decolorization of dyes by wood-rotting basidiomycete fungi. *Enzyme Microb. Technol.* 17, 664–668.
- Knutson, K.P. (2004). Enzymatic biobleaching of recalcitrant paper dyes. Georgia Institute of Technology.
- Knutson, K., Kirzan, S., and Ragauskas, A. (2005). Enzymatic biobleaching of two recalcitrant paper dyes with horseradish and soybean peroxidase. *Biotechnol. Lett.* 27, 753–758.
- Koduri, R.S., and Tien, M. (1995). Oxidation of guaiacol by lignin peroxidase role of veratryl alcohol. *J. Biol. Chem.* 270, 22254–22258.
- de KOKER, T.H., John, Z., Allsop, S.F., and Janse, B.J. (2000). Isolation and enzymic characterisation of South African white-rot fungi. *Mycol. Res.* 104, 820–824.
- Kudanga, T., Nyanhongo, G.S., Guebitz, G.M., and Burton, S. (2011). Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: a review. *Enzyme Microb. Technol.* 48, 195–208.
- Kuhad, R.C., Singh, A., and Eriksson, K.-E.L. (1997). Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. In *Biotechnology in the Pulp and Paper Industry*, (Springer), pp. 45–125.
- Langston, J.A., Shaghasi, T., Abbate, E., Xu, F., Vlasenko, E., and Sweeney, M.D. (2011). Oxidoreductive cellulose depolymerization by the enzymes cellobiose dehydrogenase and glycoside hydrolase 61. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 7007–7015.

- Lankinen, P., Hildén, K., Aro, N., Salkinoja-Salonen, M., and Hatakka, A. (2005). Manganese peroxidase of *Agaricus bisporus*: grain bran-promoted production and gene characterization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *66*, 401–407.
- Larrondo, L.F., Avila, M., Salas, L., Cullen, D., and Vicuna, R. (2003). Heterologous expression of laccase cDNA from *Ceriporiopsis subvermispota* yields copper-activated apoprotein and complex isoform patterns. *Microbiology* *149*, 1177–1182.
- Levasseur, A., Piumi, F., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Asther, M., Delattre, M., Henrissat, B., Pontarotti, P., Asther, M., and Record, E. (2008). FOLy: an integrated database for the classification and functional annotation of fungal oxidoreductases potentially involved in the degradation of lignin and related aromatic compounds. *Fungal Genet. Biol.* *45*, 638–645.
- Levin, L., and Forchiassin, F. (1998). Influence of growth conditions on the production of xylanolytic enzymes by *Trametes trogii*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* *14*, 443–446.
- Levin, L., Forchiassin, F., and Ramos, A.M. (2002). Copper induction of lignin-modifying enzymes in the white-rot fungus *Trametes trogii*. *Mycologia* *94*, 377–383.
- Levin, L., Viale, A., and Forchiassin, A. (2003). Degradation of organic pollutants by the white rot basidiomycete *Trametes trogii*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* *52*, 1–5.
- Levin, L., Papinutti, L., and Forchiassin, F. (2004). Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes. *Bioresour. Technol.* *94*, 169–176.
- Levin, L., Forchiassin, F., and Viale, A. (2005). Ligninolytic enzyme production and dye decolorization by *Trametes trogii*: application of the Plackett–Burman experimental design to evaluate nutritional requirements. *Process Biochem.* *40*, 1381–1387.
- Levin, L., Villalba, L., Da Re, V., Forchiassin, F., and Papinutti, L. (2007). Comparative studies of loblolly pine biodegradation and enzyme production by Argentinean white rot fungi focused on biopulping processes. *Process Biochem.* *42*, 995–1002.
- Levin, L., Herrmann, C., and Papinutti, V.L. (2008). Optimization of lignocellulolytic enzyme production by the white-rot fungus *Trametes trogii* in solid-state fermentation using response surface methodology. *Biochem. Eng. J.* *39*, 207–214.
- Levin, L., and Castro, M.A. (1998). Anatomical study of the decay caused by the white-rot fungus *Trametes trogii* (*Aphyllophorales*) in wood of *Salix* and *Populus*. *IAWA J.* *19*, 169–180.
- Liese, W. (1970). Ultrastructural aspects of woody tissue disintegration. *Annu. Rev. Phytopathol.* *8*, 231–258.
- Liss, S.N., Bicho, P.A., and Saddler, J.N. (1997). Microbiology and biodegradation of resin acids in pulp mill effluents: a minireview. *Can. J. Microbiol.* *43*, 599–611.
- Lundell, T., Leonowicz, A., Rogalski, J., and Hatakka, A. (1990). Formation and action of lignin-modifying enzymes in cultures of *Phlebia radiata* supplemented with veratric acid. *Appl. Environ. Microbiol.* *56*, 2623–2629.
- MacDonald, J., Doering, M., Canam, T., Gong, Y., Guttman, D.S., Campbell, M.M., and Master, E.R. (2011). Transcriptomic responses of the softwood-degrading white-rot fungus

Phanerochaete carnosae during growth on coniferous and deciduous wood. *Appl. Environ. Microbiol.*

Machuca, A., and Ferraz, A. (2001). Hydrolytic and oxidative enzymes produced by white- and brown-rot fungi during *Eucalyptus grandis* decay in solid medium. *Enzyme Microb. Technol.* *29*, 386–391.

Mai, C., Kües, U., and Militz, H. (2004). Biotechnology in the wood industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *63*, 477–494.

Mäkelä, M., and others (2009). The white-rot fungi *Phlebia radiata* and *Dichomitus squalens* in wood-based cultures: expression of laccases, lignin peroxidases, and oxalate decarboxylase.

Makris, S.P. (2004). Removal of resin and fatty acids from pulp mill wastewater streams (ProQuest).

Mark Hewitt, L., Parrott, J.L., and McMaster, M.E. (2006). A decade of research on the environmental impacts of pulp and paper mill effluents in Canada: sources and characteristics of bioactive substances. *J. Toxicol. Environ. Health Part B* *9*, 341–356.

Martinez, D., Larrondo, L.F., Putnam, N., Gelpke, M.D.S., Huang, K., Chapman, J., Helfenbein, K.G., Ramaiya, P., Detter, J.C., Larimer, F., et al. (2004). Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nat. Biotechnol.* *22*, 695–700.

Martínez, A.T. (2002). Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme Microb. Technol.* *30*, 425–444.

Marwaha, S.S., Grover, R., Prakash, C., and Kennedy, J.F. (1998). Continuous biobleaching of black liquor from the pulp and paper industry using an immobilized cell system. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* *73*, 292–296.

Mathialagan, T., and Viraraghavan, T. (2009). Biosorption of pentachlorophenol from aqueous solutions by a fungal biomass. *Bioresour. Technol.* *100*, 549–558.

Mayer, A.M., and Staples, R.C. (2002). Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* *60*, 551–565.

Messner, K., Koller, K., Wall, M.B., Akhtar, M., and Scott, G.M. (1998). Fungal treatment of wood chips for chemical pulping. *Environ. Friendly Technol. Pulp Pap. Ind.* 385–420.

Moldes, D., and Vidal, T. (2008). Laccase-HBT bleaching of eucalyptus kraft pulp: Influence of the operating conditions. *Bioresour. Technol.* *99*, 8565–8570.

Moldes, D., Díaz, M., Tzanov, T., and Vidal, T. (2008). Comparative study of the efficiency of synthetic and natural mediators in laccase-assisted bleaching of eucalyptus kraft pulp. *Bioresour. Technol.* *99*, 7959–7965.

Moreira, M.T., Sierra-Alvarez, R., Lema, J.M., Feijoo, G., and Field, J.A. (2001). Oxidation of lignin in eucalyptus kraft pulp by manganese peroxidase from *Bjerkandera sp.* strain BOS55. *Bioresour. Technol.* *78*, 71–79.

Morozova, O.V., Shumakovich, G.P., Gorbacheva, M.A., Shleev, S.V., and Yaropolov, A.I. (2007a). “Blue” laccases. *Biochem. Mosc.* *72*, 1136–1150.

- Morozova, O.V., Shumakovich, G.P., Shleev, S.V., and Yaropolov, Y.I. (2007b). Laccase-mediator systems and their applications: a review. *Appl. Biochem. Microbiol.* *43*, 523–535.
- Nelson, N., and others (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J Biol Chem* *153*, 375–380.
- Norgren, M., and Bergfors, E. (2005). Sorption of kraft lignin from spent liquors on pulp fibres. *Wood Sci. Technol.* *39*, 512–520.
- Oriaran, T.P., Labosky Jr, P., and Royse, D.J. (1989). Lignin degradation capabilities of *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Wood Fiber Sci. J. Soc. Wood Sci. Technol.*
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Scaloni, A., Capasso, A., and Sannia, G. (1997). A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *J. Biol. Chem.* *272*, 31301–31307.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B., and Sannia, G. (2000). Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* *66*, 920–924.
- Papinutti, L., and Martínez, M.J. (2006). Production and characterization of laccase and manganese peroxidase from the ligninolytic fungus *Fomes sclerodermeus*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* *81*, 1064–1070.
- Papinutti, L., Dimitriu, P., and Forchiassin, F. (2008). Stabilization studies of *Fomes sclerodermeus* laccases. *Bioresour. Technol.* *99*, 419–424.
- Pathan, T.S., Sonawane, D.L., and Khillare, Y.K. (2009). Toxicity and behavioural changes in freshwater fish *Rasbora daniconius* exposed to paper mill effluent. *Bot. Res. Int.* *2*, 263–266.
- Patidar, P., Agrawal, D., Banerjee, T., and Patil, S. (2005). Optimisation of process parameters for chitinase production by soil isolates of *Penicillium chrysogenum* under solid substrate fermentation. *Process Biochem.* *40*, 2962–2967.
- Payne, C.M., Bomble, Y.J., Taylor, C.B., McCabe, C., Himmel, M.E., Crowley, M.F., and Beckham, G.T. (2011). Multiple functions of aromatic-carbohydrate interactions in a processive cellulase examined with molecular simulation. *J. Biol. Chem.* *286*, 41028–41035.
- Pezzella, C., Autore, F., Giardina, P., Piscitelli, A., Sannia, G., and Faraco, V. (2009). The *Pleurotus ostreatus* laccase multi-gene family: isolation and heterologous expression of new family members. *Curr. Genet.* *55*, 45–57.
- Pointing, S. (2001). Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *57*, 20–33.
- Pokhrel, D., and Viraraghavan, T. (2004). Treatment of pulp and paper mill wastewater—a review. *Sci. Total Environ.* *333*, 37–58.
- Polizeli, M., Rizzatti, A.C.S., Monti, R., Terenzi, H.F., Jorge, J.A., and Amorim, D.S. (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *67*, 577–591.

- Ragauskas, A.J., Beckham, G.T., Biddy, M.J., Chandra, R., Chen, F., Davis, M.F., Davison, B.H., Dixon, R.A., Gilna, P., Keller, M., et al. (2014). Lignin valorization: improving lignin processing in the biorefinery. *Science* *344*, 1246843.
- Raghukumar, C., and Rivonkar, G. (2001). Decolorization of molasses spent wash by the white-rot fungus *Flavodon flavus*, isolated from a marine habitat. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *55*, 510–514.
- Rajeshwari, K.V., Balakrishnan, M., Kansal, A., Lata, K., and Kishore, V.V.N. (2000). State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment. *Renew. Sustain. Energy Rev.* *4*, 135–156.
- Ratia, H., Rämänen, H., Lensu, A., and Oikari, A. (2013). Betulinol and wood sterols in sediments contaminated by pulp and paper mill effluents: dissolution and spatial distribution. *Environ. Sci. Pollut. Res.* *20*, 4562–4573.
- Reina, R., Liers, C., Ocampo, J.A., García-Romera, I., and Aranda, E. (2013). Solid state fermentation of olive mill residues by wood-and dung-dwelling Agaricomycetes: Effects on peroxidase production, biomass development and phenol phytotoxicity. *Chemosphere* *93*, 1406–1412.
- Rogalski, J., Dawidowicz, A.L., and Leonowicz, A. (1990). Purification and immobilization of the inducible form of extracellular laccase of the fungus *Trametes versicolor*. *Acta Biotechnol.* *10*, 261–269.
- Rohr, C.O., Levin, L.N., Mentaberry, A.N., and Wirth, S.A. (2013). A First Insight into *Pycnoporus sanguineus* BAFC 2126 Transcriptome.
- Ruiz-Dueñas, F.J., and Martínez, Á.T. (2009). Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. *Microb. Biotechnol.* *2*, 164–177.
- Ruiz-Dueñas, F.J., Morales, M., García, E., Miki, Y., Martínez, M.J., and Martínez, A.T. (2009). Substrate oxidation sites in versatile peroxidase and other basidiomycete peroxidases. *J. Exp. Bot.* *60*, 441–452.
- Sahoo, D.K., and Gupta, R. (2005). Evaluation of ligninolytic microorganisms for efficient decolorization of a small pulp and paper mill effluent. *Process Biochem.* *40*, 1573–1578.
- Saloheimo, M., Paloheimo, M., Hakola, S., Pere, J., Swanson, B., Nyyssönen, E., Bhatia, A., Ward, M., and Penttilä, M. (2002). Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. *Eur. J. Biochem.* *269*, 4202–4211.
- Salvachúa, D., Prieto, A., López-Abelairas, M., Lu-Chau, T., Martínez, Á.T., and Martínez, M.J. (2011). Fungal pretreatment: an alternative in second-generation ethanol from wheat straw. *Bioresour. Technol.* *102*, 7500–7506.
- Salvachúa, D., Prieto, A., Martínez, Á.T., and Martínez, M.J. (2013). Characterization of a novel DyP-type peroxidase from *Irpex lacteus* and its application in the enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Appl. Environ. Microbiol.* AEM – 00699.

- Saparrat, M., Balatti, P.A., Martínez, M.J., and Jurado, M. (2010). Differential regulation of laccase gene expression in *Corioloopsis rigida* LPSC No. 232. *Fungal Biol.* *114*, 999–1006.
- Sarkar, P., Bosneaga, E., and Auer, M. (2009). Plant cell walls throughout evolution: towards a molecular understanding of their design principles. *J. Exp. Bot.* *60*, 3615–3635.
- Sato, S., Feltus, F.A., Iyer, P., and Tien, M. (2009). The first genome-level transcriptome of the wood-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* grown on red oak. *Curr. Genet.* *55*, 273–286.
- Schnell, A., Hall, E.R., and Skog, S. (1992). Anaerobic and aerobic treatability of high-yield sulphite spent liquor. *Water Qual. Res. J. Can.* 1992.
- Schwarze, F.W. (2007). Wood decay under the microscope. *Fungal Biol. Rev.* *21*, 133–170.
- Sharma, P., Goel, R., and Capalash, N. (2007). Bacterial laccases. *World J. Microbiol. Biotechnol.* *23*, 823–832.
- Shuttleworth, K.L., Postie, L., and Bollag, J.-M. (1986). Production of induced laccase by the fungus *Rhizoctonia praticola*. *Can. J. Microbiol.* *32*, 867–870.
- Sigoillot, C., Camarero, S., Vidal, T., Record, E., Asther, M., Pérez-Boada, M., Martínez, M.J., Sigoillot, J.-C., Asther, M., Colom, J.F., et al. (2005). Comparison of different fungal enzymes for bleaching high-quality paper pulps. *J. Biotechnol.* *115*, 333–343.
- da Silva, E.B., Zabkova, M., Araújo, J.D., Cateto, C.A., Barreiro, M.F., Belgacem, M.N., and Rodrigues, A.E. (2009). An integrated process to produce vanillin and lignin-based polyurethanes from Kraft lignin. *Chem. Eng. Res. Des.* *87*, 1276–1292.
- Silva R. 2006. Industrias de celulosa y papel: calidad, medioambiente y biotecnología. *Ambiente forestal, Revista de Extensión, Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Chile* Vol. 1, Nº 1. 26-34
- Singh, D., and Chen, S. (2008). The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: conditions for the production of lignin-degrading enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *81*, 399–417.
- Singh, G., Ahuja, N., Batish, M., Capalash, N., and Sharma, P. (2008). Biobleaching of wheat straw-rich soda pulp with alkalophilic laccase from γ -proteobacterium JB: Optimization of process parameters using response surface methodology. *Bioresour. Technol.* *99*, 7472–7479.
- Singh, P., Sulaiman, O., Hashim, R., Rupani, P.F., and Peng, L.C. (2010). Biopulping of lignocellulosic material using different fungal species: a review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* *9*, 141–151.
- Sjöström, E., and Westermark, U. (1999). Chemical composition of wood and pulps: Basic constituents and their distribution. In *Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping, and Papermaking*, (Springer), pp. 1–19.
- Solomon, E.I., Sundaram, U.M., and Machonkin, T.E. (1996). Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* *96*, 2563–2606.
- Srivastava, N., and Singh, P. (2015). Degradation of toxic pollutants from pulp & paper mill effluent (Discovery).

- Stajich, J.E., Berbee, M.L., Blackwell, M., Hibbett, D.S., James, T.Y., Spatafora, J.W., and Taylor, J.W. (2009). The fungi. *Curr. Biol.* *19*, R840–R845.
- Strassberger, Z., Tanase, S., and Rothenberg, G. (2014). The pros and cons of lignin valorisation in an integrated biorefinery. *RSC Adv.* *4*, 25310–25318.
- Swamy, N.K., Singh, P., and Sarethy, I.P. (2011). Aerobic and anaerobic treatment of paper industry wastewater. *Res. Environ.* *4*(4) 141-148 (2011)
- Thurston, C.F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* *140*, 19–26.
- Tien, M., and Kirk, T.K. (1983). Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Science* *221*, 661–663.
- Trejo-Hernandez, M.R., Lopez-Munguia, A., and Ramirez, R.Q. (2001). Residual compost of *Agaricus bisporus* as a source of crude laccase for enzymic oxidation of phenolic compounds. *Process Biochem.* *36*, 635–639.
- Vakkilainen, E. (2000). Chemical recovery. *Chemical Pulping* 7-13
- Valadon, L.R.G., and MUMMERY, R.S. (1969). A new carotenoid from *Laetiporus sulphureus*. *Ann. Bot.* *33*, 879–882.
- Valls, C., and Roncero, M.B. (2009). Using both xylanase and laccase enzymes for pulp bleaching. *Bioresour. Technol.* *100*, 2032–2039.
- Viamajala, S., Donohoe, B.S., Decker, S.R., Vinzant, T.B., Selig, M.J., Himmel, M.E., and Tucker, M.P. (2010). Heat and mass transport in processing of lignocellulosic biomass for fuels and chemicals. In *Sustainable Biotechnology*, (Springer), pp. 1–18.
- Viikari, L., Kantelinen, A., Sundquist, J., and Linko, M. (1994). Xylanases in bleaching: from an idea to the industry. *FEMS Microbiol. Rev.* *13*, 335–350.
- Vikström, F., Holmbom, B., and Hamunen, A. (2005). Sterols and triterpenyl alcohols in common pulpwoods and black liquor soaps. *Holz Als Roh- Werkst.* *63*, 303–308.
- Wan, J.K.-S., and Depew, M.C. (2000). Method of reducing brightness reversion and yellowness (B*) of bleached mechanical wood pulps (Google Patents).
- Woolridge, E.M. (2014). Mixed enzyme systems for delignification of lignocellulosic biomass. *Catalysts* *4*, 1–35.
- Wu, J., and Yu, H.-Q. (2007). Biosorption of 2, 4-dichlorophenol by immobilized white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* from aqueous solutions. *Bioresour. Technol.* *98*, 253–259.
- Wymelenberg, A.V., Gaskell, J., Mozuch, M., Kersten, P., Sabat, G., Martinez, D., and Cullen, D. (2009). Transcriptome and secretome analyses of *Phanerochaete chrysosporium* reveal complex patterns of gene expression. *Appl. Environ. Microbiol.* *75*, 4058–4068.
- Wymelenberg, A.V., Gaskell, J., Mozuch, M., Sabat, G., Ralph, J., Skyba, O., Mansfield, S.D., Blanchette, R.A., Martinez, D., Grigoriev, I., et al. (2010). Comparative transcriptome and

secretome analysis of wood decay fungi *Postia placenta* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* *76*, 3599–3610.

Yelle, D.J., Ralph, J., Lu, F., and Hammel, K.E. (2008). Evidence for cleavage of lignin by a brown rot basidiomycete. *Environ. Microbiol.* *10*, 1844–1849.

Zhao, J., and Janse, B.J. (1996). Comparison of H₂O₂-producing enzymes in selected white rot fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* *139*, 215–221.

Zhao, L.H., Zhou, J.T., Lv, H., Zheng, C.L., Yang, Y.S., Sun, H.J., and Zhang, X.H. (2008). Decolorization of cotton pulp black liquor by *Pleurotus ostreatus* in a bubble-column reactor. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* *80*, 44–48.

<http://www.eis.uva.es/~macromol/curso08-09/pls/fase.htm>