



Degradación de madera de álamo por *Fomes sclerodermeus*: producción de enzimas ligninolíticas en aserrín de álamo y cedro

Víctor Leandro Papinutti, Luis Alberto Diorio y Flavia Forchiassin

Laboratorio de Micología Experimental, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina

Resumen

Fomes sclerodermeus es un hongo causante de pudrición blanca. Se evalúa su producción de enzimas lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasa en medios conteniendo aserrín de cedro o álamo como sustrato. En ningún caso se detectó actividad lignina peroxidasa. La producción de lacasa y manganeso peroxidasa fue mucho más alta usando aserrín de álamo como sustrato. Por tanto, bloques de madera de álamo fueron incubados con *F. sclerodermeus* durante seis meses. Las pérdidas de peso seco de los bloques debido a su degradación alcanzaron un valor medio de 51%. La cuantificación de celulosa y lignina después de este período mostraron la disminución en las cantidades de estos polímeros, que fueron de hasta un 58 y 56% para celulosa y lignina respectivamente. Los cortes de las maderas atacadas observadas al microscopio óptico mostraron principalmente presencia de hifas colonizando el interior de vasos, adelgazamiento de las paredes y degradación de los radios parenquimáticos.

Palabras clave

Fomes sclerodermeus, Lacasa, Manganeso peroxidasa, Pudrición blanca

Degradation of poplar wood by *Fomes sclerodermeus*: production of ligninolytic enzymes in sawdust of poplar and cedar

Summary

Fomes sclerodermeus is a white-rot fungus. Its production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase on sawdust-based media was evaluated. No lignin peroxidase activity was measured in any media tested. The higher production of laccase and manganese peroxidase were found on media containing poplar sawdust. *F. sclerodermeus* was grown on wood blocks of poplar during six months. Dry weight losses of the blocks reached a mean value of 51%. The quantification of cellulose and lignin in the 6-months incubated blocks showed losses of up to 58 and 56% for cellulose and lignin, respectively. The decay examined under microscope revealed mycelium colonizing the lumen of vessel elements, cell wall thinning and entire degradation of the radial parenchyma.

Key words

Fomes sclerodermeus, Laccase, Manganese peroxidase, White-rot fungi

La lignina en la madera confiere una protección física a la celulosa y hemicelulosa contra el ataque enzimático. Existe una gran cantidad de organismos (bacterias y hongos) con las enzimas hidrolíticas necesarias para degradar la celulosa y hemicelulosa, pero en lo referente al ataque y mineralización de la lignina el número de organismos es mucho más limitado. Los únicos organismos descritos con la capacidad de degradar y mineralizar la lignina son un grupo de basidiomicetes causantes de pudrición blanca. Estos hongos, en su mayoría pertenecientes a los órdenes Aphyllophorales y Agaricales [1], poseen un complejo de enzimas oxidasas y peroxidases que catalizan las primeras reacciones que rompen uniones dentro de la compleja molécula de lignina, generando moléculas más pequeñas, y luego hay una incorporación de estos productos de degradación a los ciclos metabólicos del organismo que como producto final dan CO₂ [2].

Dirección para correspondencia:

Dr. Víctor Leandro Papinutti
Laboratorio de Micología Experimental
Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires
Ciudad Universitaria, Pabellón II
1428 Buenos Aires, Argentina
Fax: +54 11 4576 3384
E-mail: leandru@bg.fcen.uba.ar

Aceptado para publicación el 25 de Marzo de 2003

Se ha demostrado que la lignina no es una fuente aprovechable para el crecimiento de los hongos sino que es necesaria la presencia de un cosustrato [3]. Por lo tanto la adquisición de la habilidad para mineralizar lignina sería ventajoso para el aprovechamiento de otras moléculas más fácilmente metabolizables, teniendo en cuenta las relaciones intermoleculares presentes en la estructura de las paredes celulares.

Hasta el momento las enzimas ligninolíticas descritas son cuatro, lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP), peroxidasa versátil (PV) y lacasa. LiP, MnP y PV son peroxidases con un grupo hemo como cofactor y emplean H_2O_2 como primer aceptor de electrones. La LiP puede oxidar directamente sustratos aromáticos no fenólicos, siendo el más estudiado el alcohol veratrílico. La MnP oxida Mn^{2+} a Mn^{3+} este último es quelado por ácidos orgánicos sintetizados por el hongo [4]. Es decir que la MnP puede oxidar sustratos del tipo fenólico a través de Mn^{2+} [5] pero también puede hacerlo con aquéllos del tipo no fenólico a través de los productos de peroxidación de ácidos grasos insaturados [6]. La PV puede oxidar el Mn^{2+} a Mn^{3+} (como lo hace la MnP) y también oxida compuestos no fenólicos (como lo hace la LiP), es decir que comparte propiedades catalíticas con ambas peroxidases fúngicas descritas anteriormente [7,8]. Por último, la lacasa es una oxidasa con cuatro átomos de cobre como cofactor y cuyo aceptor de electrones es el O_2 dando agua como producto [9]. La enzima oxidada ataca principalmente sustratos fenólicos, pero en presencia de 1-hidroxibenzotriazol (1-HBT), 2,2'-azinobis [ácido 3-etilbenzothiazoline-6-sulfónico] (ABTS) o ácido violúrico [10,11] éstos actúan como cooxidantes y capacitan a la enzima para atacar sustratos más difícilmente oxidables como los de tipo no fenólico. La lacasa es la enzima más ampliamente distribuida entre los hongos de pudrición blanca, y en algunas ocasiones fuertemente inducible por cobre [12,13]. El objetivo de este trabajo fue estudiar el patrón de degradación de madera de álamo por *F. sclerodermeus* en correlación con sus enzimas ligninolíticas

Materiales y Métodos

Organismo y condiciones de cultivo. Se utilizó la cepa BAFC 2752 de *Fomes sclerodermeus*. Los cultivos se mantuvieron en agar malta a 4 °C. El extracto de malta fue agregado hasta llegar a una concentración del 12% en los medios con agar y líquidos.

Inoculación y pérdida de peso de la madera. Bloques de madera de 4 x 1 x 0,5 cm de álamo esterilizados a 120 °C se colocaron sobre medio agar malta en tubos pico de flauta inoculados 10 días antes con *F. sclerodermeus*. Se incubaron a 28 °C durante seis meses. Cada dos meses, 10 de los bloques eran recogidos, después de raspar y descartar el micelio superficial se secaron a 80 °C hasta peso constante. Se utilizaron como controles bloques sin inocular para calcular pérdidas de peso, en la cuantificación de celulosa y lignina y para comparar morfologías de la madera atacada y no atacada.

Cuantificación de celulosa y lignina. Para la cuantificación de celulosa y lignina, se molieron los tacos de madera inoculados y sin inocular, se extrajeron los compuestos hidrosolubles mediante lavados con agua destilada a 90 °C, luego se solubilizó la celulosa y hemicelulosa por medio de una hidrólisis con ácido sulfúrico al 72%, permaneciendo la lignina como un resto insoluble [14]. El contenido de celulosa y hemicelulosa se calculó por diferencia en el peso inicial de la fracción que se hidroliza con el ácido y la fracción insoluble que corresponde a la ligni-

na. Las cantidades de celulosa y hemicelulosa solubilizados en ácido y lignina de los bloques sin inocular se utilizaron como referencia del 100% del contenido para cada polímero. En base a este dato y al de pérdida de peso seco causado por el hongo, se calculó la cantidad remanente de cada polímero.

Actividades enzimáticas, proteínas y azúcares reductores. Se inoculó *F. sclerodermeus* en 20 ml de agua destilada con 10% de aserrín de álamo o de cedro, en matraces Erlenmeyer de 100 ml. En otros ensayos el agua destilada fue reemplazada por una solución de glucosa al 1% o por medio GA (glucosa 1% y asparragina 0,4%) [15]. Se incubó en condiciones estáticas a 28 °C, se tomaron muestras periódicamente de los sobrenadantes del cultivo y se cuantificaron con espectrofotómetro las proteínas solubles por el método de Bradford [16], los azúcares reductores por el método de Somogyi y Nelson [17,18] y las actividades enzimáticas según se describe a continuación.

Lacasa: se usó como sustrato ABTS 0,5 mM en tampón acetato de sodio 0,1 M, pH 3,6, a 30 °C ($\epsilon_{420} 36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Manganeso peroxidasa (MnP): se utilizó como sustrato rojo fenol a una concentración de 0,01% en tampón succinato de sodio 0,1 M y pH 4,5 con H_2O_2 0,2 mM. La reacción se paró agregando 40 μl de NaOH 5 N. La lectura del producto de reacción se hace a 610 nm ($\epsilon_{610} 22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) dos blancos de reacción fueron restados: sin H_2O_2 y otro sin Mn^{2+} [19]. Las unidades enzimáticas (U) se definen como micromoles de producto formado por min bajo las condiciones del ensayo.

Cortes anatómicos. Se realizaron cortes a mano alzada de los tacos de madera, que se tiñeron con la técnica de safranina-fast green [20], para ser observados en microscopio óptico.

Resultados y Discusión

Aspectos macroscópicos. Los bloques de madera de álamo fueron tratados con *F. sclerodermeus* en medio agar extracto de malta por un tiempo de seis meses. Durante las tres primeras semanas de incubación, el hongo colonizó toda la superficie de la madera. Ya en el primer muestreo (dos meses) se observó que la colonización fue también en las superficies internas, dado que cortes longitudinales de los bloques de la madera tratada con el hongo mostraron el micelio en su interior. Transcurridos los seis meses de incubación el color de los bloques no varió respecto al control, sin embargo las maderas degradadas fueron muy quebradizas, algo esponjosas y fácilmente divisibles en trozos longitudinales. Por lo general, en las maderas atacadas por hongos causantes de pudrición blanca aparecen manchas marrones que pueden deberse a depósitos de MnO_2 [20] pero en este trabajo no se observaron depósitos de este tipo. Se verificó la degradación de las maderas por pérdida de peso de las mismas (Figura 1). La tasa de degradación fue rápida hasta los cuatro meses haciéndose más lenta en los meses siguientes. Las pérdidas de peso a los seis meses alcanzaron un valor medio de 51% valor similar al observado por Levin y Castro [21] en maderas de *Salix* sp. y *Populus* sp. atacadas por *Trametes trogii*.

Actividades enzimáticas. La producción de enzimas ligninolíticas por *F. sclerodermeus* utilizando madera como único sustrato, fue evaluada en medios basados en aserrín de madera de álamo (Figura 2a) o cedro (Figura 2b). No se encontró actividad LiP en ninguno de los medios, aunque cabe destacar que esta enzima no se ha

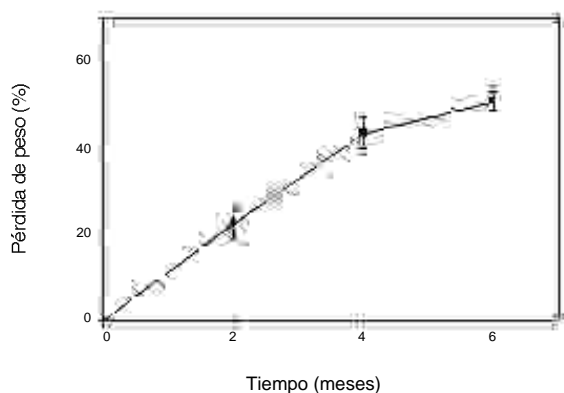


Figura 1. Pérdida de peso seco de los tacos de madera de álamo atacados por *F. sclerodermeus*. Cada punto representa el valor medio del peso de 10 tacos, las barras representan el error.

encontrado en la mayoría de los hongos de pudrición blanca estudiados [1]. Las actividades MnP y lacasa obtenidas en los medios con aserrín de álamo fueron muy superiores a las obtenidas en medio sintético sin Mn^{2+} o Cu^{2+} [22], probablemente esto se deba a que en las maderas existe una gran variedad de compuestos aromáticos que habrían pasado a la solución. La inducción por este tipo de compuestos fue probada en varios hongos de pudrición blanca [24]. El manganeso que comúnmente está presente en las maderas también pudo haber sido el inductor. En *F. sclerodermeus* las actividades lacasa y MnP aumentan en presencia de este dicatión [25]. En el medio conteniendo aserrín de cedro no se detectó actividad lacasa ni MnP. Las cantidades de azúcares reductores solubles y las curvas de consumo de este nutriente fueron similares para ambos medios, observándose que a partir del día 14 comenzaba la máxima tasa de consumo. Es decir que la falta de actividades en el medio de cedro no se debería a un retraso en el crecimiento del hongo sino que otro factor estaría afectando la producción enzimática. Respecto a las cantidades de proteínas extraíbles de los medios, en la figura se observa que en el medio de álamo hay un nivel basal de proteínas las cuales provienen de la madera, en el medio de cedro no hay proteínas al tiempo 0 y éstas comienzan a aumentar al día 11 de crecimiento producto de la liberación por el organismo. Con el objetivo de evaluar si existía alguna limitación en algunos nutrientes que estuviera afectando la producción de las actividades obtenidas en ambos medios, se hicieron cultivos agregando glucosa o medio GA reemplazando al agua destilada. En la tabla 1 figuran los valores de actividad para ambos medios en el día que éstos alcanzaron su valor máximo. Es interesante notar que en el medio de álamo las actividades lacasa fueron algo menores que en el medio con glucosa y GA, mientras que en el medio de cedro ésta actividad fue mayor, indicando que puede inducirse por los compuestos presentes en esta madera. Respecto a la actividad MnP en medio de álamo no mostró ser afectada por el agregado de nutrientes, mientras que en el medio de cedro no se detectó en ninguno de los casos. Por lo tanto la producción de enzimas ligninolíticas en *F. sclerodermeus* está estrechamente relacionada con el tipo de madera que se use como sustrato. El agregado de macro nutrientes como glucosa o nitrógeno no lograron revertir totalmente ese efecto.

Pérdida de los componentes. Mediante hidrólisis diferencial de los componentes de los tacos de madera fue posible determinar su composición. En la figura 3 se observa que celulosa y lignina fueron atacadas por igual, los valores obtenidos fueron de hasta un 58 y 56% para celulosa y lignina, respectivamente. Esto mostró que el ataque a los distintos componentes de la madera fue simultáneo, similares resultados se han observado en otros hongos de pudrición blanca, p.e. *Trametes versicolor* [20] y *Lentinus edodes* [26]. Los hidrosolubles aumentaron hasta 3 veces su valor inicial, los extractos presentaban un color marrón el cual no se observó en los tacos sin atacar y probablemente se deba a productos de degradación de la lignina.

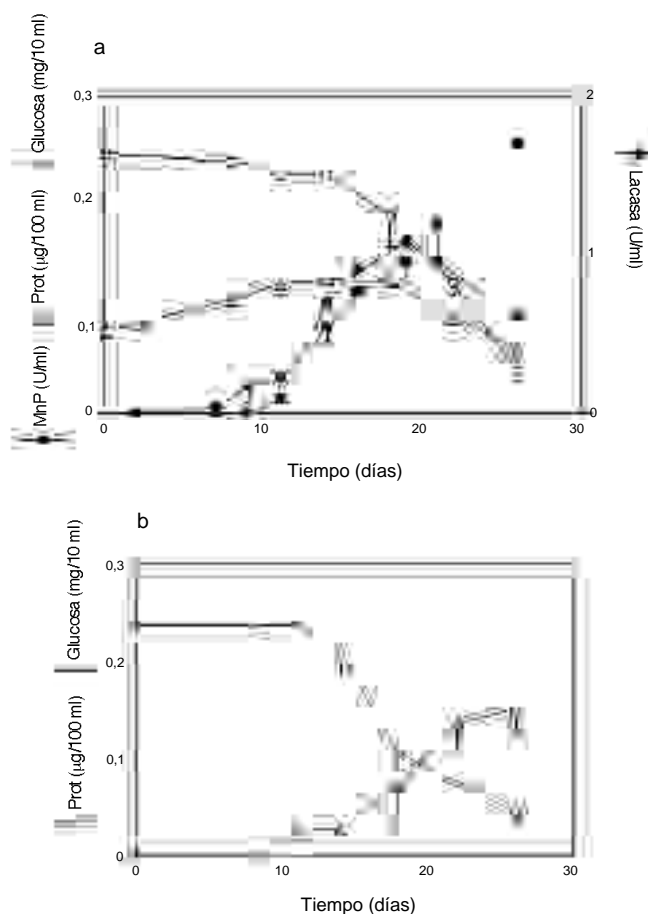


Figura 2. Curvas de actividad MnP y lacasa, proteínas y azúcares reductores en función del tiempo para *F. sclerodermeus* creciendo en aserrín de álamo (a) o cedro (b) como único sustrato. Las mediciones se realizaron por triplicado y las barras representan el error.

Los hongos de pudrición blanca pueden presentar dos patrones de degradación de la madera: simultáneo, como se ha observado para *Fomes sclerodermeus*, o selectivo, con la degradación de lignina en primera instancia. Cada patrón no es característico de una especie: *Trametes trogii*, en madera de álamo, presenta los dos patrones a la vez [22]. Es posible que distintas condiciones microambientales en la madera, p.e. pH, temperatura, grado de humedad, puedan favorecer la actividad de distintos sistemas enzimáticos de modo diferencial.

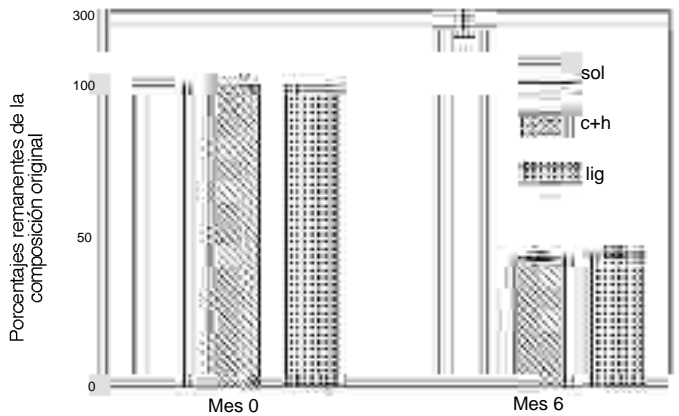


Figura 3. La hidrólisis diferencial de los tacos de madera de álamo atacados por *F. sclerodermeus* muestran los porcentajes remanentes de hidrosolubles (sol), celulosa junto con hemicelulosa (c+h) y lignina (lig). Las mediciones se realizaron por triplicado y las barras representan el error.

Aspectos anatómicos. En las figuras 4A y 4B se observan los cortes anatómicos de la madera no atacada y atacada, respectivamente. En la madera atacada se puede observar principalmente adelgazamiento de las paredes en algunas zonas (b) que le dio una estructura más esponjosa, y degradación de los radios parenquimáticos (a). La degradación no ocurrió de manera uniforme en los tacos de madera dado que fueron observadas zonas de degradación junto con otras zonas intactas. Aparentemente los radios parénquimáticos fueron los más fácilmente degradados observándose una separación de las fibras (a). Similares resultados fueron encontrados por Levin y Castro en maderas atacadas por *T. trogii* [21].



Figura 4. Cortes realizados a mano alzada de los tacos de madera no atacada (A) y atacada (B) revelan una estructura más esponjosa debido a adelgazamiento de paredes (b), también se observa degradación de los radios parenquimáticos (a). La barra representa 50 μm.

Nuestros agradecimientos a la Universidad de Buenos Aires y al CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas) por la financiación de este trabajo.

Bibliografía

1. Peláez F, Martínez MJ, Martínez AT. Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. *Mycol Res* 1995; 99: 37-42.
2. Kirk TK, Farrell RL. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Annu Rev Microbiol* 1987; 41: 465-505.
3. Kirk TK, Connors WJ, Zeikus JG. Requirement for a growth substrate during lignin decomposition by two wood-rotting fungi. *Appl Environ Microbiol* 1976; 32: 192-194.
4. Pérez J, Jeffries TW. Roles of manganese and organic acid chelators in regulating lignin degradation and biosynthesis of peroxidases by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 1992; 58: 2402-2409.
5. Tuor U, Wariishi H, Schoemaker HE, Gold MH. Oxidation of phenolic arylglycerol beta-aryl ether lignin model compounds by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*: oxidative cleavage of an alpha-carbonyl model compound. *Biochemistry* 1992; 31: 4986-4995.
6. Bao W, Fukushima Y, Jensen KAJr, Moen MA, Hammel KE. Oxidative degradation of non-phenolic lignin during lipid peroxidation by fungal manganese peroxidase. *FEBS Lett* 1994; 354: 297-300.
7. Martínez AT. Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme Microb Technol* 2002; 30: 425-444.
8. Martínez MJ, Ruiz-Dueñas FJ, Guillén F, Martínez AT. Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *Eur J Biochem* 1996; 237: 424-432.
9. Thurston CF. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology-UK* 1994; 140: 19-26.
10. Bourbonnais R, Paice MG, Freiermuth B, Bodie E, Borneman S. Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 4627-4632.
11. Soares GM, de Amorim MT, Costa-Ferreira M. Use of laccase together with redox mediators to decolorize Remazol Brilliant Blue R. *J Biotechnol* 2001; 89: 123-129.
12. Hess J, Leitner C, Galhaup C, et al. Enhanced formation of extracellular laccase activity by the white-rot fungus *Trametes multicolor*. *Appl Biochem Biotechnol* 2002; 98-100: 229-241.
13. Galhaup C, Wagner H, Hinterstoisser B, Haltrich D. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme Microb Technol* 2002; 30: 529-536.
14. Tappi methods. Acid insoluble lignin in wood and pulp. T222 om-83 1983.
15. Levin L, Forchiassin F. Ligninolytic enzymes of the whiterot basidiomycete *Trametes trogii*. *Acta Biotechnol* 2001; 21: 179-186.
16. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
17. Somogyi M. A new reagent for the determinations of sugars. *J Biol Chem* 1945; 160: 61-73.
18. Nelson NJ. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J Biochem* 1944; 153: 375-380.
19. Glenn JK, Gold MH. Purification and characterisation of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Biochem Biophys* 1985; 242: 329-341.
20. Gram K, Jorgensen E. An easy, rapid and efficient method of counterstaining plant tissues and hyphae in wood sections by means of fast green and safranin. *Friesia* 1953; 4:262-266.
21. Machuca A, Ferraz A. Hydrolytic and oxidative enzymes produced by white- and brown-rot fungi during *Eucalyptus grandis* decay in solid medium. *Enzyme Microb Technol* 2001; 29: 386-391.
22. Levin L, Castro MA. Anatomical study of the decay caused by the white-rot fungus *Trametes trogii* (Aphylophorales) in wood of *Salix* and *Populus*. *IAWA Journal* 1998; 19: 169-180.
23. Papinutti VL, Forchiassin F. Enzimas de hongos de pudrición blanca involucradas en la degradación de lignina. *Rev Arg Microbiol* 2000; 32: 83-88.
24. Lo SC, Ho YS, Buswell JA. Effect of phenolic monomers on the production of laccases by the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*, and partial characterization of a major laccase component. *Mycologia* 2001; 93: 413-421.
25. Muñoz C, Guillén F, Martínez AT, Martínez MJ. Induction and characterization of laccase in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Curr Microbiol* 1997; 34: 1-5.
26. Papinutti VL, Forchiassin F, Levin L. Manganese peroxidase and laccase activities in *Fomes sclerodermeus*. Fourth Latin American Biodeterioration and Biodegradation Symposium, Buenos Aires 2001.
27. Leatham GF. Extracellular enzymes produced by the cultivated mushroom *Lentinus edodes* during degradation of lignocellulosic medium. *Appl Environ Microbiol* 1985; 50: 859-867.