

HONGOS DE PUDRICIÓN BLANCA COMO BIOTECNOLOGÍA EMERGENTE PARA COMBATIR AFLATOXINAS

Iván González Caloch, Sarai Karina Cruz Pacheco, Soley Berenice Nava Galicia, Marlon Rojas López, Martha Dolores Bibbins Martínez*

Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada-Instituto Politécnico Nacional Ex-Hacienda San Juan Molino Carretera Estatal Tecuexcomac- Tepetitla de Lardizábal Km 1.5, Tlaxcala, México C.P. 90700

*mbibbinsm@ipn.mx

RESUMEN

Los granos y cereales son uno de los alimentos más consumidos a nivel mundial, sin embargo, su producción se ve afectada por hongos patógenos, entre ellos *Aspergillus flavus*, organismo productor de toxinas denominadas aflatoxinas. Las aflatoxinas son un grupo de metabolitos secundarios altamente carcinogénicos, inmunosupresores y hepatotóxicos. La invasión de diversos granos por este hongo y su subsecuente contaminación con aflatoxinas ocurre durante el cultivo, el manejo postcosecha y durante el procesamiento del grano. Por lo anterior su presencia en los alimentos representa un riesgo potencial para la salud de los seres humanos y animales.

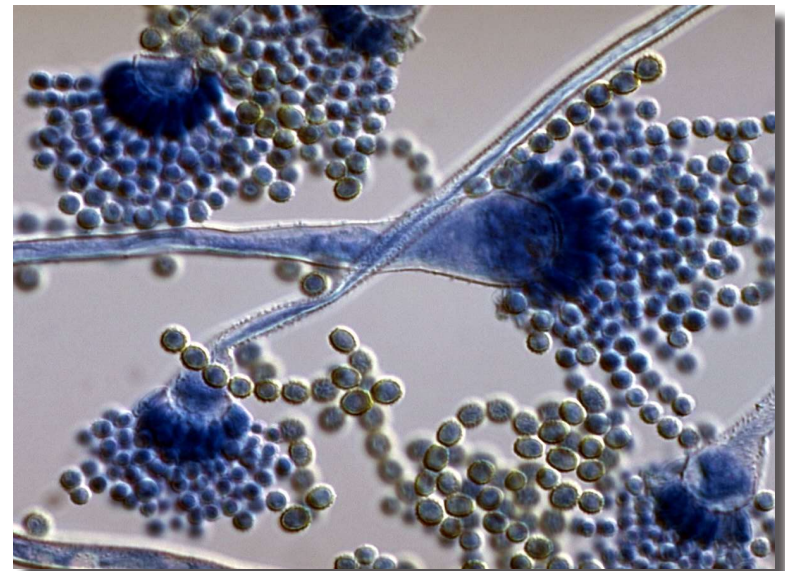
Una alternativa biotecnológica para combatir este problema son las enzimas ligninolíticas producidas por hongos de pudrición blanca. Las enzimas ligninolíticas como la lacasa y la manganosa peroxidasa tienen un alto potencial para oxidar y/o degradar compuestos recalcitrantes de estructuras complejas como las aflatoxinas, haciendo posible el desarrollo de métodos para la descontaminación de alimentos.

Palabras clave: aflatoxinas, *Aspergillus flavus*, enzimas ligninolíticas, hongos de pudrición blanca

ABSTRACT

Grains and cereals are one of the most consumed foods around the world, however, their production is affected by pathogenic fungi, such as the aflatoxin producing organism *Aspergillus flavus*. Aflatoxins are a group of secondary metabolites highly carcinogenic, immunosuppressive and hepatotoxic. The invasion of various grains by this fungus and its subsequent contamination by aflatoxin takes place during cultivation, post-harvest handling and during the processing of the grain. Therefore, its presence in food represents a potential risk for the health of humans and animals. A biotechnological alternative to combat this problem are the ligninolytic enzymes produced by white rot fungi. The laccase and manganese peroxidase are ligninolytic enzymes that have a high potential to oxidize or degrade recalcitrant compounds of complex structures such as aflatoxins, making possible the development of decontamination methods for foods.

Key words: aflatoxins, *Aspergillus flavus*, ligninolytic enzymes, white-rot fungi



INTRODUCCIÓN

Los hongos causan la mayoría de las enfermedades infecciosas de las plantas. De las casi 10,000 especies de hongos que han sido descritas, se sabe que más de 8,000 son patógenos de las plantas. Estos organismos pueden tener la capacidad de atacar a todas las partes de una planta y causar una gran variedad de síntomas, desde pudriciones de las raíces, pudrición de partes aéreas, manchas foliares, marchitamiento y raquitismo. Esto representa un grave problema particularmente para los cultivos de importancia económica como el maíz y otros granos y cereales que son ampliamente consumidos a nivel mundial ya que la producción de los mismos se ve severamente afectada y la contaminación subsecuente por diversos tipos de micotoxinas es un problema de salud pública particularmente en países de poco desarrollo. Siendo así los hongos el principal grupo de microorganismos responsables de enfermedades de plantas que amenazan la seguridad alimentaria mundial (Ihnurm y Meyer, 2014).

Los principales hongos productores de micotoxinas, conocidos como micotocinogénicos, corresponden a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. De particular importancia para nuestro país es el hongo *Aspergillus flavus*, patógeno que puede infectar al maíz, específicamente a las mazorcas, causando la enfermedad denominada pudrición de mazorca (figura 1), dicha infección tiene una gran importancia pues no sólo afecta a la planta, sino que también puede llegar a afectar al ser humano, ya que este hongo tiene la capacidad de producir aflatoxinas; sustancias extremadamente tóxicas.

Por lo anterior es medular el desarrollo de estrategias que prevengan la contaminación de cultivos con hongos patógenos y también estrategias que eliminen las aflatoxinas de los alimentos que ya están contaminados. En esta dirección, las enzimas de hongos de pudrición blanca, representan una alternativa para atender esta problemática.



Figura 1. Maíz contaminado con *Aspergillus flavus*. Mississippi State University plant pathologist (Weaver, 2012).

I. IMPACTO DE LAS AFLATOXINAS PRODUCIDAS

POR *Aspergillus flavus*

I.1 *Aspergillus flavus*

Aspergillus flavus es una de las especies más conocida del género *Aspergillus*. Es un hongo patógeno oportunista de plantas y animales (figura 2a), aunque la mayor parte de su vida la pasa como saprofito en el suelo en su forma micelial o como esclerocios que contribuyen a su supervivencia por un periodo de tiempo mayor. Los conidios producidos por el micelio o esclerocios pueden servir como inóculo primario para enfermedades (figura 2b) (Sheidegger y Payne, 2003).

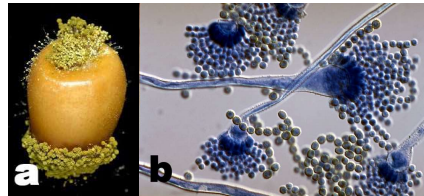


Figura 2. a) Grano de maíz infectado con *A. flavus*. b) Estructuras reproductivas de *A. flavus* (Loeffler, 2017).

I.2 Aflatoxinas (AF)

Las AF son metabolitos secundarios tóxicos, altamente carcinogénicos inmunosupresivos y hepatotóxicos, producidos, sobre todo, por las especies de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* (Yu et al 2002).

Debido a su alta estabilidad son un problema durante el cultivo, almacenamiento, transporte, procesamiento y etapas de manipulación de los granos agrícolas (Udomkun, et al, 2017). Los cultivos más afectados son los cereales (maíz, sorgo, mijo, arroz, trigo, cebada), oleaginosas (olivo, soja, girasol, algodón), especias (pimienta de chile, pimienta negra, coriandro, curcuma longa, jengibre), árboles (nogal, avellano, almendro, pistaches, coco) y frutos secos (cacahuete, castaña, higos).

La estructura básica de las AF (figura 3) es un anillo dihidrodifurano o tetrahidrodifurano unido a una cumarina con un anillo de cinco o seis átomos de carbono (Liu, et al, 2013). Son muy fluorescentes, propiedad que es utilizada para su detección y análisis (Chauhan, et al, 2016).

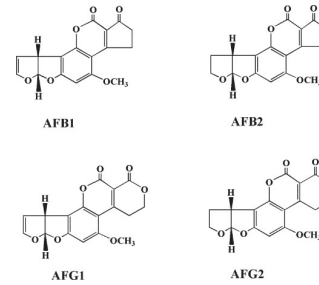


Figura 3. Estructuras químicas de las principales aflatoxinas

I.3 PROBLEMÁTICA DE LA CONTAMINACIÓN DE MAÍZ EN MÉXICO POR *A. flavus*

Las AF en México son un importante peligro en la salud por las siguientes razones: a) México es uno de los países con alto consumo per-cápita de maíz en el mundo (aproximadamente 325 gramos por día), b) México produce alrededor de 20 millones de toneladas de maíz por año, c) las condiciones de almacenamiento del maíz en México no están muy bien desarrolladas y no se tiene un monitoreo regular de la contaminación por AF (Anguiano, et al, 2005).

II. LOS HONGOS DE PUDRICIÓN BLANCA Y LA DEGRADACIÓN BIOLÓGICA DE LAS AFLATOXINAS

Los hongos de pudrición blanca se denominan así por ser capaces de crecer sobre la madera de arboles y descomponer la misma, favoreciendo la degradación de lignina y celulosa. Esta capacidad única para mineralizar la lignina hasta CO₂ es debida a la producción extracelular de enzimas modificadoras de lignina (LME). La lignino peroxidasa (LiP), maganeso peroxidasa (MnP) y las lacasa son las principales enzimas ligninolíticas extracelulares de estos hongos. Pero no solamente degradan lignina, debido al potencial que presentan tiene la capacidad de degradar contaminantes recalcitrantes, tales como dibenzodioxinas policloradas (PCDD) (Kamei et al., 2005), clorofenoles (Joshi & Gold, 1993), e hidrocarburos policíclicos aromáticos

(Bezalel et al., 1996; Collins et al., 1996). En estudios realizados particularmente con las enzimas MnP y lacasa se observó su eficiencia en la degradación de metoxicloro (Hirai et al., 2004) y Irgarol 1051 (Ogawa et al., 2004) dos importantes plaguicidas empleados a nivel mundial; así como también en la eliminación de las actividades estrógenicas de bisfenol A (BPA), nonilfenol, 4-terc-octilfenol, genisteína entre otros (Tamagawa et al., 2005). Recientemente, una nueva aplicación de estas enzimas es en la degradación de la aflatoxina AFB1, representando una alternativa viable y segura para eliminar micotoxinas de los alimentos (Alberts et al, 2009)

II.1 DEGRADACIÓN DE AFB1 POR LA ENZIMA LACASA (LC)

Las lacasa (p-difenol: oxígeno óxido reductasas EC 1.10.3.2) son oxidasas multicobre que se encuentran ampliamente distribuidas tanto en plantas superiores como en hongos y bacterias. Los hongos de pudrición blanca como *Pleurotus spp* son productores eficientes de las lacasa, estas enzimas catalizan la oxidación de fenoles, aminas aromáticas y otros compuestos no fenólicos, reduciéndolos de oxígeno molecular a agua. La actividad de LC puede aplicarse a los sustratos no fenólicos por el uso de mediadores redox sintéticos o naturales, estos mediadores, después de ser oxidados por LC, se difunden fuera del sitio activo y oxidan compuestos recalcitrantes que poseen alto potencial redox o de alto peso molecular (figura 4). Diferentes mediadores pueden actuar sobre compuestos químicamente relacionados ampliando la gama de su sustrato, por lo tanto, la aplicación de lacasa para la biotransformación de AFB1 es una alternativa en la cadena de alimentos contaminados por esta micotoxina (Loi, et al, 2016).

Se han estudiado más de 50 cepas de hongos de pudrición blanca con actividad de lacasa dentro de los cuales destacan *Peniophora sp* la cual al ser cultivada en medio mínimo mineral (MM) produce niveles de lacasa de 496 U/L; y al ser probado para la degradación de AFB1 registra porcentajes entre 40- 45%. En tanto que el hongo *Pleurotus ostreatus* cultivado en MM y suplementado con alcohol veratrílico, registra niveles de lacasa de 416,39 U/L; pero mejora el porcentaje de degradación de AFB1 de 35 hasta un 90%.

Trametes versicolor es otro de los hongos productores de la enzima lacasa, estudios realizados con la enzima purificada han favorecido la degradación de AFB1. Otra de las opciones en la optimización de la degradación de AFB1 ha sido el uso de enzimas lacasa recombinantes producidas por *Aspergillus niger*.

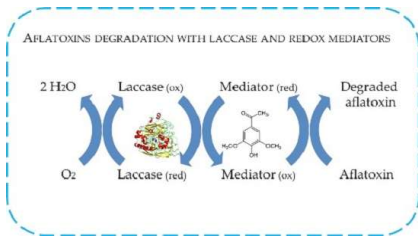


Figura 4. Mecanismo de degradación de aflatoxinas por la enzima lacasa en presencia de un mediador redox. Tomado y modificado de Peralta, 2017.

II.2 DEGRADACIÓN DE AFB1 POR LA ENZIMA Manganese Peroxidasa (MnP)

Otra de las enzimas con potencial para llevar a cabo la biotransformación de AFB1 es la enzima Manganese Peroxidasa (MnP) (EC1.11.1.13) esta enzima actúa catalizando la reacción de oxidación del ion manganeso (+2) a manganeso (+3) utilizando para ello peróxido de hidrógeno (H₂O₂), generando oxidantes no específicos los cuales juegan un papel importante al inicio de la degradación de la lignina. La enzima es una hemo proteína extracelular producida por basidiomicetos degradadores de madera podrida. Debido al tamaño de la molécula esta puede difundir en el complejo lignocelulósico compacto oxidando estructuras aromáticas mediante la formación de radicales lo que conduce a la ruptura de enlaces covalentes. El MnP tiene cinco isoenzimas, dentro de las más destacables se encuentran MnP1 y MnP2 reportada en diferentes hongos como *Nematoloma frowardii*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus eryngii*, *Phanerochaete flavidio-alba*, *Pleurotus ostreatus*, *Oxiporus latemarginatus* entre otros.

Estudios realizados por Wang (2011) examinó la capacidad de degradación de AFB1 por la enzima MnP de *P. sordida* YK-564, obteniendo porcentajes de descontaminación por arriba del 70% después de 48 hr, esta fue favorecida al adicionar Tween 80 ya que produce radicales de peróxido liberados de lípidos. Wang propone que AFB1 se oxida primero a AFB1-8, 9-epóxido por MnP y luego hidroliza a AFB1-8, 9-dihidrodiol (figura 5), logrando eliminar la actividad mutagénica de la AFB1, de esta forma la molécula se convierte en no tóxica.

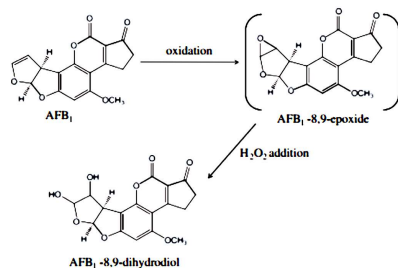


Figura 5. Mecanismo propuesto para la oxidación de AFB1 por MnP (Want, 2011).

III. PERSPECTIVAS

Sin lugar a dudas se requiere del uso de tecnologías innovadoras para minimizar la contaminación y exposición por aflatoxinas. En la actualidad el control biológico se está desarrollando para minimizar los efectos nocivos que causan los agentes químicos a corto mediano y largo plazo en su aplicación. Los hongos de pudrición blanca y particularmente ciertos metabolitos producidos por estos organismos con actividad antifungal pueden ser empleados en el control biológico de fitopatógenos. Por otra parte la aplicación de enzimas ligninolíticas para la degradación de aflatoxinas podría ser una importante medida empleada comercialmente durante el cultivo, el manejo postcosecha y durante el procesamiento del grano o para la descontaminación de alimentos ya procesados.

AGRADECIMIENTOS

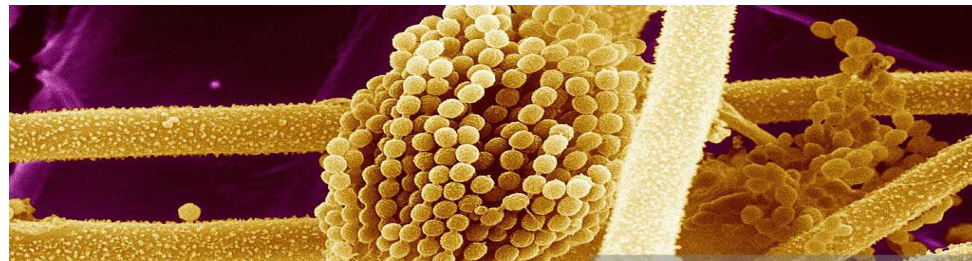
Al Instituto Politécnico Nacional proyecto SIP20172237 y al CONACyT por las becas otorgadas 598965 y 599292.

REFERENCIAS

Alberts JF, Gelderblom WCA, Botha A & van Zyl WH. 2009. Degradation of aflatoxin B1 by fungal laccase enzymes. *Int J Food Microbiol* 135: 47–52.

Anguiano, R. G. L. Verver, A., Cortina, V., Guzmán de PD. 2005. Inactivation of aflatoxin B1 and aflatoxin G1 through traditional "nixtamalización" of corn and their regeneration by acidification of corn dough. 47 (5): 1-7.

Bezalel L, Hadar Y, Fu PP, Freeman JP & Cerniglia C. 1996. Initial oxidation products in the metabolism of pyrene, anthracene, fluorine, and dibenzothiophene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microb* 62: 2554–2559



Collins PJ, Kotterman MJ, Field JA & Dobson AW. 1996 Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by laccases from *Trametes versicolor*. *Appl Environ Microb* 62: 4563–4567.

Hirai H, Nakanishi S & Nishida T. 2004. Oxidative dechlorination of methoxychlor by ligninolytic enzymes from white-rot fungi. *Chemosphere* 55: 641–645.

Idnurm, A., & Meyer, V. 2014. Welcome to Fungal Biology and Biotechnology. *Fungal Biology and Biotechnology*, 1:8.

Joshi DK & Gold MH. 1993 Degradation of 2,4,5-trichlorophenol by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microb* 59: 1779–1785.

Kamei I, Suhara H & Kondo R. 2005 Phylogenetical approach to isolation of white-rot fungi capable of degrading polychlorinated dibenzo-p-dioxin. *Appl Microbiol Biot* 69: 358–366.

Kent Loeffler. Cornell University. Available from <http://www.plantpath.cornell.edu/PhotoLab/> [fecha de revisión 10 marzo 2017].

Liu, X., Li, H., Xu, Z., Peng, J., Zhu, S., & Zhang, H. 2013. Development of hyperbranched polymers with non-covalent interactions for extraction and determination of aflatoxins in cereal samples. *Analytica Chimica Acta*, 797:40-49.

Loi, M., Fanelli, F., Zucca, P., Liuzzi, VC, Quintieri, L., Cimmarusti, MT, Mulè, G. 2016. Aflatoxin B1 and M1 Degradation by Lac2 from *Pleurotus pulmonarius* and Redox Mediators. *Toxins*. 8 (9): 245-265

Ogawa N, Okamura H, Hirai H & Nishida T. 2004 Degradation of the antifouling compound Irgarol 1051 by manganese peroxidase from the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Chemosphere* 55: 487–491.

Peralta, R. M., Polacchine da Silva, B., Gomes Córrea, R. C., Kato, C. G., Seixas, F. A., & Bracht, A. (2017). Enzymes from Basidiomycetes. Peculiar and Efficient Tools for Biotechnology. *Biotechnology of Microbial Enzymes*, 119-149.

Petersen, J. H. 2012. The Kingdom of fungi. New Jersey: FSC (online). Available from <http://www.plantpath.cornell.edu/PhotoLab/links.htm> [fecha de revisión 10 marzo 2017].

Scheidegger K. A. & Payne G. A. 2003. Unlocking the Secrets Behind Secondary Metabolism: A Review of *Aspergillus flavus* from Pathogenicity to Functional Genomics. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*. 22 (2-3): 423-459

Tamagawa Y, Hirai H, Kawai S & Nishida T. 2005. Removal of estrogenic activity of endocrine-disrupting genistein by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *FEMS Microbiol Lett* 244: 93–98.

Udomkun, P., Wiredu, A. A., Nagle, M., Müller, J., Vanlauwe, B., & Bandyopadhyay, R. 2017. An empirical evaluation of three vibrational spectroscopic methods for detection of aflatoxins in maize. *Food Control*, 76:127-138.

Wang, J., Ogata, M., Hirai, H., & Kawagishi, H. 2011. Detoxification of aflatoxin B1 by manganese peroxidase from the white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. *FEMS Microbiol Lett*, 314(2):164-169.

Weaver, U.-A. 2012. Mississippi state University Extension (online). Available from <http://extension.msstate.edu/news/feature-story/2012/corn-researchers-develop-field-aflatoxin-approach> [fecha de revisión 10 marzo 2017]

Yu, J., Bhatnagar, D., Ehrlich C. K. 2002. Aflatoxin biosynthesis. *Revista Iberoamericana de Micología*. 19:191-200