

## **PAPEL DE LA LACASA, AGENTES REDUCTORES Y SUSTANCIAS QUELANTES DE Fe<sup>++</sup> EN LA DEGRADACIÓN DE LIGNINA POR *Petriellidium fusoideum*.**

**Littman Gonzales Ríos**

Doctor por la Universidad de La Laguna. Profesor Principal de la Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, Iquitos, Perú.

[lgonzalesr20@unionvida.com](mailto:lgonzalesr20@unionvida.com)

**Miguel Angel Falcón Sanabria**

Doctor por la Universidad de La Laguna. Catedrático del Departamento de Microbiología y Biología Celular de la Universidad de La Laguna, Tenerife, España.

[mafalcon@ull.es](mailto:mafalcon@ull.es)

**Fernando Perstelo Rodríguez**

Doctor por la Universidad de La Laguna. Profesor Titular del Departamento de Microbiología y Biología Celular de la Universidad de La Laguna, Tenerife, España.

---

### **RESUMEN**

Un hongo ligninolítico ha sido aislado de suelos de la Amazonía Peruana. Su perfil enzimático reveló una lacasa como única enzima relacionada con el metabolismo de la lignina. Su inhibición parcial con ácido tioglicólico, también redujo la mineralización. La producción de radical hidroxilo fue detectado desde el primer día de incubación. Su inhibición involucra una disminución sustancial en la mineralización de lignina sintética. Además, el hongo produce una sustancia de bajo peso molecular libre de proteínas "SBPM" (1.6 kDa) que contiene 0.1% de Fe<sup>2+</sup>. Se ensayaron diferentes sistemas para elucidar la cooperación entre la lacasa y la SBPM en la producción de radicales hidroxilos ( $\cdot\text{OH}$ ). Asimismo, se ensayaron algunos sustratos reconocidos por la lacasa. En un intento de explicar la participación del hongo en la mineralización de la lignina, se propone un mecanismo hipotético para la generación de radical  $\cdot\text{OH}$  en este sistema.

**Palabras Claves:** Lignina; Lacasa; Mineralización; Etileno; Radical hidroxilo.

---

### **1. INTRODUCCIÓN**

De los más de 150 millones de toneladas de pulpa de madera que se procesan anualmente en el mundo, alrededor de 60 millones corresponden al polímero de lignina, cantidad

que se espera incrementar hasta alcanzar los 80 millones de toneladas en torno al año 2010 (Moreira *et al.*, 1997). Estos datos son más que elocuentes para reflexionar sobre la urgente necesidad de profundizar en el conocimiento relativo a la manipulación de este

subproducto, potencialmente peligroso, proveniente de las industrias papeleras (Call & Mücke, 1997).

La lignina es un polímero orgánico que, como indicaron Call & Mücke (1997), tras su “invención” por la naturaleza, ha experimentado un proceso de “optimización” a través del proceso evolutivo con fines estructurales y de protección, perdurables a lo largo del tiempo. Las consecuencias de este proceso pueden ser fácilmente apreciables cuando consideramos las severas condiciones fisicoquímicas a las que es preciso recurrir cuando se pretende atacar o modificar, con fines tecnológicos. Tradicionalmente, en la industria de la pulpa y del papel, principal destino de los materiales lignocelulósicos, la lignina ha sido eliminada de las fibras vegetales mediante técnicas fisicoquímicas (triturado o molienda mecánica, 1848; proceso sulfito, 1857; proceso sulfato o Kraft, 1879), de tal modo que la lignina residual presente en la pulpa se somete a una extracción o degradación posterior con agentes blanqueantes (derivados clorados, oxígeno u ozono; Viilo, 1994; Call & Mücke, 1997).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, si se compara las severas condiciones químicas de estos procesos técnicos con las suaves condiciones de reacción de las catálisis enzimáticas, no debería sorprender el hecho de que la comunidad científica haya tardado tanto tiempo en descubrir una vía para su enfoque alternativo. Pero, como en tantas otras ocasiones, la naturaleza proporciona el deseado procesador natural, es decir, los microorganismos ligninolíticos. De ahí que, desde hace mucho tiempo, las perspectivas biotecnológicas de estos microorganismos y sus enzimas hayan sido consideradas muy prometedoras, tanto en el desarrollo de métodos alternativos de deslignificación de la madera, pulpeo o blanqueo, como para el tratamiento de efluentes o la biorrecuperación de suelos y aguas subterráneas contaminadas.

En este sentido, el arranque definitivo se produjo con el descubrimiento de las enzimas ligninasa (Tien & Kirk, 1983; Glenet *et al.*, 1983) y manganeso peroxidasa (Kuwahara *et al.*, 1984), que junto a la ya conocida lacasa, podían dar lugar a diferentes equipos enzimáticos capaces de llevar a cabo la ligninólisis (Hattaka, 1994). Aunque, en un principio, se asumió que la presencia de una o varias de estas enzimas en los hongos estudiados, parecía ser suficiente para explicar su capacidad ligninolítica *in vitro*, pronto se comprobó que su intervención directa sobre el polímero *in situ* parecía más discutible. Como consecuencia de ello, las grandes expectativas asociadas con el descubrimiento de los sistemas enzimáticos anteriores, es decir, la posibilidad de desarrollar rápidamente un proceso de deslignificación biológica libre de células parecía inviable.

Tres años antes del descubrimiento de la ligninasa, Hall (1980) había propuesto que la degradación de la lignina tenía lugar a través del ataque de especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, el descubrimiento de la ligninasa pareció ocultar la hipótesis de Hall hasta que se comprobó la incapacidad de la misma para llevar a cabo el proceso *in situ*. Ante este evidente contratiempo y tras diferentes investigaciones, algunos autores demostraron la participación de factores no enzimáticos, que actuaban como mediadores, en la biodegradación de la lignina (Paszczynski *et al.*, 1988; Daniel, 1994; Evans *et al.*, 1994; Tanaka *et al.*, 1999a,b; Guillén *et al.*, 2000; Goodell *et al.*, 2001). Es decir, se producían sistemas enzima-mediador, que daban lugar a la formación de radicales de oxígeno (de acuerdo a la hipótesis de Hall) los cuales podían tener acceso a la molécula de lignina en las fibras vegetales. De este modo, podría explicarse el ataque al polímero *in situ*. Algunos de estos sistemas ya han sido patentados, como el Proceso Lignozym<sup>®</sup> descubierto por Call & Mücke (1997).

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Recolección y tratamiento de las muestras de suelos para el recuento y el aislamiento de microorganismos

En el presente trabajo se han utilizado como fuente de microorganismos ligninolíticos muestras de suelos de la Amazonía Peruana, recolectadas de zonas con abundantes desechos de serrín, provenientes de la industria maderera establecida en la ribera del Río Amazonas cercana a Iquitos, Perú

### 2.2. Medios de cultivo de enriquecimiento selectivos para el aislamiento de hongos potencialmente ligninolíticos

El medio de cultivo utilizado para el aislamiento de hongos potencialmente ligninolíticos, fue un medio definido, cuya composición se basa en la descrita previamente por Janshekar *et al.*, (1982), contenía por litro: 400 ml de una solución base, 400 ml de una solución que hemos denominado B, 40 mL de la solución tampón y agar purificado (20 g/L) como agente solidificante. La composición y preparación de cada una de las soluciones fue: Solución base (400 mL): PO<sub>4</sub>H<sub>3</sub> (2N) 10.9 mL; NH<sub>4</sub> NO<sub>3</sub> 0.496 g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.500g; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.100g; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 18.500mg; Solución de elementos traza 1.0 ml: Nitrilo triacetato 1.50g; MnSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1.00g; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1.00g; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 3.00g; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.01g; AlK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 0.01g; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.01g; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 0.01g. Solución B (400 ml): KOH 0.86 g; LKP 1.00 g; Solución de vitaminas 1mL: Biotina 2.0mg; Ácido fólico, (C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub>) 2.0mg; Tiamina.HCl (vitamina B<sub>1</sub>) 50.0 mg; Riboflavina (C<sub>17</sub>H<sub>2</sub>ON<sub>4</sub>O<sub>6</sub>) 5.0mg; Piridoxina.HCl 10.0mg; Cianocobalamina (vitamina B<sub>12</sub>) 0.1mg; Ácido nicotínico 5.0mg; DL-Pantotenato cálcico 5.0mg; p-aminobenzoico (PABA) 5.0 mg; Acido tiótico 5.0mg; Tampón (40 mL): El tampón utilizado fue el ácido

2,2 dimetilsuccínico-NaOH 0.75 M (pH 4,5).

La preparación del medio de cultivo se llevó a cabo esterilizando por separado en autoclave (121 °C, 20 minutos), la solución base y el agar, tras la cual ambas soluciones se reunieron y se le añadió la solución B y el tampón, esterilizados previamente por filtración (0.45 µm, Millipore). El pH del medio fue de 4.5.

### 2.3. Cultivo de *Petriellidium fusoidium* en medio líquido suplementado con ligninas naturales y sintéticas marcadas con <sup>14</sup>C

Entre los sustratos marcados radioisotópicamente con <sup>14</sup>C que se usaron en el transcurso del presente trabajo se incluyó una lignina natural, la lignina de madera triturada de paja de trigo (MWL-<sup>14</sup>C, actividad específica 21,300 dpm/mg). También se usaron tres muestras de ligninas sintéticas, dehidropolimerizados de alcohol coniferílico (DHP), de las cuales una fue marcada en el carbono β de la cadena lateral (DHP-<sup>14</sup>Cβ, actividad específica 280,000 dpm/mg), otra uniformemente en el anillo aromático (DHP-<sup>14</sup>C-anillo aromático, actividad específica 27,290 dpm/mg) y por último la marcada en el grupo metoxilo (DHP-O<sup>14</sup>CH<sub>3</sub>, actividad específica 186,600 dpm/mg). Todos los sustratos mencionados fueron preparados por el Radioisotopen Labor (Universität Göttingen, Germany) siguiendo la metodología descrita por Freudenberg y Neish (1968).

*Petriellidium fusoidium* fue cultivado en matraces erlenmeyer de 250 mL de capacidad, conteniendo 25 mL del medio de cultivo. La composición salina y los suplementos vitamínicos del medio ya fueron descritos en el apartado 2.2 y fue suplementado con glucosa (10 g/L) como fuente de carbono, y como fuente de nitrógeno L-asparagina 0.89 g/L y NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0.496 g/L. La LKP fue sustituida por los sustratos radioactivos arriba señalados. La preparación de cada una de las fuentes radioactivas se llevó a cabo

teniendo en cuenta su actividad específica para dar aproximadamente 200,000 dpm por matraz.

La preparación del inóculo se hizo a partir de una suspensión de esporas obtenida a través de sucesivas resiembras de la cepa. Tras ser incubadas a 28 °C durante 5 días el micelio fue retirado, añadiendo para ello una solución estéril de tween 80 (0.01 %), que posteriormente se filtró asépticamente a través de un embudo provisto de varias capas de gasa estéril. Una alícuota del filtrado fue añadida a un hematocímetro Bürker para realizar el recuento de esporas de la suspensión. Posteriormente, y en función de la concentración de éstas, se hacía la dilución apropiada, tal que, al inocular 1 mL de la misma a 25 ml de medio estéril, se alcanzasen en el medio alrededor de  $3.5 \times 10^5$  esporas/mL.

Todos los cultivos y sus correspondientes controles no inoculados fueron realizados por triplicado e incubados durante 12 días a 28°C con agitación (70 rpm, agitador rotatorio, KIKA KS501 digital).

#### 2.4. Valoración de la mineralización

La degradación de los sustratos radioactivos se estimó como la mineralización a  $^{14}\text{CO}_2$ , expresada como porcentajes de la radioactividad total añadida a los cultivos. La recuperación del  $^{14}\text{CO}_2$  liberado como consecuencia de la degradación se efectuó atrappando dicho gas en una disolución de NaOH al 10% (1 mL), contenida en una cazoleta de vidrio soldado a una varilla, que pendía de los tapones de látex con los que se cerraron hermeticamente los matraces (Trojanowski & Hüttermann, 1987). Dicha disolución se retiró diariamente y la cazoleta se lavó dos veces con agua estéril (0.5 mL). La disolución de NaOH se reunió con el agua de los lavados y la radioactividad de la mezcla se midió en un contador  $\beta$  de centelleo líquido (LKB Wallac, modelo Rack Beta 1214), utilizando líquido de centelleo Optiphase Hisafe 3 (4 mL).

#### 2.5. Detección de actividades enzimáticas producidas por *P. fusoidium*

Con el fin de estudiar la producción, por parte de *Petriellidium fusoidium*, de actividades enzimáticas tradicionalmente implicadas en la ligninólisis, este hongo fue cultivado en el medio descrito en el apartado 2.3.

Los cultivos de *Petriellidium fusoidium* (25 ml en matraces erlenmeyer de 250 ml) fueron incubados durante 30 días. El micelio fue separado periódicamente (cada 2 ó 3 días) por filtrado a través de varias capas de gasa y posteriormente el sobrenadante se centrifugó (10 min, 15,000 rpm, centrífuga Beckmann J2 HS) a 4 °C. Se valoraron en los sobrenadantes resultantes, las actividades enzimáticas implicadas en la ligninólisis.

Todas las actividades fueron expresados en miliunidades (mU). Una unidad de actividad se define como la oxidación de 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto.

##### 2.5.1. Actividad lignina peroxidasa (LiP, EC 1.11.1.14)

Esta actividad se valoró siguiendo el incremento de la absorbancia debido a la formación de veratraldehído ( $\epsilon_{310} = 9,300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) dependiente de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a partir del alcohol verátrico. El sustrato se añadió a la mezcla reactiva (1 mL), a una concentración 2 mM, en tampón tartrato sódico 0.1 M, pH 3.5, tal como describieron Tien y Kirk (1984). La reacción se inició por adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.4 mM, y el blanco se preparó en ausencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

##### 2.5.2. Actividad manganeso peroxidasa (MnP, EC 1.11.1.13)

La valoración de esta actividad se llevó a cabo utilizando como sustratos 2,6-dimetoxifenol (DMP),  $\text{MnSO}_4$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Perie y Gold, 1991). El DMP 4 mM, es oxidado por el  $\text{Mn}^{3+}$  (producto de la oxidación del  $\text{MnSO}_4$  0.1 mM, por la MnP) en presencia de tampón tartrato sódico 100 mM, pH 4.5. La reacción

(volumen de la mezcla reactiva 1 mL) se inició por la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.4 mM, y el producto de la oxidación resultante se siguió espectrofotométricamente a 468 nm ( $\epsilon_{468} = 10,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

### 2.5.3. Actividad lacasa (EC 1.11.1.14)

Se valoró utilizando como sustrato 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato) (ABTS) 2 mM, en tampón succinato sódico 0.1 mM, pH 4.5 (volumen de la mezcla reactiva 1 mL). El producto resultante de la oxidación, el radical catiónico del ABTS, se siguió espectrofotométricamente como incremento de la absorbancia a 420 nm ( $\epsilon_{420} = 36,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (Palmieri *et al.*, 1993).

La lacasa también fue valorado siguiendo la oxidación del DMP 4 mM en tampón tartrato sódico 100 mM, pH 4.5. El producto de oxidación fue valorado espectrofotométricamente como incremento de la absorbancia a 468 nm ( $\epsilon_{468} = 10,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (Haars *et al.*, 1981).

### 2.5.4. Actividad aril alcohol oxidasa (AAO, EC 1.1.3.7)

Se determinó siguiendo el incremento de la absorbancia a 310 nm debido a la formación del veratraldehído ( $\epsilon_{310} = 9,300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) resultante de la oxidación del alcohol verátrico (3,4-dimetoxibencílico) añadido a una concentración de 2 mM a la mezcla reactiva (1 mL), que contenía tampón tartrato sódico 50 mM, pH 4.5 (Bourbonnais & Paice, 1988).

### 2.5.5. Reducción del citocromo C

La reducción del citocromo C (75  $\mu\text{M}$ ) fue seguido por el incremento de la absorbancia a 555 nm ( $\epsilon_{555} = 20,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). El sustrato se disolvió en tampón tartrato sódico 50 mM, pH 6 (volumen final de la mezcla reactiva 1 mL, McCord & Fridovich, 1968).

### 2.5.6. Actividad celobiosa deshidrogenasa o CBQ-oxido-reductasa

Se valoró empleando como sustrato celobiosa 100  $\mu\text{M}$  y como aceptor de electrones el diclorofenol indo fenol (DCPIP) a una concentración de 25  $\mu\text{M}$  en presencia de tampón succinato 20 mM, pH 4.5. La reducción del DCPIP fue seguida espectrofotométricamente, como un incremento de la absorbancia a 515 nm ( $\epsilon_{515} = 6,800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , Renganathan *et al.*, 1990).

### 2.5.7. Actividad catalasa

La actividad catalasa fue valorada como el incremento en la concentración de oxígeno en la mezcla reactiva (3 mL) generado a partir del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.4 mM en tampón tartrato sódico 50 mM, pH 5. Dicho incremento se determinó en un monitor de oxígeno biológico (YSI modelo 5300, Yellow Springs Instrument Co, Inc. Ohio USA) después de equilibrar la muestra durante 2 minutos (Dallmier y Martin, 1990).

### 2.5.8. Actividad glucosa oxidasa

Se valoró siguiendo lo descrito en el apartado 2.5 del presente capítulo. La mezcla reactiva contenía: D-glucosa 100 mM, peroxidasa de rábano 60 U/mL, o-dianisidina 0.1 mM y 0.5 mL de extracto celular en tampón tartrato sódico 3.3 mM, pH 4.5. La oxidación de la o-dianisidina fue seguido como incremento en la absorbancia producido a 460 nm ( $\epsilon_{460} = 20,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

### 2.6. Valoración de actividad lacasa asociada al micelio

Para detectar la actividad lacasa asociada al micelio, se pesaron 100 mg de éste (peso húmedo) y se incubaron con DMP (4 mM) a 28 °C y agitación en tampón tartrato sódico 0.1 M, pH 4.5, durante diferentes periodos

de tiempo (0 - 12 h). La actividad lacasa se determinó en el sobrenadante del ensayo realizado, valorándose como se indica en el apartado 2.5.3. Como control se empleó el micelio hervido.

### 2.7 Reducción de 2,6-dimetoxi-1,4-benzoquinona (DBQ)

La reducción de la DBQ se realizó en base a las recomendaciones de Guillén (2000).

El micelio de *Petriellidium fusoidesum*, fue lavado y pesado (alrededor de 1.3 g), envuelto en gasa e incubado en tampón acetato 40 mM, pH 4.5 en matraces de Monod de 100 ml capacidad con un volumen de mezcla de 25 mL. Los matraces con la mezcla fueron sellados con tapones de silicona, purgados con N<sub>2</sub> durante 5 min, tras lo cual se añadió 500 µM de DBQ con ayuda de una jeringa Hamilton de 1 ml. Los matraces fueron incubados a 28°C con agitación. Con micelio hervido se procedió de forma similar. La reducción de la DBQ fue seguida a 397 nm (Spectronic 20 BAUSCH LOMB) con intervalos de tiempo de 5 min y la concentración final de quinona fue calculada en base a una recta de calibrado ( $y = 4.915 \times 10^{-5}c + 4.406 \times 10^{-4}$ ,  $r = 0.99$ )

### 2.8 Oxidación del ácido 2-ceto-4-tiometilbutírico (KTBA) en los cultivos

La producción de etileno a partir del KTBA añadido al medio se ha utilizado como índice de la generación de radicales ·OH en los cultivos de *Petriellidium fusoidesum*. Con este fin el hongo fue cultivado durante 10 días en condiciones óptimas de ligninólisis descritas en el apartado 2.3 del presente capítulo sustituyendo la LKP por MWL de paja de trigo o DHP, inactivos. Cada día desde el inicio del cultivo, se añadieron 0.25 mL de KTBA 0.2M a tres matraces conteniendo 25 mL de cultivo (concentración final, 2 mM). Seguidamente los tapones de algodón de estos matraces fueron reemplazados con ta-

pones de silicona (ALDRICH, D.I. 25.5 mm) y se incubaron a 28 °C durante 24 horas con agitación. Finalmente, se retiró 1 mL de gas del espacio superior de cada uno de estos matraces y la concentración de etileno fue medida directamente por cromatografía de gases (Shimadzu GC- 8A). Los cromatogramas fueron obtenidos en un lector Shimadzu Chromatopac C-R6A (Enoki *et al.*, 1989).

El área del cromatograma de cada muestra, se llevó a una recta de calibrado para determinar su concentración de etileno. Dicha recta ( $y = 988.89c - 353.05$ ,  $r = 0.99$ ) se elaboró inyectando en el cromatógrafo de gases diferentes cantidades de etileno en aire (100-1000 µL) suministrado por Supelco (SCOTTY II, Cat. N° 501379). La concentración del gas fue 10 PPM en 14 L contenido en una botella bajo presión.

### 2.9 Efecto de secuestradores de especies activas de oxígeno (O<sub>2</sub>· y ·OH) sobre la mineralización de lignina natural y sintética marcadas con <sup>14</sup>C

Los cultivos fueron preparados e inoculados conforme a lo descrito en el apartado 2.3. Se emplearon MWL-<sup>14</sup>C de paja de trigo y DHP-<sup>14</sup>Cβ en lugar de LKP. Todos los cultivos se iniciaron con 200,000 dpm. Los secuestradores de radicales ·OH se añadieron a las siguientes concentraciones: catecol 10 µM (Tanaka *et al.*, 1999a), tiourea 1 mM (Kutsuki & Gold, 1982), benzoato de sodio 1 mM (Forney *et al.*, 1982). En los cultivos con DHP-<sup>14</sup>Cβ, aparte de los secuestradores de ·OH se añadieron también SOD 80 µg/ml y azida de sodio 1.5 µM (Regalado *et al.*, 1999). Los productos nombrados se añadieron al primer y cuarto día de cultivo para MWL-<sup>14</sup>C y DHP-<sup>14</sup>Cβ respectivamente. La mineralización fue seguida durante 10 días en base a lo descrito en el apartado 2.4.

Todos los cultivos y sus correspondientes controles sin secuestrador fueron realizados por triplicado e incubados a 28°C.

## **2.10 Purificación y caracterización parcial de una sustancia de bajo peso molecular de cultivos de *Petriellidium fusoidium***

En base a los estudios de Tanaka *et al.*, (1999), en los sobrenadantes de los cultivos, diariamente, durante 10 días, fueron precipitados con acetona una sustancia de bajo peso molecular (SBPM), seguidamente fue liofilizada.

### **2.10.1 Valoración del contenido de proteínas de la sustancia de bajo peso molecular**

La valoración de proteínas se efectuó en el producto liofilizado y en los precipitados de 10 días de cultivo, antes de ser filtrados en la columna con Sephadex G-50. Para ello se empleó el método de Bradford.

### **2.10.2 Determinación del hierro de la sustancia de bajo peso molecular**

La determinación de hierro se realizó empleando Ferrozina [3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazina] como reactivo según describe Stookey (1970). Este compuesto reacciona con hierro divalente (Fe<sup>++</sup>) para formar una especie compleja de color magenta, estable, que se utiliza para determinar directamente el hierro en el agua.

### **2.11 Reacción de agentes reductores con la SBPM**

La capacidad de la sustancia de bajo peso molecular para generar etileno fue evaluada en mezclas reactivas que contenían: KTBA 3 mM, los agentes reductores (ácido ascórbico ó NADH, ambos a 1 mM) en tampón acetato 40 mM, pH 4,6 y diferentes concentraciones de la sustancia de bajo peso molecular liofilizada (1-3 mg). Los controles contenían todos los productos antes mencionados pero sin la sustancia. El volumen

total de la mezcla reactiva fue de 1 mL. Dicho volumen lo contenía un tubo de vacío «vacutainer» de 6 mL de capacidad. Antes de iniciar la incubación (28 °C, 24 h y con agitación), las mezclas reactivas fueron purgadas con oxígeno al 100% durante 5 min y seguidamente cerrados herméticamente con los tapones de silicona. Transcurrido las 24 horas se extrajo 1 mL de gas del espacio superior del tubo y fueron analizados directamente el etileno como se indica en el apartado 2.8.

### **2.12 Efecto de secuestradores de especies activas de oxígeno (O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y ·OH) sobre la generación de etileno de KTBA**

Para evaluar el efecto de los secuestradores de ·OH sobre la generación de etileno a partir del KTBA, se empleó el protocolo descrito en el apartado 2.11, en presencia de ácido ascórbico 1 mM como agente reductor y 1 mg de sustancia de bajo peso molecular. Se emplearon los siguientes secuestradores a las concentraciones que se indican: benzoato de sodio 10 mM, tiourea 10 mM, SOD 450 U, catalasa 6 U. Los controles no llevaron ninguno de los secuestradores nombrados y se incluyó un control adicional insuflado de nitrógeno.

### **2.13 Efecto de la lacasa sobre la producción de etileno de KTBA**

Se ensayó el efecto de dos lacasas sobre la generación de etileno a partir de KTBA: una purificada del hongo *Pyricularia oryzae* (Sigma) y la otra parcialmente purificada de *Petriellidium fusoidium*. En ambos casos se usaron 1.62 mU en presencia y ausencia de ácido ascórbico (1 mM) y la sustancia de bajo peso molecular (1 mg·mL<sup>-1</sup>). El control no llevó lacasa. El protocolo seguido para valorar el etileno fue similar a lo descrito en el apartado 2.11.

## 2.14 Producción de etileno a partir de KTBA en presencia de micelio lavado y efecto de secuestradores de especies activas de oxígeno

El micelio obtenido según lo descrito en el apartado 2.6 fue pesado (alrededor de 0,1 g) y colocado en un tubo de vacío «vacutainer» a la cual se añadió tampón acetato 40 mM, pH 4.5 y DBQ 500  $\mu$ M en un volumen total de 1 ml. Después de la adición de DBQ, los tubos fueron sellados con tapones de silicona e inmediatamente purgados con N<sub>2</sub> por 2 min. Transcurrido el tiempo se incubaron durante 30 min a 28 °C y con agitación hasta conseguir la reducción completa de la DBQ, tras la cual se destaparon para que ingresara el oxígeno, luego se añadió 3 mM de KTBA completando de esta manera 1 mL de mezcla reactiva. Se volvieron a sellar las tapas y se continuó con la incubación durante 24 h antes de proceder a valorar la producción de etileno en base a lo descrito en el apartado 2.11. En forma similar se procedió con micelio hervido, lacasa de *P. fusoidium* 0.54 mU, 1 mg de sustancia de bajo peso molecular, benzoato de sodio y tiourea ambos a 10 mM, SOD 450 U, catalasa 6 U, ácido tioglicólico 2 mM y azida de sodio 1 mM.

## 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Aislamiento y selección de microorganismos ligninolíticos

En el presente trabajo se ha realizado un screening de nuevos microorganismos ligninolíticos a partir de muestras tomadas de suelos que contenían abundantes desechos de serrín provenientes de la industria maderera establecida en la margen izquierda del Río Amazonas, cercana a Iquitos-Perú.

Se cultivaron en medios de enriquecimiento-selectivos como el medio LKP, donde la fracción polimérica de lignina de Kraft fue la única fuente de carbono y energía.

Después de observar las características morfológicas de las colonias que crecieron en los medios de enriquecimiento, se seleccionaron aquellas cepas de hongos que crecieron abundantemente en los citados medios a 28 °C. Particularmente, dado el objetivo de este trabajo, se puso especial interés en las que exhibieron un crecimiento abundante en dichos medios. Así, se seleccionaron 4 cepas fúngicas: *Trichoderma koningii* Oudemans, *Petriellidium fusoidium* von Arx, *Aspergillus fumigatus* Fresenius, *Trichoderma longibrachiatum* Rifai. Sus identificaciones fueron realizadas por la Mycotheque de la Université Catholique de Louvain. Laboratorio de Mycologie Systematique et Applique, Louvain-la-Neuve (Bélgica).

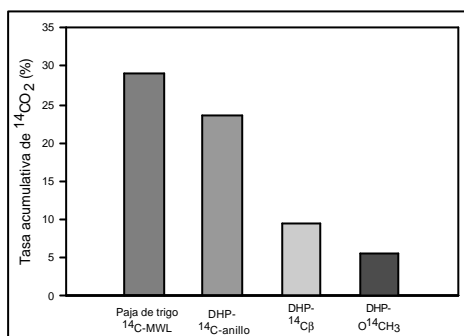
Para un estudio más exhaustivo se eligió a *Petriellidium fusoidium* por ser un hongo nuevo, que aún no ha sido descrito como ligninolítico. Este hongo según el Laboratorio que lo identificó, ha sido caracterizado por un estado teleomórfico de Microascaceae y ha desarrollado dos formas anamórficas: *Scedosporium* y *Graphium* (synnema).

### 3.2. Degradación de ligninas sintéticas y naturales marcadas con <sup>14</sup>C

Para confirmar el carácter ligninolítico de *Petriellidium fusoidium*, el hongo se cultivó frente a ligninas naturales y sintéticas marcadas con <sup>14</sup>C, lo que nos ha permitido valorar su capacidad de mineralización a <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> que, según se ha descrito es una prueba inequívoca para establecer el carácter ligninolítico de una cepa.

Tras 30 días de incubación, *Petriellidium fusoidium* produjo una mineralización cercana al 30 % de una muestra de la MWL-<sup>14</sup>C de paja de trigo. En cuanto a las ligninas sintéticas, en el mismo periodo de tiempo, el hongo mineralizó un 23.6 % del DHP-<sup>14</sup>C-anillo, un 9.5 % del DHP-<sup>14</sup>C $\beta$  y un 5.7 % del DHP-O<sup>14</sup>CH<sub>3</sub> (Figura 1).





**Figura 1:** Porcentajes de mineralización producidos por *Petriellidium fusoideum*, después de 30 días de incubación con distintas ligninas marcadas con <sup>14</sup>C. Se incluyeron muestras de: MWL-<sup>14</sup>C de paja de trigo y las ligninas sintéticas: DHP-<sup>14</sup>C-anillo, DHP-<sup>14</sup>Cβ y DHP-O<sup>14</sup>CH<sub>3</sub>.

Es importante destacar la mineralización obtenida en los cultivos suplementados con DHP-<sup>14</sup>C-anillo, que en este caso supera a la valorada en cultivos suplementados con DHP-<sup>14</sup>Cβ (23.6 frente a 9.5 %). Debe decirse que ambos cultivos fueron realizados con una concentración inicial de, aproximadamente, 1.4 x 10<sup>5</sup> dpm por matraz.

### 3.3. Screening de actividades enzimáticas relacionadas con la degradación de ligninas en cultivos de *P. fusoideum*.

Una vez establecido el carácter ligninolítico de *Petriellidium fusoideum* y determinadas las condiciones de cultivo que promueven las mayores tasas de degradación, así como la capacidad del hongo para atacar diferentes preparaciones de lignina, se procedió al estudio de sus actividades enzimáticas, con el fin de determinar su implicación en la ligninólisis.

Las valoraciones enzimáticas llevadas a cabo pusieron de manifiesto la ausencia de actividades tales como peroxidasas (LiP y MnP) y oxidasas (AAO, CQOR, glucosaoxidasa) (Tabla 1). Sin embargo, se detectó una actividad capaz de oxidar al ABTS y DMP en ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y MnSO<sub>4</sub>. Ya que la adición de esos compuestos a las mezclas reactivas que contenían dichos sustratos no alteran la cuantía del producto formado, como hubiese ocurrido de ser una MnP, pensamos que la citada actividad es una fenoloxidasa, y probablemente se trate de una lacasa. Su actividad máxima en los sobrenadantes de los cultivos fue de 1.49 mU.mL<sup>-1</sup> (Tabla 1).

**Tabla 1:** Actividades enzimática extracelulares producidas por *Petriellidium fusoideum* tras 17 días de incubación. Los medios fueron suplementados con lignina de Kraft (1 mg.mL<sup>-1</sup>).

Ensayos enzimáticos	Actividad en los sobrenadantes del cultivo (mU.mL <sup>-1</sup> )	Actividad en los sobrenadantes concentrados (10x) (mU.mL <sup>-1</sup> )
Peroxidasas (LiP, MnP)	-	-
Fenoloxidasa (lacasa)	1,49	17,75
Oxidasas (AAO, CQOR, glucosaoxidasa)	-	-
Catalasa	-	-
Reducción del cirocromo C	-	-

El papel de la lacasa en los distintos hongos que la producen es controvertido, pero desde el punto de vista de nuestro estudio, resulta adecuado referirnos a los trabajos de Ander & Erikson (1976) en los que se demuestra, claramente, que mutantes de *Sporotrichum pulvurulentum* deficientes en lacasas (lac<sup>-</sup>) tenían poca habilidad para degradar la lignina. Sin embargo la recuperación de esta característica en tales cepas, implicó su mayor capacidad para degradar el sustrato. Más recientemente Eggert *et al.*, (1996a, 1997) han realizado estudios en *Pycnoporus cinnabarinus*, en el que se revelan resultados equivalentes a los comentados anteriormente en el trabajo de Ander & Eriksson. Debe mencionarse también aquí el trabajo de Nutsbidze *et al.*, (1998), en el que se propone también el papel de la lacasa de *Trametes cingulata* en la degradación de la lignina.

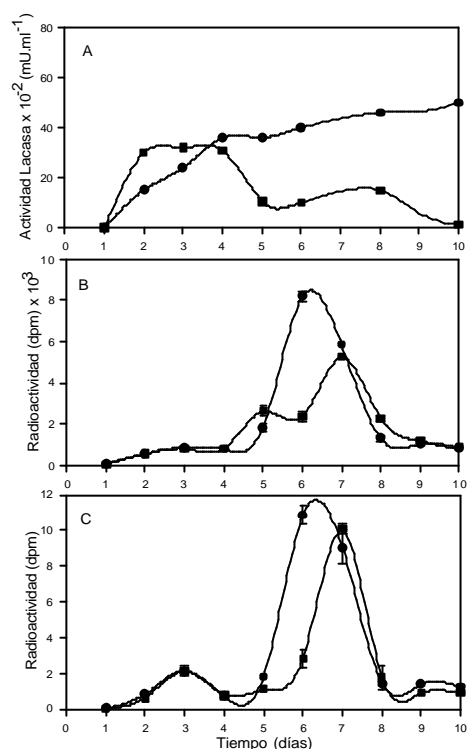
Dado que *Petriellidium fusoides* produce solamente una lacasa puede considerarse como un organismo modelo para estudiar el papel de dicha proteína en la degradación.

### 3.4. Efecto de la inhibición de la lacasa detectada en los cultivos de *P. fusoides* sobre la mineralización de ligninas sintéticas marcadas <sup>14</sup>C

En los cultivos de *P. fusoides* suplementados con DHPs no radioactivos, la inhibición de la actividad lacasa correlacionó con la inhibición de la mineralización detectada en los cultivos suplementados con DHP-<sup>14</sup>C. Así, la adición de ácido tioglicólico (4<sup>o</sup> día de incubación) provocó una disminución de la actividad lacasa del 72 % (valorada 24 horas después de añadir el inhibidor), en comparación con la detectada en los cultivos controles (Figura 2A). El valor del porcentaje de inhibición indicado coincidió con el valor obtenido para la tasa de mineralización detectada en los cultivos suplementados con una lignina sintética: DHP-<sup>14</sup>C (Figura 2B).

Un experimento similar realizado con DHP-<sup>14</sup>C-anillo puso también de manifiesto que un descenso del 72 % de la actividad lacasa, se acompañó transcurridas 24 h, con un descenso de la mineralización del 74 % (Figura 2C).

Por tanto, en los dos casos estudiados hay un desfase de 24 h entre el efecto inhibitorio del ácido tioglicólico sobre la actividad lacasa y la inhibición de la mineralización en los cultivos suplementados con ligninas marcadas con <sup>14</sup>C (Figuras 2, B y C).



**Figura 2:** Relación entre la inhibición de la actividad lacasa, en cultivos de *P. fusoides* suplementados con DHP no radioactivos (A) y la inhibición de la mineralización de un DHP-<sup>14</sup>Cβ (B) y un DHP-<sup>14</sup>C-anillo (C), tras la adición de ácido tioglicólico (2 mM). Controles sin ácido tioglicólico (●), cultivos con ácido tioglicólico (■). Las flechas indican el día en que se añadió el inhibidor de lacasa.

Durante muchas décadas, se ha debatido el tema del papel de la lacasa en la degradación de la lignina. La pregunta clave ha sido si la lacasa produce o no la deslignificación. Esta cuestión, hasta ahora, no ha sido totalmente aclarada (Thurston, 1994; Bourbonnais *et al.*, 1995).

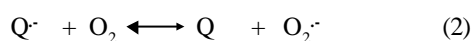
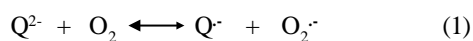
Ha sido aceptado que la participación de la lacasa en la degradación de la lignina sólo se limita a la oxidación de unidades de lignina fenólica, que comprende solamente del 10 al 20 % del polímero. Sin embargo, durante la pasada década, ha sido demostrado que la lacasa puede también oxidar las unidades de lignina no fenólica en presencia de ciertos compuestos, conocidos como mediadores, que incluye sustratos artificiales (Bourbonnais & Paice, 1990; Call & Mücke, 1997) y metabolitos del hongo (Eggert *et al.*, 1996b).

Los mediadores naturales son importantes puesto que las enzimas ligninolíticas tienen que actuar indirectamente durante las primeras fases de la degradación de la pared celular de las plantas debido a las limitaciones del tamaño de poro entre las fibras que componen la pared celular (Flournoy *et al.*, 1991; Flournoy *et al.*, 1993). Otras pequeñas moléculas o agentes que participan en la degradación de la lignina, producidos directamente o indirectamente incluyen iones mangánicos (Mn<sup>3+</sup>) (Hammel *et al.*, 1989; Wariishi *et al.*, 1991; Joseleau *et al.*, 1994), el radical catión producido a partir del veratril alcohol, un metabolito fúngico (Harvey *et al.*, 1986) o especies activas de oxígeno tal como el ·OH y el O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Backa *et al.*, 1993; Gierer *et al.*, 1994; Joseleau *et al.*, 1994). También pueden incluirse en este apartado la producción de compuestos de bajo peso molecular que actúan como quelantes de Fe<sup>2+</sup> y que son producidos por algunos basidiomicetos (Tanaka *et al.*, 1999a).

Por tanto es de esperar el hallazgo de algunos de esos mediadores en los cultivos del hongo que aquí se estudia. Por los comentarios que a continuación haremos, parece lógico pensar que dichos mediadores

estuvieran relacionados con radicales de oxígeno. Por eso nos parece oportuno señalar aquí que dentro del rango de sustratos oxidables por la lacasa se encuentran las hidroquinonas (Chefetz *et al.*, 1998).

El ciclo redox de las quinonas es un fenómeno que ha sido mostrado en varios sistemas biológicos (Kappus & Sies, 1981). En el curso del ciclo redox, una quinona es reducida a semiquinona o hidroquinona. En presencia de O<sub>2</sub> los productos de reducción de la quinona son autooxidados para regenerar la quinona, mientras que el O<sub>2</sub> es reducido a O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Öllinger *et al.*, 1990).

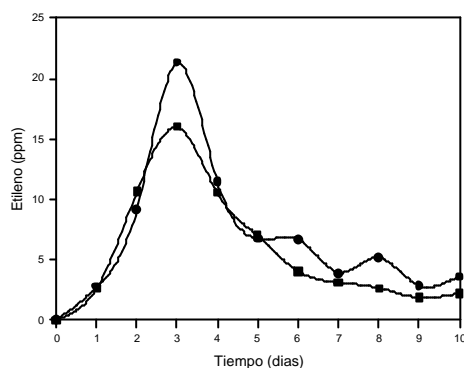


### 3.5. Detección de especies activas de oxígeno en los cultivos de *P. fusoidium*

Dado que el hongo produce lacasa y que su inhibición parcial provoca, aunque con un retraso de 24 h, efectos inhibitorios en la mineralización, nos planteamos la búsqueda de otro componente del sistema ligninolítico de este hongo, que pudiera estar implicado en la degradación y consecuentemente en la mineralización de las ligninas estudiadas. De los posibles componentes, el candidato más plausible sería el ·OH, en cuya formación puede estar implicada la lacasa ya detectada.

#### 3.5.1. Producción de etileno a partir de la oxidación del ácido 2-ceto-4-tiometilbutírico (KTBA) como índice de la generación de ·OH en los cultivos de *P. fusoidium*

El KTBA se añadió desde los primeros días a los cultivos suplementados con MWL de paja de trigo o con DHP inactivos, respectivamente. La producción de etileno se valoró, posteriormente, durante 10 días. Su producción fue continua durante el periodo de incubación, pero alcanzó su valor máximo al tercer día en ambos casos (Figura 3).



**Figura 3:** Producción de etileno detectada mediante cromatógrafo de gases, a partir del KTBA añadido en cultivos de *P. fusoidium*. Los cultivos fueron suplementados con DHP (●) y con MWL de paja de trigo (■) no marcados.

Como se observa en la reacción 1 y 2, en el curso del ciclo redox de las quinonas se genera el radical anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). Dicho radical, no tiene el potencial reductor como para actuar sobre el polímero de la lignina, provocando la rotura de sus enlaces o la apertura de sus anillos. Este papel se le atribuye al  $\cdot OH$ . Sin embargo, algunas reacciones relevantes involucradas en la degradación de la lignina pueden ser causadas por el  $O_2^{\cdot-}$  que dependiendo de la disponibilidad de dianas adecuadas, puede actuar como un agente oxidante o reductor. Como oxidante es capaz de reaccionar con  $Mn^{2+}$  produciendo  $Mn^{3+}$  (Archibald & Fridovich, 1982). El  $O_2^{\cdot-}$  puede también reaccionar con radicales producidas por enzimas ligninolíticas, conduciendo a la apertura de anillos o desmetoxilación (Haemmerli *et al.*, 1987; Gierer *et al.*, 1994). Otra de las características del  $O_2^{\cdot-}$  es que puede participar en la producción de  $H_2O_2$  por dismutación



Finalmente, el  $O_2^{\cdot-}$  puede también estar involucrado en la producción de  $\cdot OH$  a tra-

vés de la reacción Haber-Weiss catalizado por ion metálico. Su proceso global es:



Así pues, parece interesante la búsqueda de estos radicales en los sobrenadantes de los cultivos de *Petriellidium fusoidium*.

Los métodos para detectar la producción de  $\cdot OH$  suelen utilizar sondas moleculares que rinden productos químicamente detectables después de la reacción con los  $\cdot OH$ . Entre las sondas más efectivas tenemos el ácido benzoico, el ácido 2-ceto-4-tiometilbutírico (KTBA), el triptófano, el dimetilsulfóxido (DMSO) (Halliwell & Gutteridge, 1987) y la hidroxilación del ácido 4-hidroxibenzoico (Forney *et al.*, 1982). Cualquiera de esos compuestos sería adecuado para detectar  $\cdot OH$  en un sistema donde estos se generen.

Para evaluar la producción de  $\cdot OH$  en cultivos ligninolíticos de *Petriellidium fusoidium*, hemos utilizado el KTBA.

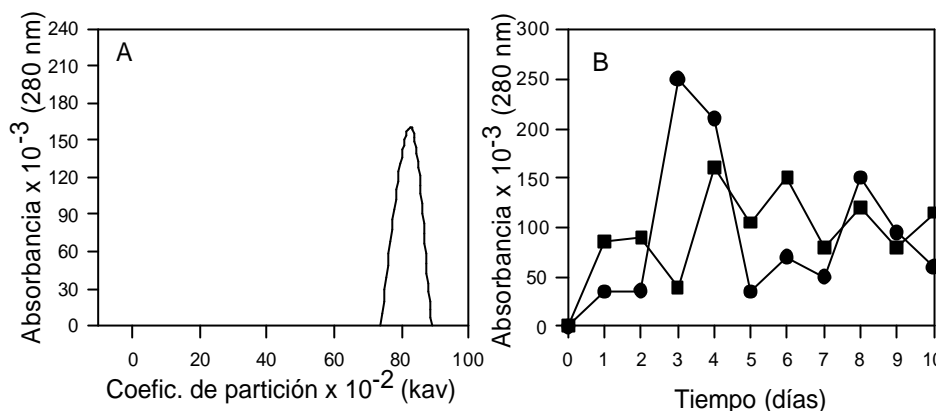
### 3.6. Detección de compuestos de bajo peso molecular, mediadores de la degradación de lignina, en los cultivos de *P. fusoidium*.

Considerando los trabajos en los que se han descrito compuestos que ligan  $Fe^{++}$  y que cooperan con fenoloxidasas como mediadores en la producción de  $\cdot OH$  (Enoki *et al.*, 1989; Tanaka *et al.*, 1999a y b), procedimos a su búsqueda en los cultivos de *Petriellidium fusoidium*.

Como se indicó en el apartado 2.10 se recogieron diariamente y durante todo el periodo de incubación, los sobrenadantes de los cultivos incubados con MWL de paja de trigo y DHP. El perfil de elución de cada uno de los extractos ensayados, reveló un producto con un  $K_{av}$  de 0.83 (Figura 4A). Si se atiende a los valores del área correspondiente a la absorbancia de dicho producto, su máximo valor se alcanzó en las muestras correspondientes al tercer día de incubación. Ello

tanto en los extractos provenientes de cultivos suplementados con el DHP como en los suplementados con la MWL de paja de trigo

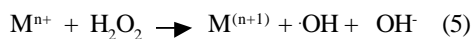
(Figura 4B). No se detectó ningún otro pico en los cromatogramas estudiados.



**Figura 4:** Perfil de elución de la SBPM (A) detectado por cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G-50; 85 x 2,5 cm) del extracto crudo proveniente del cuarto día de incubación de *P. fusoidium* en medios con MWL de paja de trigo. B: Valores máximos de la concentración de la SBPM ( $\lambda=280$  nm) en los distintos extractos crudos ensayados durante el periodo de incubación. Medios con MWL de paja de trigo (●) y con DHP (■), no marcados. Patrones: a) citocromo C (12,5 kDa), b) aprotinina (5,5 kDa), c) somatostatina (1,6 kDa).

Para solubilizar y secuestrar hierro en estado férrico, muchos organismos han desarrollado sistemas eficaces de alta afinidad de adquisición de hierro (Neilands, 1974; Neilands *et al.*, 1987). La producción de quelantes con alta afinidad por el hierro permite a los microorganismos competir por metales que se encuentran de manera limitada en el medio.

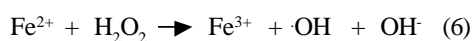
La mayor parte del OH generado *in vivo*, excepto durante excesiva exposición a radiación ionizante, proviene de la degradación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mediada por un metal, de acuerdo a la siguiente ecuación:



En la que M<sup>n+</sup> es un ion metálico. M<sup>n+</sup> puede ser Titanio(III), Fe<sup>2+</sup>, Cobalto(II), Cromo, Vanadio, Niquel o Cobre(I), pero proba-

blemente la formación del  $\cdot OH$  *in vivo* unicamente depende del Fe<sup>2+</sup> bajo condiciones normales (Halliwell y Gutteridge, 1990).

La descomposición dependiente del Fe<sup>2+</sup> del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (la denominada reacción Fenton) usualmente es escrita como



Se dijo también que el radical hidroxilo puede ser generado en presencia de metales por la reacción Haber-Weiss (reacción 4). Es conocida que esta reacción se lleva a cabo a través de la reducción del hierro en estado férrico por el O<sub>2</sub><sup>·-</sup> con oxidación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por el hierro en estado ferroso resultante para producir  $\cdot OH$ . En este tipo de reacción probablemente tenga participación la sustancia de bajo peso molecular aislada de cultivos de *Petriellidium fusoidium*. En apartados

posteriores se tratará con más detalle este aspecto.

### 3.7. Producción de etileno en un sistema constituido por ácido ascórbico y KTBA en relación con la adición de la lacasa y la SBPM de *P. fusoidium*

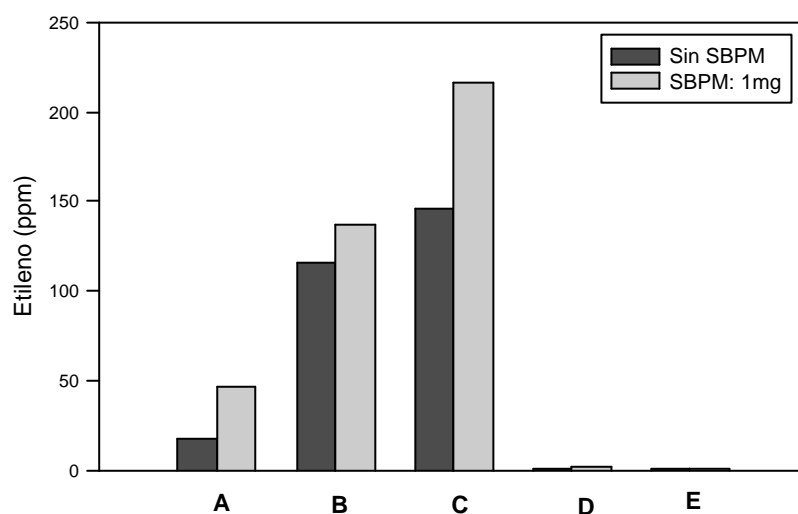
En este sistema se usó el ácido ascórbico como agente reductor y como sustrato de la lacasa. El último aspecto había sido considerado por otros autores (Yarapolov *et al.*, 1994; Call & Mücke, 1997). La mezcla reactiva básica contenía, además del citado ácido, KTBA y tampón acetato sódico a una concentración de 40 mM, pH 4.5.

El ensayo control considerando exclusivamente los componentes bases de la mezcla reactiva, esto es ácido ascórbico y KTBA dió tras una incubación de 24 horas, 20 ppm de etileno (Figura 5A). Un segundo control

se efectuó para comprobar si la lacasa era capaz de oxidar al KTBA y producir en consecuencia etileno. No se produjo dicho gas en las mezclas reactivas que contenían la enzima (1.62 mU.mL<sup>-1</sup>) pero que carecían de ácido ascórbico (Figura 5E).

Cuando la mezcla reactiva estuvo constituida por el ácido ascórbico y la SBPM, parcialmente purificada, y lacasa a una concentración de 1,62 mU.mL<sup>-1</sup>, se detectaron 50 ppm. Lo que significa 2,5 veces la producción de etileno detectada en su control (Figura 5A).

Los valores de etileno alcanzaron las 150 ppm cuando se añadió la lacasa a la mezcla reactiva base. El ensayo realizado añadiendo la lacasa y la SBPM produjeron un incremento notable en la producción del gas, alcanzándose las 220 ppm (Figura 5C). Ello supuso un incremento de 4.4 veces respecto a su control (compárense Figura 5 A y C).



**Figura 5:** Efecto de la lacasa de *Pyricularia oryzae* (B) y de la lacasa de *Petriellidium fusoidium* (C) en la producción de etileno en sistemas (1 ml) constituido por ácido ascórbico (1 mM) KTBA (3 mM), tampón acetato (40 mM, pH 4,5) y ocasionalmente 1 mg de SBPM. A) Control sin lacasa. D) Control de lacasa de *P. oryzae*. E) control de lacasa de *P. fusoidium*. En estos dos últimos controles las mezclas reactivas no contenían ácido ascórbico.

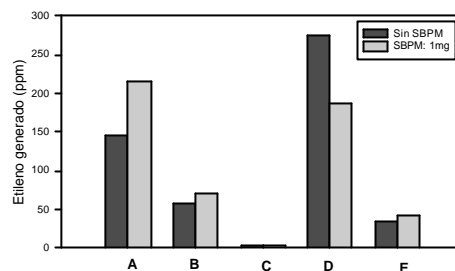
Con el fin de comprobar si este efecto producido por la lacasa de *Petriellidium fusoides* sobre la producción de etileno, indicativo de su participación en la formación de  $\cdot\text{OH}$ , se puede extender a otras lacasas, se realizó un ensayo similar pero con una lacasa comercial de *Pyricularia oryzae*. En efecto los resultados fueron similares a los comentados para la lacasa de *Petriellidium fusoides*. Se detectaron 115 ppm como consecuencia de la reacción entre la lacasa de *Pyricularia oryzae* y el ácido ascórbico y la adición de la SBPM provocó un incremento en la producción de etileno de 3 veces con respecto a la de su control (compárese Figura 5 A y B).

### 3.8. Efecto de secuestradores de especies activas de oxígeno sobre la generación de etileno

Visto el papel mediador de la lacasa en la producción de  $\cdot\text{OH}$  valorados por la producción de etileno, y para confirmar la generación de dicho radical en el estudio realizado en el apartado anterior, se diseñaron los ensayos que a continuación se detallan. En todos ellos la mezcla reactiva base (1 mL) estuvo formada por: ácido ascórbico (1 mM), KTBA (3 mM) y tampón acetato sódico (40 mM, pH 4.5).

La adición del benzoato sódico y tiourea a la mezcla reactiva conteniendo lacasa con o sin SBPM produjo un descenso en la formación de etileno del 67 y 99%, respectivamente (Figura 6B y 6C).

La adición de SOD a los ensayos realizados en mezcla reactivas formadas sólo por ácido ascórbico, KTBA y lacasa, se produjo, comparándolo con su control, un incremento en la producción de etileno valorado en un 88 % (compárese Figura 6, A y D, histogramas lado izquierdo).



**Figura 6:** Efecto de los secuestradores del  $\cdot\text{OH}$  y otras especies activas de oxígeno sobre la generación de etileno a partir de KTBA. La mezcla reactiva base (1 mL) estuvo constituida por ácido ascórbico (1 mM), KTBA (3 mM), tampón acetato sódico 40 mM pH 4,5 y la lacasa de *P. fusoides* (1,62 mU). Ocasionalmente se añadió la SBPM (1 mg). A) control sin secuestrador. B) ensayo con benzoato sódico, 10 mM. C) ensayo con tiourea, 10 mM. D) ensayo con SOD, 450 U. E) con catalasa, 6 U.

Sin embargo al añadir la SOD a los ensayos realizados con mezclas reactivas que contenían la lacasa y la SBPM se detectó un descenso en la producción de etileno valorada en un 14 % (compárese Figura 6 A y D, histogramas lado derecho).

La catalasa produjo una reducción en la producción de etileno de un 75 y 80 %, dependiendo de que su adición se efectuara a mezclas reactivas conteniendo o no la SBPM (compárese Figura 6 A y D). Evidentemente, si como suponemos la formación de etileno en el sistema se debe a la generación de  $\cdot\text{OH}$ , la adición de sus secuestradores específicos a las mezclas reactivas donde dichos radicales se generen produciría una disminución en la detección del citado gas. Si además, como cabe esperar, en la formación de dichos radicales, intervienen el radical  $\text{O}_2\cdot^-$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , la adición de otros componentes como la SOD y la catalasa también inhibirían respectivamente la formación de los  $\cdot\text{OH}$  hecho que se reflejaría también en la produc-

ción de etileno.

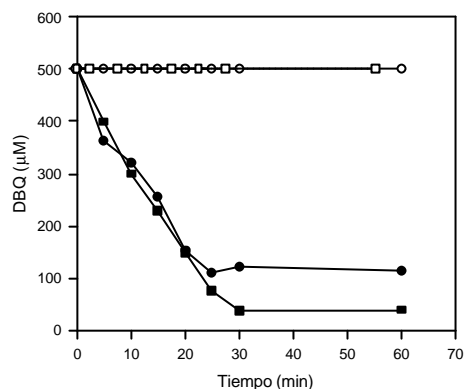
Una posible explicación a los resultados antes comentados es que al añadir la SOD el aumento en la producción de etileno, se deba a una sobreproducción de  $\cdot\text{OH}$ , consecuencia de la formación, en principio, de una gran cantidad de radicales  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . La explicación podría ser válida al ser el ácido ascórbico un compuesto con alto potencial redox, que facilitaría la producción de superóxido. En ese caso, es lógico pensar que la adición de SOD incrementa la cantidad de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , compuesto que podría ser el paso limitante en la reacción que conduce a la formación del radical  $\cdot\text{OH}$ . Por otra parte, un incremento en  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el medio, facilitaría la producción de  $\cdot\text{OH}$ . Además debe tenerse en cuenta que en esta reacción median iones metálicos como se recoge en la ecuación 5. Al respecto debemos decir que, aunque éstos no han sido expresamente añadidos, estarían como elementos trazas en el agua o el tampón que se ha utilizado. Algunos autores para evitar que estos cationes interfieran en estos tipos de reacciones, tratan las mezclas reactivas con agentes quelantes (Guillén *et al.*, 2000).

Ya se dijo que si la SOD se añade a sistemas formados por el ácido ascórbico, lacasa y SBPM, se detecta un descenso en la producción de etileno del 14 % respecto a su control (Figura 6 A y D, histograma de barras horizontales). Una explicación plausible a este fenómeno la encontramos en que puede establecerse una competencia entre el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y su dismutación a  $\text{H}_2\text{O}_2$  y la reacción entre dicho radical y el  $\text{Fe}^{+++}$  que participaría en la reducción de  $\text{Fe}^{++}$ . El ion ferroso debe formarse para dar lugar a la reacción Fenton que se describe en la ecuación 6.

Por último hemos de decir que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  se forma en los sistemas que hemos ensayado, pues la adición de catalasa (6 U) produjo un drástico descenso en la producción de etileno, estimado en un 80% (Figura 6E).

### 3.9 Reducción de quinonas por *P. fusoideum*. Actividad lacasa asociada al micelio.

El micelio de *P. fusoideum*, preparado como se indicó en Materiales y Métodos (apartado 2.7), fue incubado en condiciones aeróbicas y anaeróbicas a fin de determinar la reducción de la 2,6 dimetoxi-1,4-benzoquinona (DBQ). Tras una incubación de 30 min en anaerobiosis, prácticamente el 100 % de la quinona añadida se transformó en su correspondiente hidroquinona (Figura 7). Un efecto reductor similar, aunque menos acusado se observó en un ensayo equivalente realizado tras la incubación del micelio en aerobiosis. En este caso la reducción de la quinona alcanzó un 80 % (Figura 7).



**Figura 7:** Reducción de la 2,6 dimetoxi-1,4-benzoquinona (DBQ) durante la incubación con micelio de *Petriellidium fusoideum* bajo condiciones aeróbicas (●) y anaeróbicas (■). Con micelio hervido en condiciones aeróbicas (○) y anaeróbicas (□).

Por otra parte, también se detectó actividad lacasa asociada al micelio que se valoró en 0.36 mU/mg de micelio (peso húmedo).

Por lo dicho, y como ya se comentará en la discusión, puede decirse que *P. fusoideum* cuenta con un sistema redox de quinonas asociado al micelio.



### 3.10 Efecto de secuestradores de especies activas de oxígeno y de inhibidores de la actividad lacasa en la producción de etileno.

Teniendo en cuenta los resultados comentados en el apartado anterior, trataremos de confirmar ahora la producción de radicales ·OH en sistemas que contienen el micelio y la benzoquinona antes indicada.

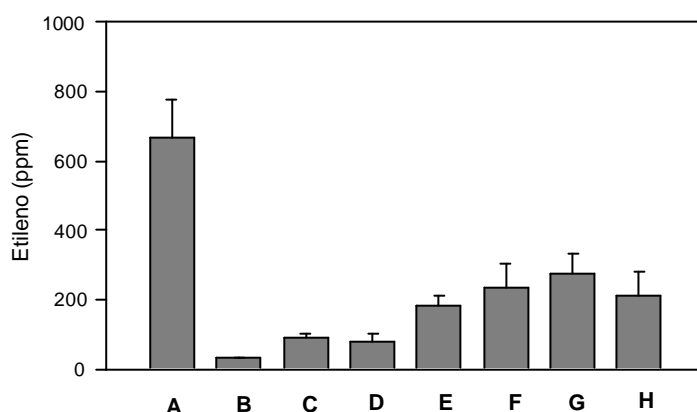
En todos los casos la mezcla reactiva base (1 mL) estuvo formada por el micelio (100 mg peso húmedo), la DBQ (500 μM) y tampón acetato (40 mM, pH 4,5). Después de incubarla 30 minutos en anaerobiosis, se añadió el KTBA (3 mM).

La producción de etileno en los ensayos constituidos por la mezcla base antes mencionada, alcanzó las 670 ppm. Este valor

fue muy superior a cualquiera de los detectados en los ensayos anteriores.

El micelio hervido provocó un descenso del 95 % de etileno (Figura 8B). La adición de secuestradores de ·OH como benzoato de sodio y tiourea produjeron un descenso en la producción de etileno del 87 y 88 %, respectivamente, en comparación con sus controles (Figura 8, A, C y D). La catalasa produjo un descenso del 65 % en la producción de dicho gas (compárese Figura 8, A y F), y la adición de la SOD, produjo una disminución del 73 % (Figura. 8, A y E).

Cuando se añadieron a los sistemas base el ácido tioglicólico (2 mM) y la azida de sodio (1 mM) se produjeron descensos en la generación de etileno del 60 y 70 %, respectivamente (Figura 8 F y G).



**Figura 8:** Efecto de secuestradores de especies activas de oxígeno e inhibidores de lacasa sobre la generación de etileno de KTBA obtenido después de la reducción de 2,6 dimetoxi-1,4-benzoquinona por micelio de *Petriellidium fusoides*. A) Control; B) micelio hervido; C) Benzoato de sodio, 10 mM; D) tiourea, 10 mM; E) SOD, 450 U; F) catalasa, 6 U; G) ácido tioglicólico, 2 mM; H) azida de sodio, 1 mM.

Este último ensayo ha puesto de manifiesto varios aspectos relevantes de nuestro trabajo. Así, la quinona añadida al sistema que contiene el micelio, fue reducida por éste en condiciones anaeróbicas. Su oxidación posterior, en presencia del micelio, debe relacionarse a la actividad fenoloxidasa asociada al mismo y quizás la producida también durante la incubación. De esta manera el sustrato podría ser reducido posteriormente y se cerraría el ciclo. Apoya esta hipótesis el hecho recogido en la Figura 7, en la que se observa

narse a la actividad fenoloxidasa asociada al mismo y quizás la producida también durante la incubación. De esta manera el sustrato podría ser reducido posteriormente y se cerraría el ciclo. Apoya esta hipótesis el hecho recogido en la Figura 7, en la que se observa

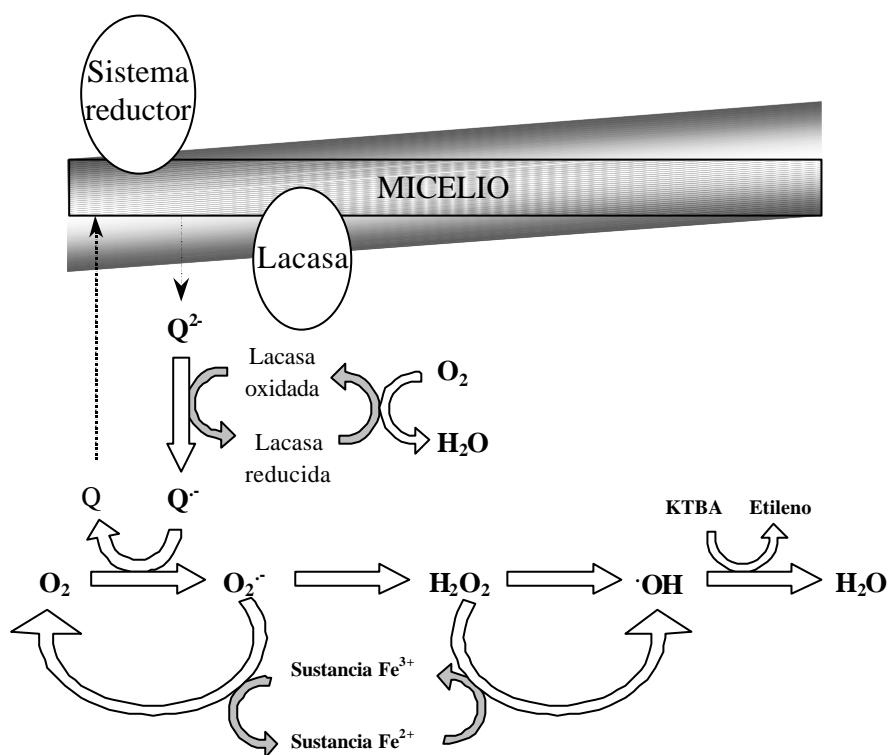
cómo en condiciones aeróbicas el micelio fue capaz de reducir hasta un 80 % de la quinona añadida al medio.

En definitiva puede decirse que *Petriellidium fusoideum* presenta el ciclo redox de las quinonas y ello sería suficiente para producir radicales superóxido (Guillén *et al.*, 2000). Evidentemente, la producción de  $\cdot\text{OH}$  se vería favorecida por la presencia de la SBPM, que como hemos demostrado liga  $\text{Fe}^{++}$ .

En consecuencia de lo anteriormente dicho, para explicar los hechos que presumiblemente acontecen en relación con

la degradación/mineralización de las muestras de ligninas aquí estudiadas, se propone el ciclo que se recoge en la figura 9.

En este trabajo se ha demostrado que el hongo es capaz de producir la mineralización parcial a  $^{14}\text{CO}_2$  de todas las muestras de ligninas estudiadas. Se ha visto que el sistema caracterizado, formado por la lacasa y la SBPM es capaz de generar radicales  $\cdot\text{OH}$ . Se ha demostrado el papel de éstos en la degradación, utilizando diversos secuestradores de esas especies activas de oxígeno, y como se dijo antes, la lacasa juega un papel importante en dicho proceso.



**Figura 9:** Esquema de las reacciones presumiblemente implicadas en la generación de especies activas de oxígeno por cooperación entre el sistema reductor de quinonas asociado al micelio, la lacasa y la SBPM producidos por *Petriellidium fusoideum*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ander P.; Eriksson K.E. The importance of phenol oxidase activity in lignin degradation by the white rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. Arch. Microbiol. 109: 1-8. (1976)
- Archibald F. S.; Fridovich I. 1982. The scavenging of superoxide radical by manganous complexes: in vitro. Arch. Biochem. Biophys. 214: 452-463.
- Backa S.; Gierer J.; Reitberger T.; Nilsson T. Hydroxyl radical activity associated with the growth of white-rot fungi. Holzforschung. 47: 181-187. (1993)
- Bourbonnais R., Paice M.G.; Reid I.D.; Lanthier, P.; Yaguchi, M. 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. (1995)
- Bourbonnais, R.; Paice, M.G. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. FEBS Letters. 267: 99-102. (1990)
- Bourbonnais, R.; Paice, M.G. Demethylation and delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor* laccase in the presence of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). Appl. Microbiol. Biotechnol. 36: 823-827. (1992.)
- Call, H.P., I. & Mücke. History, overview and application of mediated ligninolytic system, especially laccase-mediator-systems (lignozym<sup>R</sup> process). J. Biotechnol. 53: 163-202. (1997)
- Chefetz, B.; Chen, Y.; Hadar, Y. Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification. Appl. Environ. Microbiol. 64: 3175-3179. (1998)
- Dallmier, A. W.; Martin, E. M. Catalase, superoxide dismutase, and hemolysin activities and heat susceptibility of *Listeria monocytogenes* after growth in media containing sodium chloride. Appl. Environ. Microbiol. 56: 2807-2810. (1990)
- Daniel, G. Use of electron microscopy for aiding our understanding of wood biodegradation. FEMS Microbiol. Rev. 13: 199-233. (1994)
- Eggert, C.; Temp, U.; Eriksson, K-E. The ligninolytic system of the white rot-fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. Appl. Environ. Microbiol. 62: 1151-1158. (1996<sup>a</sup>)
- Eggert, C.; Temp, U.; Eriksson, K.L. Laccase is essential for lignin degradation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. FEBS Letters. 407: 89-92. (1997)
- Eggert, C.; Temp, U.; Dean, J.F.D.; Eriksson, K.L.; A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. FEBS Letters. 391: 144-148. (1996b)
- Enoki, A.; Tanaka, H.; Fuse, G. Relationship between degradation of wood and production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing or one-electron oxidases by brown-rot fungi. Wood Sci. Technol. 23: 1-12. (1989)
- Evans, C.S.; Dutton, M.V.; Guillén, F.; Veness, R.G. Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocellulose degradation. FEMS Microbiol. Rev. 13: 235-240. (1994)
- Flournoy, D.S.; Paul, J.A.; Kirk, T.K.; Highley, T.L. Changes in the size and volume of pores in sweetgum wood during simultaneous rot by *Phanerochaete chrysosporium*. Holzforschung. 47: 297-301. (1993)
- Flournoy, D.S.; Kirk, T.K.; Highley, T.L. Wood decay by brown-rot fungi: Changes in pore structure and cell wall volume. Holzforschung. 45: 383-388. (1991)
- Forney, L.J.; Reddy, C.A.; Tien, M.; Aust, S.D. 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. (1982)

- Freudenberg, K.; Neish, A.C. Constitution and biosynthesis of lignin. Springer-Verlag. New York. (1968)
- Gierer, J.; Yang, E.Q.; Reitberger, T. On the significance of the superoxide radical ( $O_2^-/HO_2$ ) in oxidative delignification, studied with 4-t-butylsyringol and 4-t-butylguaiacol. Part. I. The mechanism of aromatic ringopening. *Holzforschung*. 48: 405-414. (1994)
- Glenn, J.K.; Morgan, M.A.; Mayfield, M.B.; Kuwahara, M.; Gold, M.H. An extracellular  $H_2O_2$ -requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114: 1077-1083. (1983)
- Goodell, B.; Qian, Y.; Jellison, J.; Richard, M.; Qi, W. Proposed mechanism of oxidation by low molecular weight metal-binding compounds isolated from wood degrading fungi and potential application. Pp. 29-30. En: 8<sup>th</sup> International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. P. Vahala y R. Lantto (Eds). VTT Biotechnology. Helsinki. (2001)
- Guillén, F.; Gomez-Toribio, V.; Martínez, M.J.; Martínez, A.T. Production of hydroxyl radical by the synergistic action of fungal laccase and aryl alcohol oxidase. *Arch. of Biochem. Biophysics*. 383: 142-147. (2000)
- Guillen, I. Comunicación Personal ....(2000)
- Haars, A.; Chet, I.; Hüttermann, A. Effect of phenolic compounds and tannin on growth and laccase activity of *Fomes annosus*. *Eur. J. For. Pathol.* 11: 67-76. (1981)
- Haemmerli, S.D.; Schoemaker, H.E.; Schmidt, H.W.H.; Leisola, M.Sa. Oxidation of veratryl alcohol by the lignin peroxidase of (1987)
- Hall, P.L. Enzymatic transformation of lignin: 2. *Enzyme Microb. Technol.* 2: 170-176. (1980)
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. En: *Methods Enzymol.* 186: 1-85. (1990)
- Hammel, K.E.; Tardone, P.J.; Moen, M.A.; Price, L.A. Biomimetic oxidation of nonphenolic lignin models by Mn(III): New observation on the oxidizability of guaiacyl and syringyl substructures. *Arch. Biochem. Biophys.* 270: 404-409. (1989)
- Harvey, P.J.; Schoemaker, H.E.; Palmer, J.M. Veratryl alcohol as a mediator and the role of radical cations in lignin biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* 195: 242-246. (1986)
- Hatakka, A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi- Production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 13: 125-135. (1994)
- Janshekar, H.; Haltmeier, T.; Brown, C. Fungal degradation of pine and straw alkali lignins. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 14: 174-181. (1982)
- Joseleau, P.J.; Gharibian, D.; Comtat, J.; Lefebvre, A.; Ruel, K. Indirect involvement of ligninolytic enzymes in cell wall degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 13: 255-264. (1994)
- Kappus, H.; Sies, H. Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation. *Experientia*. 37: 1233-1241. (1981)
- Kutsuki, H.; Gold, M.H. Generation of hydroxyl radical and its involvement in lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical and Biophysical Research communication.* 109: 320-327. (1982)
- Kuwahara, M.; Glenn, J.K.; Morgan, M.A.; Gold, M.H. Separation and characterization of two extracellular  $H_2O_2$ -dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* 169: 247-250. (1984)
- Mccord, J.M.; Fridovich, I. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* 243: 5753-5760. (1968)

- Moreira, M. T.; Feijoo, G.; Sierra-Alvarez, R.; Lema, J.; Field, J. A. Biobleaching of oxygen delignified kraft pulp by several white rot fungal strains. *Journal of Biotechnol.* 53: 237-251. (1997)
- Neilands, J.B. Iron and its role in microbial physiology. En: Neilands, J.B. (Ed.), *Microbial Iron Metabolism: A Comprehensive Treatise*. Academic Press, New York, pp. 3-34. (1974)
- Neilands, J.B.; Konopla, K.; Schwyn, B.; Coy, M.; Francis, R.T.; Paw, P.W.; Bagg, A. Comparative biochemistry of microbial iron assimilation. En: G. Winkelmann, D. van der Helm, y J.B. Neilands, (Eds.), *Iron Transport in Microbes, Plants and Animals*, VCH, NY, pp. 3-33. (1987)
- Nutsudizde, N.N.; Sarkanen, S.; Schmidt, E.L.; Shashikanth, S. Consecutive polymerization and depolymerization of kraft lignin by *Trametes cingulata*. *Phytochemistry*. 49: 1203-1212. (1998)
- Óllinger, K.; Buffinton, G.D.; Ernster, L.; Cadenas, E. Effect of superoxide dismutase on the autoxidation of substituted hydro- and semi-naphthoquinones. *Chem. Biol. Interac.* 73: 53-76. (1990)
- Palmieri, G.; Giardina, P.; Marzullo, L.; Desiderio, B.; Nitti, G.; Cannio, R.; Sanna, G. Stability and activity of a phenol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39: 632-636. (1993)
- Paszczynski, A.; Crawford, R.L.; Blanchette, R.A. Delignification of wood chips and pulps using natural and synthetic porphyrins: models of fungal decay. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 62-68. (1988)
- Perié, F.H.; Gold, M.H. Manganese regulation of manganese peroxidase expression and lignin degradation by the white rot fungus *Dichomitus squalens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2240-2245. (1991)
- Regalado, V.; Perestelo, F.; Rodriguez, A.; Carnicero, A.; Sosa, F.J.; De La Fuente, G.; Falcon, M.A. Activated oxygen species and two extracellular enzymes: laccase and aryl-alcohol oxidase, novel for the lignin-degrading fungus *Fusarium proliferatum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 388-390. (1999)
- Renganathan, V.; Usha, S.N.; Lindenburg, F. Cellobiose-oxidizing enzymes from the lignocellulose-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: interaction with microcrystalline cellulose. *Appl Microbiol Biotechnol.* 32: 609-613. (1990)
- Stookey, L.L. Ferrozine- A new spectrophotometric reagent for iron. *Analytical Chemistry*. 42: 779-781. (1970)
- Tanaka, H.; Itakura, S.; Enoki, A. Hydroxyl radical generation by an extracellular low-molecular-weight substance and phenol oxidase activity during wood degradation by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*. *Journal of Biotechnology*. 75: 57-70. (1999a)
- Tanaka, H.; Itakura, S.; Enoki, A. Hydroxyl radical generation by an extracellular low-molecular-weight substance and phenol oxidase activity during wood degradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Holforschung*. 53: 21-28. (1999b)
- Thurston, C.F. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology-UK*. 140: 19-26. (1994)
- Tien, M.; Kirk, T.K. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* burds. *Science*. 221: 661-663. (1983)
- Tien, M.; Kirk, T.K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization and catalytic properties of a unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring oxygegenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81: 2280-2284. (1984)
- Trojanowski, J.; Huttermann, A. Screening of wood inhabiting fungi for their capacity to degrade and to solubilize <sup>14</sup>C-labelled lignin. *Microbios*. 50: 91-97. (1987)

Wariishi, H.; Valli, K.; Gold, M.H. *In vitro* depolymerization of lignin by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176: 269-275. (1991)

Yarapolov, A.I.; Skorobogat'ko, O.V. ; Vartanov, S.S.; Varfolomeyed, S.D. Laccase. Properties, catalytic mechanism and applicability. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 49: 257-280. ( 1994)