

Actividad enzimática y degradación de diferentes tipos de residuos orgánicos por *Saccobolus saccoboloides* (Fungi, Ascomycotina)

Luis Alberto Diorio, Flavia Forchiassin, Víctor Leandro Papinutti y Diana Viviana Sueldo

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

Resumen

Se analizó la producción enzimática y la capacidad de degradación de residuos orgánicos sólidos de *Saccobolus saccoboloides*, un hongo no convencional en este tipo de aplicaciones. Fue cultivado en medio líquido sintético con celulosa cristalina y agitación, y en el octavo día de crecimiento fue trasvasado a frascos con 300 mg de restos de césped. La capacidad de degradación fue evaluada por la actividad carboximetilcelulasa, xilanasa y amilasa (medidas por métodos de placa), y por pérdida de peso luego de hidrólisis con NaOH 1%. Posteriormente se modificó la masa de residuos (entre 300 y 1800 mg/frasco) y el tipo (papel de filtro, papel de periódico, cartón corrugado, aserrín y viruta de madera). En este caso las actividades enzimáticas fueron mayores entre 300 y 600 mg de residuos/frasco. Se observó la disgregación total de los componentes celulares en los papeles y en el cartón y una alta pérdida de peso, pero *S. saccoboloides* no fue hábil en el ataque a los residuos derivados de maderas.

Palabras clave

Saccobolus saccoboloides, Carboximetilcelulasa, Xilanasas, Amilasas, Degradación de residuos sólidos

Degradation of lignocellulosic wastes by *Saccobolus saccoboloides* (Fungi, Ascomycotina)

Summary

The ability to degrade organic solid wastes by the fungus *Saccobolus saccoboloides* was studied. The organism, unusual in such studies, was cultivated in synthetic liquid media with agitation, and on day 8 of growth the mycelium was passed to flasks with trimming. On day 16 of growth, the trimming degradation was assessed by carboxymethylcellulase, xylanase, and amylase activities evaluation, and NaOH 1% hydrolysis. Later on, the type of waste was modified (trimming, filter paper, newspaper, cardboard, sawdust and wood shaving were used) as well as the mass (300-1800 mg/flask). In these cases the enzymatic activities increased between 300 and 600 mg/flask. The total separation of the cellular components in all types of paper and cardboard was observed, together with a high loss of weight. *S. saccoboloides* was not able to degrade the wood wastes.

Key words

Saccobolus saccoboloides, Carboxymethylcellulase, Xylanases, Amylases, Solid wastes degradation

La disposición final de los residuos orgánicos sólidos es un problema que afecta al medio ambiente en todas las regiones del mundo. Actualmente se trata de reducir la masa de este tipo de residuos aplicando métodos biotecnológicos que tienden a reducir su volumen y a favorecer su reutilización, siendo los restos de papel y de cartones uno de los principales objetos de estos estudios.

Estos materiales, constituidos principalmente por celulosa, hemicelulosas y lignina pueden ser tratados con hongos filamentosos gracias a su producción de exoenzimas capaces de degradarlos. El xilano es el componente mayoritario de la hemicelulosa, la α -1,4-endoxilanasas y la α -xilosidasa son las enzimas responsables de la hidrólisis de la cadena principal y representan los principales componentes del sistema xilanolítico.

Dirección para correspondencia:

Dr. Luis A. Diorio
Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Pabellón II, Ciudad Universitaria
1428 Buenos Aires, Argentina
E-mail: luis@bg.fcen.uba.ar

Aceptado para publicación el 10 de Marzo de 2003

El sistema celolítico comprende varias enzimas como las endoglucanasas, las exoglucanasas (celobiohidrolasas) y las α -glucosidasas. La importancia de estas enzimas en la degradación de residuos sólidos fue demostrada en el tratamiento de residuos de banana con *Trichoderma harzianum*, *Acrophialophora nainiana* y *Humicola grisea* [1]. Son utilizadas ampliamente en la industria textil, del papel y en la alimentaria [2].

En la reducción biológica de la masa de los residuos lignocelulósicos se usan técnicas de fermentación en estado sólido. Este tipo de técnicas, como el compostaje, son preferidas ante las fermentaciones en estado líquido por sus bajos costes y facilidad de manejo frente a los grandes volúmenes de residuos a tratar [3]. No obstante tienen períodos de aplicación prolongados (de cuatro a diez meses) y los intentos por reducirlos utilizando biorreactores aeróbicos pueden no ser efectivos [4].

Otra alternativa en la reducción de residuos y/o su pretratamiento es la aplicación de enzimas purificadas [5], pero si bien este tipo de procesos involucran tiempos de incubación menores de sólo unos pocos días, poseen costes muy elevados.

En el presente trabajo se muestran los resultados preliminares del análisis de la capacidad de degradación de residuos orgánicos sólidos de *Saccobolus saccoboloides*. Este organismo es un hongo ascomiceto, filamentoso, con una importante capacidad celolítica en medio sintético líquido y 24 °C de temperatura [6,7], pero nunca ha sido analizado desde el punto de vista biotecnológico. Es un habitante normal del estiércol de herbívoros responsable de reciclar esos residuos celulósicos [8].

Materiales y Métodos

Organismos. Se usó la cepa BAFC 2822 de *Saccobolus saccoboloides* (Fungi, Ascomycotina).

Medios de cultivo

Medio sintético: celulosa cristalina, 10 g; asparagina, 3 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 g; K_2HPO_4 , 0,6 g; KH_2PO_4 , 0,5 g; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,5 mg; $MnCl_2 \cdot H_2O$, 0,09 mg; H_3BO_3 , 0,07 mg; $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$, 0,02 mg; $FeCl_3$, 1 mg; $ZnCl_2$, 10 mg; biotina, 5 μ g; Cl-tiamina, 0,1 mg; agua destilada hasta 1000 ml. Todos los reactivos usados fueron de grado analítico.

Medio con residuos: se utilizaron restos de césped, papel de filtro Whatman N° 1, papel de periódico, cartón corrugado, aserrín y viruta de madera de pino. Las muestras se cortaron hasta obtener partículas de hasta unos 3 mm de longitud. Se prepararon frascos Erlenmeyer de 125 ml conteniendo 300, 400, 600, 800, 1200 ó 1800 mg de muestra seca de cada tipo de residuo y se les agregó 5, 6, 8, 10, 15 ó 21 ml de agua desionizada respectivamente. En todos los casos los medios fueron esterilizados en autoclave durante 20 min a 121 °C.

Inóculos y condiciones de cultivo

Cultivo en medio sintético: el micelio de *S. saccoboloides* se sembró en placa de Petri con 20 ml de agar malta (Extracto de malta, 1,3 %; Agar, 1,8 %). Se incubó siete días a 28 °C. Los inóculos se hicieron a partir de cubos de agar de 5 mm de lado retirados de los bordes de colonias con cinco días de crecimiento. Los cultivos se realizaron en frascos Erlenmeyer de 125 ml con 30 ml de medio sintético, a 28 °C y con agitación de 120 rpm. Las muestras fueron tomadas en los momentos que se indican más adelante.

Cultivo en medio con restos de césped: se preincubó en medio sintético bajo las condiciones antes definidas durante ocho días. Al cabo de ese tiempo se volcó estéril-

mente la totalidad del contenido de cada uno de estos cultivos en Erlenmeyers con 300 mg de recortes de césped (de hasta 4 mm de longitud). Cinco frascos fueron inmediatamente muestreados como testigos de tiempo cero. Los cultivos se desarrollaron a 28 °C con agitación de 120 rpm.

Cultivo en medio con distintas cantidades de restos de césped: se preincubó en medio sintético en las condiciones previamente indicadas. Después de ocho días, el contenido del frasco fue agregado en su totalidad a frascos con 300-1800 mg de residuos verdes secos. Tres frascos de cada tratamiento fueron inmediatamente muestreados como testigos de tiempo cero. Los restantes fueron mantenidos a 28 °C con agitación de 120 rpm.

Cultivo en medio con distintos tipos de residuos: se preincubó en medio sintético durante ocho días. Luego, el contenido del cultivo fue trasvasado a frascos con 300-1800 mg de peso seco de recortes de césped, papel de filtro, papel de periódico, cartón corrugado, aserrín o viruta de madera. Tres frascos de cada tratamiento fueron muestreados como testigos de tiempo cero. Los cultivos fueron mantenidos a 28 °C con agitación. El tamaño de las partículas utilizadas nunca superó los 4 mm de longitud.

Todos los cultivos fueron hechos por quintuplicado.

Métodos analíticos

Muestreos: el micelio y los restos lignocelulósicos fueron separados del medio líquido por filtración en los momentos indicados en el trabajo. Las muestras líquidas fueron guardadas a -20 °C para ser usadas posteriormente en las determinaciones enzimáticas. Las muestras sólidas fueron secadas en estufa a 80 °C durante 24 h.

Proteínas del micelio: se hidrolizaron 50 mg de muestra sólida (previamente secada y molida finamente con mortero) con 1 ml de NaOH 1N durante 30 min, luego se centrifugó a 1200 rpm, 10 min, y se tomó el sobrenadante. Se determinaron proteínas solubles usando el método de Bradford [9].

Actividad carboximetilcelulasa (CMC_{asa}): fue determinada por el método de placa propuesto por Magnelli *et al.* [10] usando carboximetilcelulosa (CMC) como sustrato. La actividad se expresa como superficie total del halo de degradación en mm².

Actividad xilanasas: se utilizó una modificación del método de placa antes citado, reemplazando CMC por xilano (xilano, 100 mg; agar, 1,7 g; agua destilada, hasta 100 ml). Las placas fueron reveladas con Rojo Congo 0,1% en agua.

Actividad amilasa: siguiendo el método de placa, se reemplazó CMC por almidón (almidón soluble, 10 mg; agar, 1,7 g; agua destilada, hasta 100 ml). Las placas fueron reveladas con Lugol.

pH: fue determinado con pHmetro con electrodo de vidrio.

Hidrólisis con NaOH 1%: según método estándar de pérdida de peso seco propuesto por TAPPI (T 212 os-76).

Cada muestra fue analizada por triplicado. Con los datos obtenidos se realizó un ANOVA de un factor al 0,5%.

Resultados y Discusión

Crecimiento en medio sintético. El micelio de *S. saccoboloides* creció de manera difusa en el medio de cultivo sintético, sin formar agregados hifales. La cinética de crecimiento fue evaluada a partir de la variación del contenido de proteínas solubles del micelio en función del tiempo (Figura 1). La etapa de crecimiento exponencial fue muy marcada durante los primeros ocho días para sufrir entonces una larga fase estacionaria hasta el 16.

Luego se evidenció la fase de decaimiento (Figura 1).

El pH inicial del medio ($\pm 6,5$) aumentó de manera muy evidente desde el día 4 hasta el 8 de desarrollo, y a partir de ese momento se mantuvo en valores que variaron entre 8,3 y 8,7 (Figura 1).

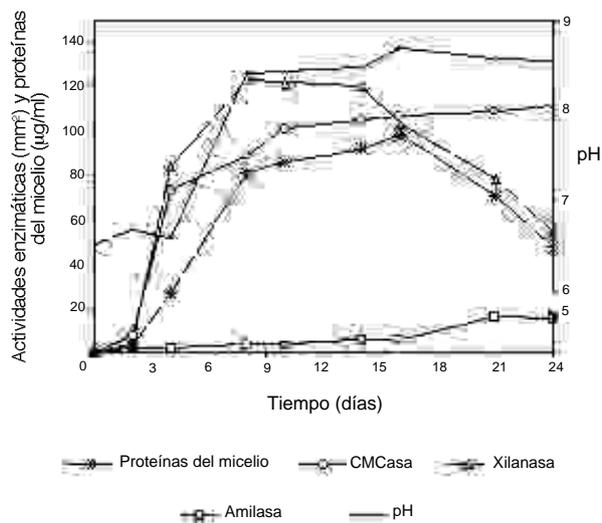


Figura 1. Crecimiento de *S. saccoboloides* en medio de cultivo sintético. Variación de las proteínas del micelio, del pH del medio, y de las actividades CMCasa, xilanasas y amilasa en función del tiempo.

La actividad enzimática no pudo ser determinada por los métodos espectrofotométricos convencionales ya que se hallaron blancos de lectura muy elevados que interferían con las determinaciones de actividad de las muestras, por lo que se aplicaron técnicas de medición en placa para el caso de la CMCasa [10] o modificaciones del mismo para xilanasas y amilasas. La actividad CMCasa, generada principalmente por la enzima endoglucanasa, sufrió un aumento abrupto entre los días 2 y 4 de desarrollo, y desde el día 5 en adelante dicho aumento se mantuvo, aunque fue menos marcado (Figura 1). Los mayores valores detectados se encontraron entre 98,7 mm² en el día 11 y 109,3 mm² en el día 24.

El comportamiento de la enzima xilanasas fue, durante los primeros nueve días, similar al de la CMCasa, aunque en este último caso su actividad decayó marcadamente a partir del día 14 (Figura 1). En el día octavo de crecimiento se detectó el pico de actividad, con un promedio de 119,7 mm².

Por el contrario, la actividad amilasa fue pobre a lo largo del desarrollo del hongo, mostrando un aumento siempre constante (Figura 1). El máximo valor observado fue el día 21 con 18,8 mm².

Degradación del material verde. Tomando como base el comportamiento de *S. saccoboloides* en medio sintético, se decidió usar dicho medio como preinóculo, utilizándolo para la degradación de residuos sólidos en plena etapa de crecimiento y capacidad degradativa. Los criterios usados en la determinación de dicho momento fueron: i) La presencia de una masa miceliar elevada (alto contenido de proteínas del micelio). ii) Que el organismo se hallara en la etapa de crecimiento. iii) La existencia de elevadas y crecientes actividades enzimáticas en el medio de cultivo. Así se decidió trasvasar el medio a otro con

300 mg de recortes de césped y 5 ml de agua deionizada en el día octavo de crecimiento.

La actividad CMCasa y la xilanasas sufrieron una reducción inicial debido, posiblemente a la absorción de las enzimas sobre el sustrato sólido. En cambio, la actividad amilasa sufrió un claro aumento (Figura 2). A lo largo de la experiencia la actividad CMCasa mantuvo valores relativamente estables y elevados (entre 112,4 y 123,1 mm²), y la xilanasas se mantuvo estable hasta el día 16 de desarrollo cuando comenzó a decaer (Figura 2). La actividad amilasa registró valores estables y mayores que los observados en medio sintético (entre 32 y 44,8 mm²).

Como medida de la degradación de los residuos sólidos se empleó el método estándar de hidrólisis con NaOH al 1% en caliente. A través de este método se eliminan los carbohidratos de bajo peso molecular provenientes principalmente de la degradación de hemicelulosas y celulosa provocadas por la actividad del hongo sobre los restos sólidos [11]. La degradación del residuo sólido fue en constante aumento desde el momento de la siembra hasta el final del experimento (Figura 2).

Durante los primeros siete días de iniciada la mezcla (día 9 al 16 de la experiencia), la degradación de los residuos aumentó con una tasa de pérdida de peso seco promedio de 4,6 mg/100 mg/día, mientras que durante los últimos ocho días (desde el 16 al 24) la tasa promedio se redujo a 2,1 mg/100 mg/día. La reducción de la tasa de

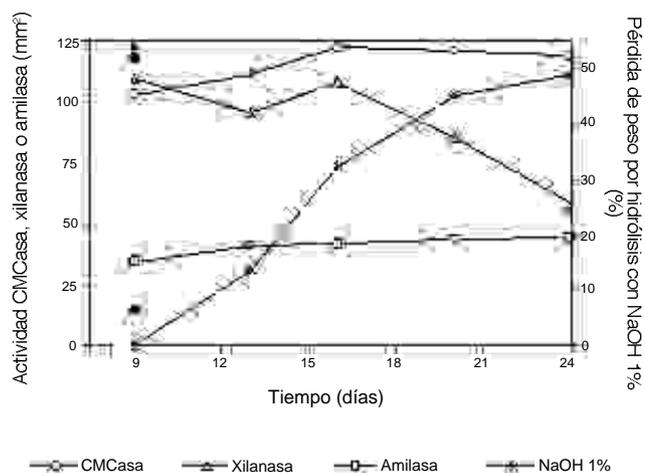


Figura 2. Degradación de restos verdes por *S. saccoboloides*. Variación de las actividades CMCasa, xilanasas y amilasa en el medio, y pérdida de peso seco tras la hidrólisis con NaOH al 1% del residuo verde.

degradación en el día 16 puede ser relacionada con la reducción de la actividad xilanasas ya descrita (Figura 2).

Como en el medio de cultivo sintético, el micelio de *S. saccoboloides* creció de manera difusa, sin formar agregados hifales o primordios.

Variación de la cantidad y tipo de residuo. Se cultivó a *S. saccoboloides* en medio sintético durante ocho días, momento en el que fue mezclado con recortes de césped, papel de filtro, papel de periódico, cartón corrugado, aserrín y viruta de madera. Se varió la masa seca de los residuos entre 300 y 1800 mg por frasco y se les agregó agua desionizada en las cantidades indicadas previamente. En estas condiciones se incubó durante otros ocho

Tabla. Degradación de residuos orgánicos sólidos por *Saccobolus saccoboloides*. Valores de pH, pérdida de peso seco por hidrólisis con NaOH al 1%, y de actividades CMCasa, xilanasa y amilasa, tras ocho días de cultivo en medios con distintos tipos y cantidades de residuos.

Tipo de Residuo	Cantidad de Residuo (mg)	CMCasa (mm ²)	Xilanasa (mm ²)	Amilasa (mm ²)	pH Final	Pérdida de peso (%)
Césped	300	150,1 a	171,5 a	29,6 d	7,78	54,6 c
	400	154,2 a	138,6 c	30,0 d	7,73	52,0 c
	600	145,5 b	136,5 c	31,2 d	7,35	48,2 d
	800	108,7 d	95,4 e	29,5 d	7,23	43,8 f
	1200	102,1 e	99,2 d	33,2 d	7,02	43,6 f
	1800	108,1 d	79,8 f	44,7 b	6,65	39,1 g
Papel de Filtro	300	147,0 b	176,3 a	30,5 d	7,97	62,0 a
	400	149,7 a	155,4 b	32,9 d	7,91	58,0 b
	600	112,8 d	147,0 b	31,4 d	7,66	58,1 b
	800	101,3 e	108,9 d	37,0 c	7,08	49,9 d
	1200	98,0 e	103,3 d	40,0 c	7,11	52,8 c
	1800	98,2 e	91,0 e	45,2 b	7,00	44,4 f
Papel de Periódico	300	124,6 c	147,8 b	40,3 c	8,03	52,0 c
	400	125,2 c	144,0 b	42,0 c	8,12	48,5 d
	600	111,1 d	132,1 c	41,9 c	7,89	49,9 d
	800	102,3 e	105,5 d	44,7 b	7,21	43,2 f
	1200	91,6 f	107,0 d	46,2 b	7,39	49,1 d
	1800	86,2 f	92,5 e	48,3 b	7,30	43,4 f
Cartón corrugado	300	116,2 d	135,4 c	35,1 d	6,38	47,9 e
	400	100,8 e	110,8 d	34,8 d	6,41	45,0 f
	600	99,2 e	113,3 d	37,1 c	6,03	47,8 f
	800	91,6 f	85,2 e	34,5 d	5,98	46,4 e
	1200	86,9 f	83,1 e	61,0 a	6,04	42,8 f
	1800	76,3 g	74,4 f	45,9 b	5,91	38,9 g
Aserrín	300	78,9 f	23,4 g	0,0	7,76	28,7 h
	400	72,7 g	0,0	0,0	7,85	21,1 i
	600	67,8 g	0,7 i	0,0	7,32	19,9 i
	800	72,8 g	1,4 h	0,0	7,29	14,7 j
	1200	67,6 g	0,0	6,3 f	7,18	14,8 j
	1800	62,9 h	0,0	13,5 e	7,17	9,4 k
Viruta	300	77,1 f	0,0	0,0	5,76	15,4 j
	400	69,0 g	0,0	0,0	6,06	14,2 j
	600	71,3 g	0,0	0,0	5,89	12,7 j
	800	75,4 f	1,1 h	5,4 f	6,37	4,7 l
	1200	64,5 g	0,0	15,6 e	6,15	9,4 k
	1800	61,3 g	0,0	35,8 d	5,75	3,7 l

Las diferencias significativas entre los valores se hallaron mediante un ANOVA de un factor. Para letras iguales dentro de una misma columna no existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

días, momento en el que se realizaron todos los muestreos. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla.

En términos generales, la actividad CMCasa se redujo ante el aumento de la cantidad de residuos en el medio, independientemente del tipo utilizado. Las mayores actividades se encontraron en los residuos de césped y los derivados del papel, mientras que los subproductos de la madera mostraron actividades un 50% menores.

Las xilanasas se comportaron de manera similar aunque se detectó una importante reducción en presencia de aserrín y de viruta de madera (Tabla) debido posiblemente a la absorción de las enzimas sobre el sustrato, y a la baja disponibilidad de los polisacáridos debido al alto contenido de lignina.

La actividad amilasa aumentó junto con el aumento de la cantidad de residuo, lo que probablemente se debió a la presencia de sustancias inductoras.

La pérdida de peso tras el tratamiento con NaOH 1% fue proporcional a las actividades enzimáticas medidas. Las mayores pérdidas se hallaron entre 300 y 600 mg de residuos (Tabla).

Los valores máximos de pérdida de peso medidos por el método de NaOH 1% (entre 47,9 y 62,0%) se correspondieron con valores de entre 24,1 y 30,3% de pérdida de peso seco total de las muestras sin hidrólisis. Esta reducción de la masa de los residuos, que fue obtenida tras sólo ocho días de tratamiento, es similar al 27% de pérdida lograda por el método de compostaje de restos de papel de periódico tras 10 meses de tratamiento [12].

Se observó con microscopio óptico la disgregación total de los componentes celulares en los papeles y en el cartón, generando de esta manera un residuo útil para la fabricación de papel por reciclado.

En términos generales *S. saccaboloides* no fue hábil en el ataque a los residuos derivados de maderas donde la pérdida de peso fue baja.

En este trabajo el hongo coprófilo *S. saccaboloides*, que pertenece a un grupo de hongos poco estudiado por sus capacidades biotecnológicas, ha demostrado importantes cualidades en la degradación de residuos sólidos cuando se lo cultiva en medio líquido con agitación.

A partir de los resultados presentados, se podrá escalar el proceso teniendo como objetivos principales el biopulpado y reciclado de derivados de la industria papelera, la degradación de residuos sólidos verdes con bajos contenidos de lignina, y la obtención de enzimas celulolíticas, xilanolíticas y amilolíticas para su posterior aplicación en la industria.

Nuestro agradecimiento a la Universidad Nacional de Buenos Aires y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por la financiación parcial de este trabajo.

Bibliografía

1. Medeiros RG, Soffner MLAP, Thome JA, et al. The production of hemicellulases by aerobic fungi on medium containing residues of banana plant as substrate. *Biotechnol Prog* 2000; 16: 522-324.
2. Bakir U, Yavascaoglu S, Guvenc F, Ersayin A. An endo- β -1,4-xylanase from *Rhizopus oryzae*: production, partial purification and biochemical characterization. *Enzyme Microbiol Technol* 2001; 29: 328-334.
3. Awafo VS, Chahal DS, Simpson BK, Le GBB. Production of cellulase systems by selected mutants of *Trichoderma reesei* in solid-state fermentation and their hydrolytic potentials. *Appl Biochem Biotechnol* 1996; 57/58: 461-470.
4. Atkinson CF, Jones DD, Gauthier JJ. Microbial activities during composting of pulp and paper-mill primary solids. *W J Microbiol Biotechnol* 1997; 13: 519-525.
5. Wu J, Ju LK. Enhancing enzymatic saccharification of waste newsprint by surfactant addition. *Biotechnol Prog* 1998; 14: 649-652.
6. Magnelli PE, Ramos AM, Forchiassin F. Factors influencing cellulase production by *Saccobolus saccaboloides*. *Mycologia* 1996; 88: 249-255.
7. Magnelli PE, Forchiassin F. Regulation of the cellulase complex by *Saccobolus saccaboloides*: induction and repression by carbohydrates. *Mycologia* 1999; 91: 359-364.
8. Sivori AS, Mercuri OA, Forchiassin F. Producción de celulasas por tres especies de *Ascobolus* (Ascomycotina, Pezizales). *Bol Soc Argent Bot* 1997; 33: 1-6.
9. 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.
10. Magnelli PE, Martínez A, Mercuri OA. Método simple para determinar actividad celulolítica en hongos. *Rev Arg Microbiol* 1997; 29: 210-214.
11. Procter AR, Chow WM. A chip quality index for rot. *Pulp Paper Mag Can* 1973; 74: 97.
12. Brouillette M, Trepanier L, Gallichans J, Beauchamp C. Composting paper mill deinking sludge with forced aeration. *Can Agr Eng* 1996; 38: 115-122.