

Efecto combinado del cobre y pH inicial del medio de cultivo sobre la producción de lacasa y manganeso peroxidasa por *Stereum hirsutum* (Willd) Pers.

Nora Mouso, Leandro Papinutti y Flavia Forchiassin

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

Resumen *Stereum hirsutum* es un hongo causante de pudrición blanca que produce las enzimas ligninolíticas lacasa y manganeso peroxidasa. La producción de estas enzimas es máxima (en nuestras condiciones experimentales) cuando la concentración de Cu^{++} agregado ronda los valores de 250 μM y en un pH de cultivo de alrededor de 5,5. El ajuste de los valores de producción enzimática a una ecuación lineal mostró que existen interacciones negativas entre el aumento del valor de pH y la concentración de cobre.

Palabras clave *Stereum hirsutum*, Ligninasas, Lacasa, Manganeso peroxidasa

Combined effect of copper and initial pH of the culture medium on production of laccase and manganese peroxidase by *Stereum hirsutum* (Willd) Pers.

Summary *Stereum hirsutum* is a white-rot fungus which produces laccase and manganese peroxidase as part of its ligninolytic system. Maximal ligninases production (under the conditions studied) was obtained in the media containing 250 μM Cu^{++} along with a pH value of 5.5. The fitting of ligninase production to a linear equation showed negative interaction between increasing values of pH and concentration of copper.

Key words *Stereum hirsutum*, Ligninases, Laccase, Manganese peroxidase

Los hongos causantes de pudrición blanca son los únicos organismos capaces de degradar eficientemente la lignina hasta su completa mineralización. Este proceso se debe a que estos hongos poseen un sistema enzimático que ataca la molécula de lignina mediante oxidaciones. Las enzimas ligninolíticas descritas hasta el momento son: manganeso peroxidasa (MnP), lignina peroxidasa, peroxidasa versátil (comparte propiedades catalíticas con las dos anteriores) [1] y lacasa, las cuales existen en diferentes combinaciones en estos hongos. Estas enzimas pueden ser

reguladas por diversos factores, como los metales pesados cuya influencia sobre la producción de enzimas lignolíticas ha sido estudiada extensamente en diversas especies [2].

Stereum hirsutum es un basidiomicete causante de pudrición blanca que produce lacasa y MnP. El objetivo del presente trabajo es estudiar el efecto combinado de la variación del pH del medio de cultivo junto con la concentración de CuSO_4 y las posibles interacciones entre ambos factores.

Se utilizó la cepa BAFC 2234 de *S. hirsutum* perteneciente al cepario de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. El hongo fue mantenido en tubos pico de flauta con agar (2%) y extracto de malta (1,2%) a 4 °C tras 10 días de crecimiento a 28 °C.

El organismo en estudio fue inoculado en medio GA [3]. El pH deseado se alcanzó mediante la adición de HCl 1N. El cobre fue agregado como $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Se incubó en condiciones estáticas a 28 °C. La biomasa fue estimada como peso seco tras la filtración de los cultivos y secado a 80 °C. Los sobrenadantes del cultivo fueron guardados a -20 °C hasta su utilización para las determinaciones enzimáticas.

Se realizaron medios de cultivo con diferentes combinaciones en las concentraciones de cobre y pH inicial. Se eligieron 3 concentraciones de CuSO_4 y dos valores de pH iniciales. Los cultivos se realizaron por duplicado

Dirección para correspondencia:

Dra. Nora Mouso
Laboratorio de Micología Experimental
Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires
Ciudad Universitaria, Pab.II, 1428
Buenos Aires, Argentina
Fax: +54-11-4576-3384
E-mail: mouson@bg.fcen.uba.ar

Aceptado para publicación el 16 de diciembre de 2003

y se muestrearon periódicamente hasta el día 30 de crecimiento. Los niveles de cada uno de los factores fueron codificados asignándose los valores de -1 y 1 para el menor y mayor nivel respectivamente. Los valores reales y codificados se muestran en la tabla:

Tabla. Factores ensayados y sus valores en el medio de cultivo.

Factor	Valor real (valor codificado)
CuSO ₄ *	0 (-1)
	125 (0)
	250 (1)
pH	5 (-1)
	6,5 (1)

* Valores de concentración en µM.

Los valores de actividad obtenidos fueron ajustados a la ecuación lineal siguiente, con tres coeficientes:

$$Y = aX_1 + bX_2 + cX_1X_2$$

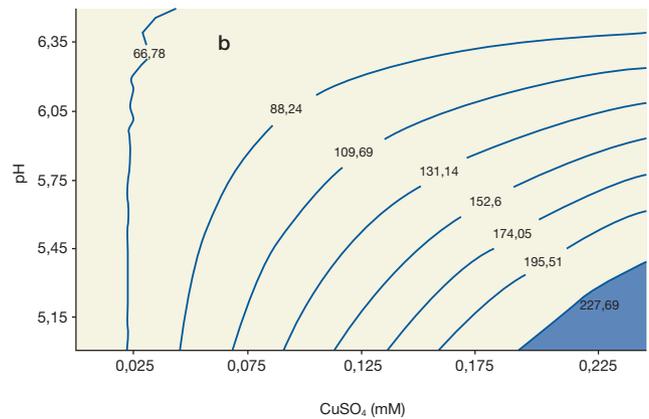
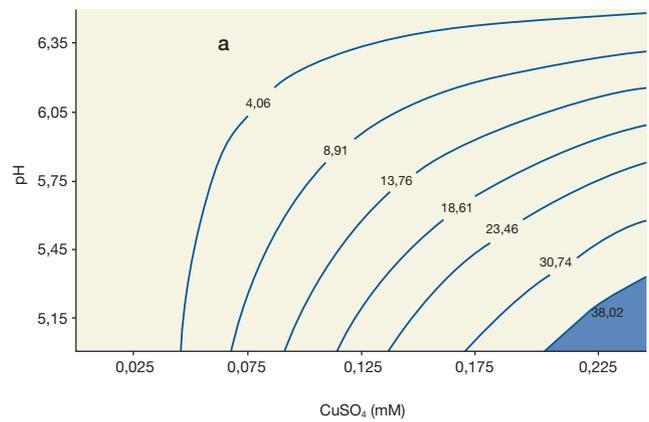
donde Y es la variable respuesta (actividad lacasa o MnP), X₁ es la concentración de CuSO₄, X₂ es el valor de pH inicial, y a, b y c son los coeficientes a hallar mediante el ajuste a la ecuación. Cuanto mayores sean los coeficientes, mayor será el efecto que cause el término sobre la actividad enzimática. El análisis de datos y el ajuste a la ecuación lineal se realizó utilizando el programa Statistica 5.1.

Lacasa: se midió según el método empleado por Niku-Paavola [4] a pH 3,6, y a 30 °C.

MnP: se midió según el método empleado por Kuwahara [5] a 30 °C. Las unidades enzimáticas (U) se definieron como mmoles de producto formado por minuto bajo las condiciones del ensayo.

Son muchos los factores que afectan la producción de enzimas ligninolíticas en hongos causantes de pudrición blanca. Además, las diferentes cepas responden de un modo particular a cada uno de estos factores. Debido a esto, el estudio combinado de dos o más factores es más acertado para estudiar no sólo la producción de estas enzimas sino la posible interacción entre estos compuestos. Para esto los datos de actividad obtenidos fueron ajustados a la ecuación, obteniéndose valores de correlación (R²) de 0,80 y 0,81 para lacasa y MnP respectivamente, es decir que el 80% de la variación observada se explica con el modelo aplicado. En estudios preliminares con esta cepa, se observó la influencia del pH inicial del cultivo en la producción de las enzimas. Los cultivos realizados en GA con un rango de pH inicial desde 3,2 a 6,4 mostraron que la máxima producción de lacasa ocurrió a pH inicial 5 y la máxima producción de MnP a pH inicial 6,2. Cuando se incorporó al estudio la influencia del Cu²⁺, las producciones de lacasa y MnP marcaron nuevas diferencias (datos no publicados).

Los cultivos fueron muestreados periódicamente para biomasa y actividad enzimática hasta el día 30 de crecimiento, en ese día los valores de actividad decayeron, mientras que los de biomasa lo hicieron al día 15 y éstos en ningún muestreo fueron significativamente diferentes entre los distintos tratamientos (datos no mostrados). Para el ajuste a la ecuación lineal se eligieron los valores correspondientes al día 26 cuando la actividad resultó máxima. Luego del ajuste se encontró que para *S. hirsutum* existen interacciones negativas (Figura) entre los factores pH y cobre para la producción de ambas enzimas (-12,52



$$\text{Lacasa} = 11,51 + 14,16 X_1 - 9,53 X_2 - 12,52 X_1 X_2 \quad (R^2 = 0,80)$$

$$\text{MnP} = 116,33 + 61 X_1 - 47 X_2 - 57 X_1 X_2 \quad (R^2 = 0,81)$$

Figura 1. Gráficos de contorno, según las ecuaciones mostradas al pie, para la producción de MnP (mU ml⁻¹) (a) y lacasa (U ml⁻¹) (b). La zona sombreada corresponde a las condiciones que producen la mayor actividad. X₁: cobre; X₂: pH.

y -57 para lacasa y MnP respectivamente), junto con un efecto positivo del cobre sobre ambas actividades. A partir de estas ecuaciones se confeccionaron gráficos de contorno (Figura) con el fin de mostrar más claramente estos efectos. Se observa que ambos gráficos son muy similares, la zona sombreada corresponde a la de máxima producción y se ubica donde la concentración de Cu²⁺ es la más alta y el valor de pH el más bajo (interacción negativa). Si bien no es un hecho común que la MnP se induzca con otro metal que no sea Mn²⁺ ya se ha mostrado que en *S. hirsutum* el Cd²⁺ induce la síntesis de esta enzima [6]. También en *Trametes trogii* la producción de lacasa y MnP son incrementadas con el agregado de CuSO₄ al medio [3]. Es interesante notar que las condiciones óptimas para la producción de ambas enzimas son las mismas, este hecho es una ventaja para procesos de biorremediación dado que en un mismo medio se produce la máxima cantidad de enzima y fue demostrado que éstas actúan sinérgicamente en procesos de degradación [7].

Hasta el momento el valor de pH inicial en el medio de cultivo no fue considerado como un factor importante en la regulación de la producción de enzimas ligninolíticas, sin embargo en este trabajo se observó un efecto individual muy marcado además del efecto de la interacción con la concentración de cobre en el medio. La lacasa y MnP son, en términos biotecnológicos, uno de los grupos de enzimas que más importancia adquirieron en los últimos años debido a que podrían ser aplicadas en procesos de biorremediación de aguas y suelos. Estas enzimas

pueden degradar sustancias tóxicas y recalcitrantes en el ambiente como bifenilos policlorados (PCBs), hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), pentaclorofenol, organoclorados, organofosfatos y tinturas de uso industrial [8]. Por lo tanto se busca la producción de ligninasas mediante sistemas que sean baratos y justifiquen el proceso. Si bien la utilización de compuestos como el

cobre, manganeso o sustancias aromáticas es ampliamente adoptado para la producción de ligninasas junto con medios de cultivo basados en sustratos naturales como salvado de trigo, aserrín, etc. en este trabajo mostramos que la regulación del pH inicial del medio es muy importante no sólo por el factor *per se* sino por posibles interacciones con otros compuestos.

Bibliografía

1. 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.
2. Baldrian P. Interaction of heavy metals with white-rot fungi. Enz Microb Technol 2003; 32: 78-91
3. Levin L, Forchiassin F, Ramos AM. Copper induction of lignin-modifying enzymes in the white-rot fungus *Trametes trogii*. Mycologia 2002; 94: 377-383.
4. Niku-Paavola ML, Raaska M, Itavaara M. Detection of white-rot fungi by non-toxic stain. Mycol Res 1990; 94: 27-31.
5. Kuwahara M, Glenn JK, Morgan MA, Gold MH. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Lett 1984; 169: 247-250.
6. Baldrian P, Gabriel J, Nereud F. Effect of cadmium on the ligninolytic activity of *Stereum hirsutum* and *Phanerochaete chrysosporium*. Folia Microbiol 1996; 41: 363-367.
7. Galliano H, Gas G, Seris JL, Boudet AM. Lignin degradation by *Rigidoporus lignosus* involves synergistic action of two oxidizing enzymes: Mn peroxidase and laccase. Enzyme Microb Technol 1991; 13: 478-482.
8. Pointing SB. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. Appl Microbiol Biotechnol. 2002; 57: 20-33.