



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

**ACTIVIDAD XENOBIÓTICA DE *STEREUM HIRSUTUM*, UN  
HONGO DE LA PUDRICIÓN BLANCA DE LA MADERA**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el Área Ciencias Biológicas

Nora Mouso

Director de Tesis: Dra. Flavia Forchiassin

Consejero de Estudios: Dra. Flavia Forchiassin

Lugar de trabajo: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental. Laboratorio de Micología Experimental.

Buenos Aires, 2007

**ACTIVIDAD XENOBIÓTICA DE *STEREUM HIRSUTUM*, UN  
HONGO DE LA PUDRICIÓN BLANCA DE LA MADERA**

|  |  |  |
|--|--|--|
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |

# ACTIVIDAD XENOBIÓTICA DE *STEREUM HIRSUTUM*, UN HONGO DE LA PUDRICIÓN BLANCA DE LA MADERA.

## Resumen

Los hongos causantes de la pudrición blanca de la madera son los únicos capaces de despolimerizar la lignina y degradarla hasta su completa mineralización por acción de las ligninasas. *Stereum hirsutum* es un Basidiomycete que pertenece a este grupo fisiológico de hongos, presenta actividad lacasa y manganeso peroxidasa (MnP). Se optimizaron las condiciones para la producción de estas enzimas en medio líquido. Los metales pesados produjeron mejores resultados al ser utilizados como inductores de la producción de ligninasas con respecto a los compuestos aromáticos. Una característica relevante de la cepa fue que sometida a estrés por pH, temperatura y xenobióticos como metales pesados y aromáticos no se produjo una reducción del crecimiento y se detectó actividad de ligninasas.

Los cultivos en sustrato sólido presentaron como ventaja un importante incremento en la producción de enzimas y una estructura micelio sustrato de difícil disgregación que permitió realizar ensayos de decoloración en forma aeróbica originando como productos de la degradación del Verde de Malaquita, un fungicida, compuestos no tóxicos.

Las ligninasas producidas tanto en SmF (fermentación sumergida) como en SSF (fermentación en sustrato sólido) fueron dos isoenzimas de lacasa de 66 y 102 kDa y una MnP de 26 kDa. Los ensayos de electroforesis permitieron establecer que ambas isoenzimas de lacasa y la MnP tienen acción decolorante sobre el índigo carmín y sobre el verde de malaquita.

Palabras claves: *Stereum hirsutum*, hongo de la pudrición blanca, enzimas lignolíticas, decoloración, tinturas industriales, detoxificación, estrés.

# XENOBIOTIC ACTIVITY OF *STEREUM HIRSUTUM*, A WHITE ROT FUNGUS

## Summary

White rot fungi are the only organisms able to depolymerize and degrade lignin to its complete mineralization. *Stereum hirsutum* is a white rot Basidiomycete that presents laccase and manganese peroxidase activities. Conditions for enzymes production were optimized. Heavy metals were best inducers of enzyme production as compared with aromatic compounds. A relevant fact is that this strain did not show growth decrease and showed good enzyme production when submitted to stress conditions by temperature, pH, and xenobiotics as heavy metals and aromatic compounds.

Solid state cultures had the advantage of an important increment in enzyme production and a compact mycelial-substrate structure, that enables its usage in decolorization assays in aerobic conditions, giving non toxic compounds as degradation products of malachite green, a fungicide.

Ligninases produced, both in submerged and solid state fermentation were two laccase isozymes of 66 and 102 kDa and a MnP of 26 kDa. Electrophoresis assays allowed to prove the direct role of the three isozymes on decolorization of indigo carmine and malachite green.

Key word: *Stereum hirsutum*, white-rot fungi, ligninolytic enzymes, decolorization, textile dyes, detoxification, stress.

## **Agradecimientos**

- A Flavia, como mi directora de Tesis y a Flavia como persona, por recibirme, por darme un espacio en el laboratorio 8, por hacerme un lugar en el momento que más lo necesitaba.
- A toda la gente del 8 y del 9, María Esther, Diana, Luís, Marcela, Laura, Leandro, Isabel y Ana.
- Carlitos, gracias por el aguante y gracias por el tango.

*A Consuelo, Agustina, Josefa, Purificación, Edel, María Verónica, Jimena y Luz, seis generaciones, llevo en mi algo de cada una de ellas.*

*A mi padre, quien inculcó en mí el orgullo por la superación diaria.*

*A Luciano, mi amor y mi dolor a la distancia.*

*A mis superhéroes: Tobi, Joas y Marko.*

*Y en otro tiempo y en otro espacio, a José, quien siempre admiró mi vocación de estudiante.*

# ÍNDICE

|                                                                             | página    |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b>                                                      | <b>1</b>  |
| 1.1. Hongos filamentosos y biorremediación                                  | 1         |
| 1.2. Materiales lignocelulósicos                                            | 2         |
| 1.2.1. Celulosa                                                             | 3         |
| 1.2.2. Hemicelulosa                                                         | 4         |
| 1.2.3. Sustancia pécticas                                                   | 5         |
| 1.2.3.1. Pectina                                                            | 5         |
| 1.2.3.2. Ácido péctico                                                      | 5         |
| 1.2.3.3. Protopectina                                                       | 5         |
| 1.2.4. Lignina                                                              | 6         |
| 1.3. Organismos lignocelulósicos                                            | 9         |
| 1.3.1. Características fisiológicas de los hongos de la pudrición blanca.   | 9         |
| 1.3.1.1. Mecanismos de degradación de lignina                               | 11        |
| 1.3.1.2. Enzimas extracelulares                                             | 11        |
| 1.3.1.2.1. Lignina peroxidasa (LiP)                                         | 13        |
| 1.3.1.2.2. Manganeso peroxidasa (MnP)                                       | 14        |
| 1.3.1.2.3. Lacasa                                                           | 16        |
| 1.3.1.3. OTRAS ENZIMAS: Oxidasas                                            | 17        |
| 1.4. Fermentación en Sustrato Sólido (SSF) vs. Fermentación Sumergida (SmF) | 19        |
| 1.5. Biorremediación                                                        | 21        |
| <b>2. OBJETIVOS</b>                                                         | <b>26</b> |

|                                                    |           |
|----------------------------------------------------|-----------|
| <b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>                     | <b>27</b> |
| 3.1. Organismos                                    | 27        |
| 3.2. Medios de cultivo                             | 27        |
| 3.2.1. Medio Malta (MG)                            | 27        |
| 3.2.2. Agar – Agua                                 | 28        |
| 3.2.3. Glucosa – Asparagina (GA)                   | 28        |
| 3.2.4. Medios para fermentación en sustrato sólido | 29        |
| 3.3. Condiciones de cultivo                        | 29        |
| 3.4. Inóculo                                       | 30        |
| 3.5. Procesamiento de los cultivos                 | 30        |
| 3.5.1. Cultivos en SmF                             | 30        |
| 3.5.2. Cultivos en SSF                             | 30        |
| 3.6. Inductores                                    | 31        |
| 3.6.1. Primer ensayo de inducción                  | 31        |
| 3.6.2. Segundo ensayo de inducción                 | 31        |
| 3.6.3. Tercer ensayo de inducción                  | 32        |
| 3.7. Estrés                                        | 32        |
| 3.8. Determinaciones analíticas                    | 33        |
| 3.8.1. Determinación de proteínas                  | 33        |
| 3.8.1.1. Proteínas de sobrenadantes de SmF y SSF   | 33        |
| 3.8.1.2. Proteínas totales de micelio              | 34        |
| 3.8.2. Dosaje de quitina                           | 34        |
| 3.8.3. Determinación de pH                         | 34        |
| 3.8.4. Actividades enzimáticas                     | 34        |



|                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.8.4.2. Actividad Manganese peroxidasa (MnP) (EC 1.11.1.13)                              | 35 |
| 3.8.4.3. Actividad lignin peroxidasa (LiP). (E.C. 1.11.1.14)                              | 35 |
| 3.8.4.4. Actividad Glioxal oxidasa (GLOX) (EC 1.2.3.5)                                    | 36 |
| 3.8.5. Réplicas                                                                           | 36 |
| 3.9. Caracterizaciones bioquímicas                                                        | 36 |
| 3.9.1. pH óptimo                                                                          | 36 |
| 3.9.2. Temperatura óptima                                                                 | 37 |
| 3.9.3. Estabilidad enzimática                                                             | 37 |
| 3.9.4. Réplicas                                                                           | 37 |
| 3.10. Análisis electroforético                                                            | 37 |
| 3.10.1. Determinaciones de la presencia de lacasa en los extractos crudos                 | 38 |
| 3.10.2. Determinaciones de la presencia de MnP en los extractos crudos                    | 38 |
| 3.10.3. Determinación del peso molecular de Lacasa y MnP                                  | 38 |
| 3.10.4. Actividad decolorante de la Lacasa                                                | 38 |
| 3.10.5. Actividad decolorante de la MnP                                                   | 39 |
| 3.11. Ensayos de decoloración con cultivos desarrollados en SSF                           | 39 |
| 3.11.1. Ensayos de decoloración. Escalado                                                 | 39 |
| 3.12. Detoxificación                                                                      | 40 |
| <b>4. RESULTADOS</b>                                                                      | 41 |
| 4.1. Cultivos en medio líquido                                                            | 41 |
| 4.1.1. Optimización del medio de cultivo                                                  | 41 |
| 4.1.1.1. Crecimiento de <i>Stereum hirsutum</i> con diferentes concentraciones de glucosa | 41 |

|                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.1.1.2. Influencia del pH inicial del cultivo sobre el crecimiento y la producción de ligninasas.                         | 42 |
| 4.1.2. Curva de crecimiento y producción de ligninasas de <i>S. hirsutum</i>                                               | 44 |
| 4.1.2.1. Condiciones óptimas de actividad y estabilidad de las enzimas                                                     | 44 |
| 4.1.2.1.1. pH óptimo                                                                                                       | 44 |
| 4.1.2.1.2. Temperatura óptima                                                                                              | 45 |
| 4.1.2.1.3. Estabilidad                                                                                                     | 45 |
| 4.1.2.2. Inducción de actividad enzimática                                                                                 | 45 |
| 4.1.2.3. Cobre y manganeso como inductores de actividad enzimática                                                         | 46 |
| 4.1.2.4. Inducción con Cu <sup>++</sup> y Mn <sup>++</sup> sobre cultivos de 7 días de desarrollo                          | 49 |
| 4.1.2.5. Otros inductores                                                                                                  | 53 |
| 4.1.2.6. Efecto combinado del cobre y pH inicial del medio de cultivo sobre la producción de lacasa y manganeso peroxidasa | 57 |
| 4.1.2.7. Estrés por temperatura y pH                                                                                       | 59 |
| 4.2. Cultivos en medio sólido                                                                                              | 62 |
| 4.3. Ensayos de decoloración                                                                                               | 64 |
| 4.4. Decoloración y detoxificación de VM, un fungicida                                                                     | 70 |
| 4.5. Estudios Electroforéticos                                                                                             | 72 |
| 4.5.1. Electroforesis y decoloración.                                                                                      | 73 |
| 4.5.1.1. Acción decolorante de la lacasa                                                                                   | 73 |
| 4.5.1.2. Acción decolorante de la MnP                                                                                      | 75 |
| <b>5. DISCUSIÓN</b>                                                                                                        | 77 |
| 5.1. Cultivos en medio líquido                                                                                             | 77 |
| 5.1.1. Optimización del medio de cultivo y de la producción de ligninasas                                                  | 77 |

|                                    |           |
|------------------------------------|-----------|
| 5.1.1.1. Inductores                | 79        |
| 5.1.1.1.1. Metales pesados         | 79        |
| 5.1.1.1.2. Compuestos aromáticos   | 81        |
| 5.1.1.2. Estrés                    | 82        |
| 5.1.1.3. Melanización del micelio  | 84        |
| 5.2. Cultivos en medio sólido      | 85        |
| 5.3. Degradación de colorantes     | 86        |
| 5.4. Electroforesis y decoloración | 90        |
| <b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>             | <b>92</b> |

# **1. INTRODUCCIÓN**

## **1.1. Hongos filamentosos y biorremediación**

Los hongos cumplen un papel preponderante en el ciclo de la materia orgánica por su actividad lignocelulósica, son responsables de la total mineralización de la lignina y su potencial como biorremediadores está en la mira de muchos grupos de investigación.

Se han realizado variados estudios de laboratorio sobre degradación de lignocelulosa, incluyendo madera, paja y granos de cereal. Muchos de estos trabajos involucran estudios en medios líquidos con resultados promisorios. Hoy se producen enzimas con elevado potencial económico que se explotan a nivel industrial como manufactura de papel o la formulación de detergentes.

Estos avances no han resuelto al momento la posibilidad de corregir mediante biorremediación suelos contaminados o aguas residuales de la industria sin un elevado costo. Las técnicas actuales están restringidas al uso de enzimas producidas por estos organismos y no la acción de los organismos en sí.

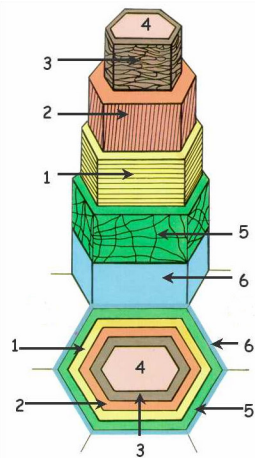
Como contrapartida, los residuos agroindustriales constituyen un gran cúmulo de materia orgánica que se genera año tras año. Tienen origen agrícola o forestal, esta materia orgánica ocupa mucho espacio, su degradación natural es lenta, casi imposible en los volúmenes que se genera y tiene la particularidad de ser un desecho con un alto contenido energético. Los ambientalistas plantean el agotamiento de los recursos naturales y la contaminación originada por el mal manejo de estos como un problema de hoy. Problema que si no resolvemos complicará nuestro mañana.

La posibilidad de establecer una relación entre residuos con alto contenido en lignocelulosa, hongos lignocelulósicos y biorremediación con bajos costos es factible.

## 1.2. Materiales lignocelulósicos

Los materiales lignocelulósicos están formados mayoritariamente por polímeros presentes en la pared de las células vegetales: celulosa, hemicelulosa, sustancias pécticas y lignina. Mientras que la celulosa y la hemicelulosa otorgan soporte a la planta (Azcón-Bieto y Talón, 2001), la lignina le confiere esencial rigidez y protección, especialmente en los árboles.

La pared celular es un producto extracitoplasmático. Todas las células de una planta están rodeadas por la pared primaria que otorga plasticidad a la célula durante la fase de expansión en su crecimiento. Algunas células, como las integrantes del parénquima medular, sólo desarrollan pared primaria. La pared primaria está constituida por fibras de celulosa, hemicelulosa y proteínas con gran cantidad de sustancias pécticas constituyendo una matriz viscosa que cementa los diversos componentes. La composición de la pared varía con el tipo celular, el tejido y en las diferentes plantas, pero aproximadamente mantienen una relación en cuanto a peso seco de 30% celulosa, 25% hemicelulosa, 35 % pectinas y 10 % proteínas (Taiz y Zeiger, 2002). En algunos tipos celulares cuando están maduras, se deposita una pared secundaria entre el plasmalema y la pared primaria (figura 1), es mucha más densa que la pared primaria y tiene



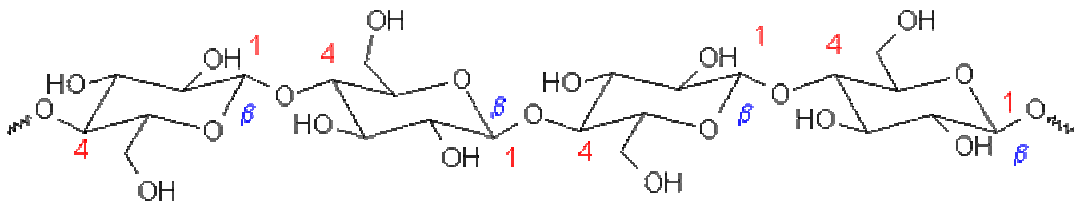
**Figura 1:** Esquema ilustrando la estructura de la pared celular de una célula con pared primaria y secundaria. La pared secundaria está constituida por las capas S1 (1), S2 (2), S3 (3) que determinan el lumen celular (4); por fuera de la pared secundaria se encuentra la pared primaria (5) y estableciendo la cementación entre células la laminilla media (6).

menos afinidad con el agua. Las células que constituyen la madera tienen a la madurez gruesas paredes secundarias con varias capas ( $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$ ). La composición en cuanto a peso seco es aproximadamente: celulosa 35%, hemicelulosa 25%, pectina en un porcentaje mucho menor que en la pared primaria y más de un 35 % de lignina dependiendo de la especie. El proceso de lignificación también alcanza la pared primaria y la laminilla media. Las proporciones indicadas presentan variaciones dependiendo de la célula, el tejido, la edad de la planta y de la especie analizada.

### 1.2.1. Celulosa

La celulosa es un homopolímero lineal constituido por unidades D-glucosa unidas por enlaces glicosídicos  $\beta$  (1-4) (figura 2) y dispuesta en paquetes de largas cadenas unidas por puentes de hidrógeno (fibrillas elementales). Las microfibrillas, constituidas por fibrillas elementales, se distribuyen con diferente orientación dentro de la pared primaria confiriendo un soporte estructural. Las microfibrillas están embebidas en una matriz compuesta por hemicelulosa, proteínas y pectinas.

Las microfibrillas de celulosa están orientadas con diferente ángulo en cada una de las tres capas, incrementando la resistencia de la pared. La lignina le da rigidez (Cowling y Kirk, 1976). La robustez es producto de la interacción entre sus componentes, pero es la celulosa, con su estructura cristalina y su particular orientación la responsable de la fortaleza de estas paredes (Preston, 1974).



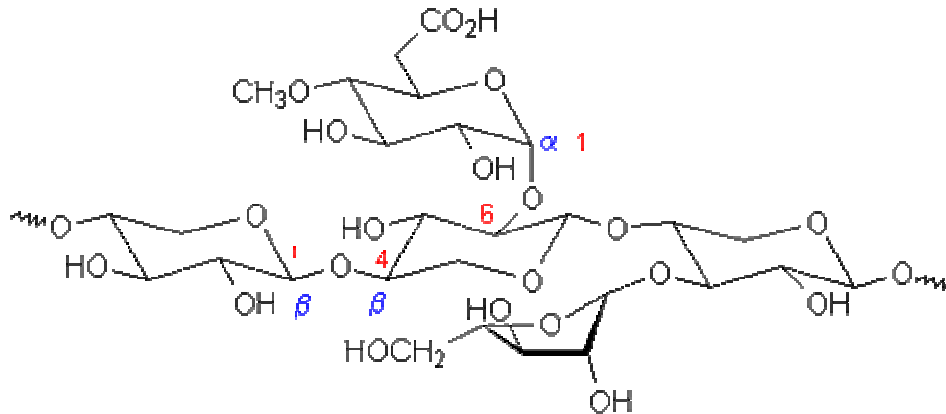
**Figura 2:** Unidades de D-glucosa unidas por enlaces glicosídicos  $\beta$  (1-4).

La estructura de la celulosa es altamente ordenada, pero a lo largo de su estructura cristalina se encuentran zonas amorfas. Estos son los puntos donde

mayormente se inicia la biodegradación de la celulosa por acción de las endoglucanasas.

### 1.2.2. Hemicelulosa

La hemicelulosa incluye la porción fácilmente hidrolizable de la pared celular en contraste con la celulosa que es más resistente. Las hemicelulosas son a menudo los primeros componentes de la pared celular que son atacados por los hongos causantes de pudrición, probablemente debido a la menor extensión de sus cadenas, solubilidad y localización expuesta alrededor de las microfibrillas de celulosa (Zabel y Morrel, 1992). Son heteropolímeros (poliosas) frecuentemente ramificados (figura 3), de menor peso molecular que la celulosa, solubles en álcalis, aparecen en las paredes celulares en forma amorfa,



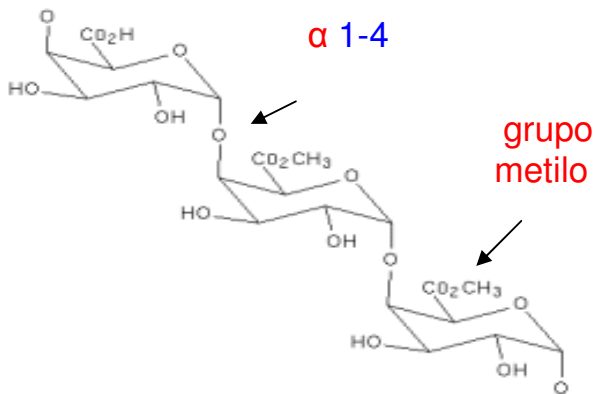
**Figura 3:** Hemicelulosa: polímero heterogéneo, ramificado, compuesto mayormente por xilanos.

asociados a los otros componentes de la pared, a las microfibrillas de celulosa por uniones hidrógeno y mediante uniones covalentes a la lignina. Están formados por unidades de D-xilosa, D-manosa, D-galactosa, D-glucosa, L-arabinosa, ácido 4-O-metil-glucurónico, ácido D-galacturónico y ácido D-glucurónico dentro de los componentes mayoritarios, Los tipos y cantidades de hemicelulosas presentes en las paredes celulares de los pastos y en las maderas de angiospermas y coníferas son diferentes. En maderas de gimnospermas la hemicelulosa es preponderante de glucomananos. En las maderas de las angiospermas los xilanos se presentan en alta proporción con cantidades variables de las otras poliosas.

### 1.2.3. Sustancias pécticas

Son polisacáridos ácidos de alto peso molecular que forman parte de las paredes celulares y laminilla media de los vegetales. Son sustancias solubles en agua, con alto poder gelificante, constituidas por:

**1.2.3.1. Pectina.** Heteropolisacárido ramificado de alto peso molecular, cuya cadena principal está formada por ácido galacturónico con uniones  $\alpha$  (1-4) (figura 4), asociada a azúcares neutros. Los grupos carboxilo de los residuos de



**Figura 4:** Cadena de ácido galacturónico con uniones  $\alpha$  (1-4) parcialmente esterificado por grupos metilo.

ácido galacturónico están parcialmente esterificados con metanol y los grupos hidroxilo pueden estar parcialmente acetilados. El grado de esterificación y de acetilación es muy variable. Las cadenas de azúcares laterales son cortas, de hasta 3 residuos de galactosa, arabinosa o ramnosa unidas en posición C2 o C3 del ácido galacturónico. Hay mayor proporción de cadenas de azúcares laterales en la pectina que constituye la pared que en la de la laminilla media; en pared sirven de unión con otros polímeros como celulosa y hemicelulosa y proteínas formando la protopectina insoluble.

**1.2.3.2. Ácido péctico.** Polímero de ácido galacturónico (sin sustituyentes).

**1.2.3.3. Protopectina.** Sustancias pécticas fijadas al tejido vegetal. Son insolubles en agua, es la sustancia madre de los otros componentes pécticos.



Se caracteriza por su muy alto peso molecular y una estructura entremezclada de sus moléculas entre sí y con otros constituyentes de la pared celular (Sakai et al., 1993)

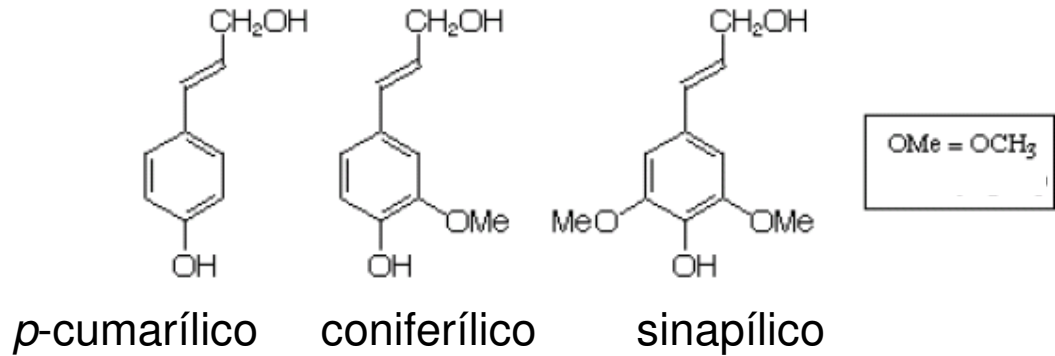
#### **1.2.4. Lignina**

La lignina es un polímero aromático tridimensional que circunda las microfibrillas con alguna unión covalente a la hemicelulosa. Protege los componentes de la pared y actúa como un noble pegamento cementando las paredes de células contiguas. Está formada por tres tipos de unidades fenilpropano, denominadas H, G y S, unidas entre sí por diferentes enlaces como aril éter (C-O-C) y C-C entre los carbonos del anillo y los de las cadenas laterales (Sarkanen y Hergert, 1971). La polimerización se produce al azar como resultado de deshidrogenaciones mediadas por peroxidación y el producto es una estructura fenilpropanoide muy heterogénea. Constituye así un compuesto amorfo e insoluble en agua, el más resistente a la degradación de los componentes de la pared de la célula vegetal.

La lignina junto con la celulosa, es uno de los polímeros más abundantes de la naturaleza. Se encuentra formando parte de los tejidos vasculares de las plantas, otorga dureza a la madera y resistencia a las fibras industriales. También encontramos lignina en el carozo de varios frutos como el endocarpio lignificado del durazno, en las cubiertas seminales (ejemplo, salvado de soja) y en el afrecho de los cereales (ejemplo salvado de trigo) por mencionar algunos.

Su presencia en los tejidos vasculares, células del xilema y fibras del floema concurrente con el hecho de que en los órganos vegetales generalmente no hay más de unas pocas células entre vena y vena, provoca que cualquier resto vegetal tenga lignina, un polímero que se encuentra en menor proporción que la celulosa en la naturaleza, pero mucho más resistente a la degradación por actividad biológica.

La lignina es una red tridimensional edificada por la polimerización deshidrogetativa de tres alcoholes (figura 5): *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico.



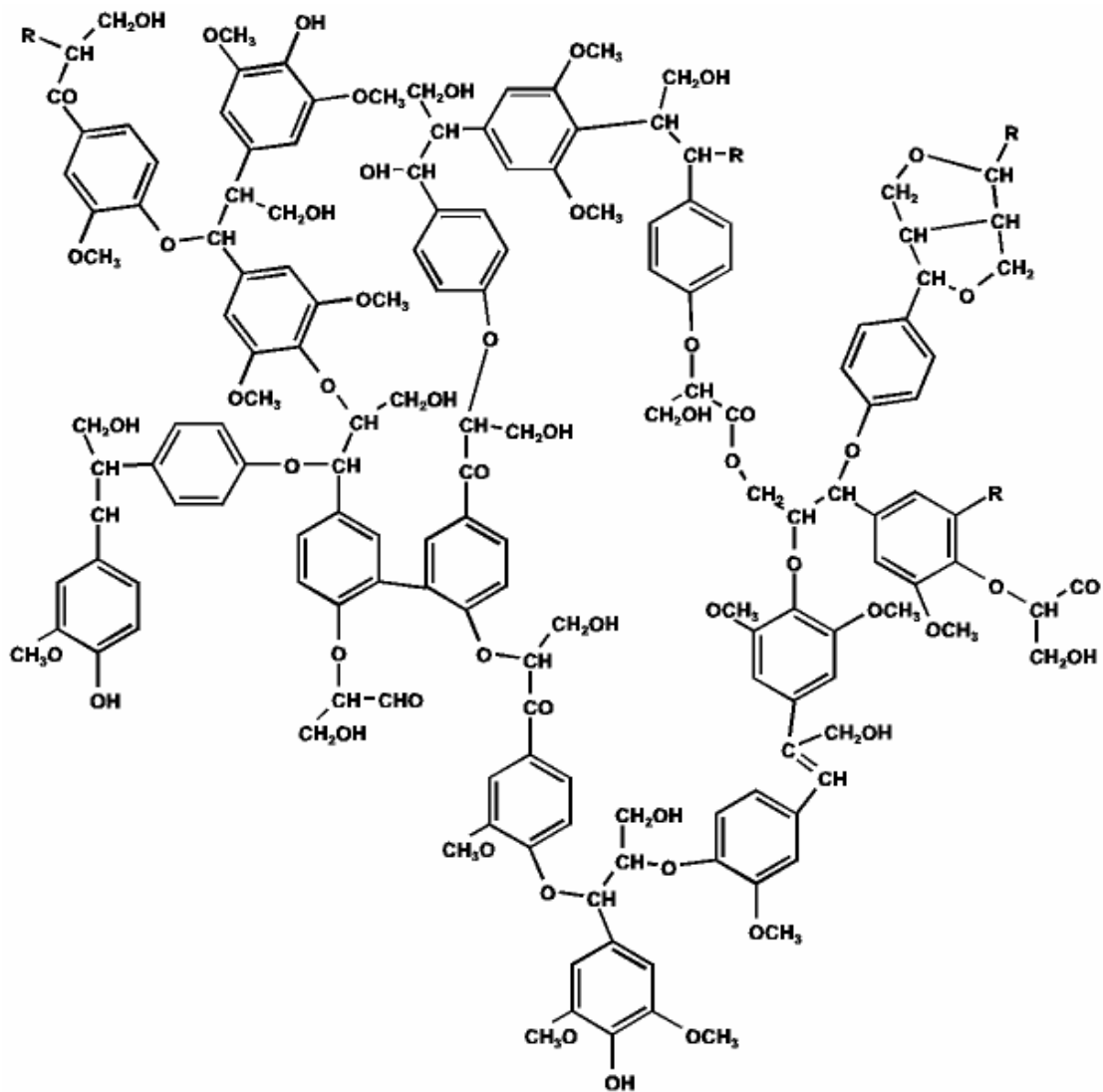
**Figura 5:** Monómeros precursores de la molécula de lignina. La acción de lacasas y peroxidasas genera radicales libres en estos monómeros los cuales así activados se van polimerizando al azar y formando los más diversos tipos de uniones.

Estos son los respectivos precursores de las unidades fenilpropanoide H, G y S. Se caracterizan por el número de grupos  $-O-CH_3$  sobre el anillo y están unidas por enlaces diversos como aril-éter, aril-aril, carbono-carbono, la más frecuente es  $\beta-O-4$  constituyendo aproximadamente el 50% de los enlaces (figura 6). La macromolécula se polimeriza “al azar” y el resultado es un compuesto amorfo (Goring, 1989).

Recientemente se han identificado unidades de lignina acetiladas en plantas herbáceas. La acetilación del *p*-coniferílico y el *p*-sinapílico se da en las formas *cis* y *trans*. Los autores sugieren que las formas acetiladas de estos alcoholes son los verdaderos precursores en la polimerización de la lignina (del Río et al., 2004).

La composición de la lignina en términos de la relación H:G:S varía en los diferentes grupos de plantas vasculares. La madera de las gimnospermas tiene principalmente unidades G en su composición. La madera de las angiospermas contiene mayor proporción de unidades G y S. La plantas herbáceas tienen las tres unidades (Betts, 1991).

Se debe considerar también que la lignina en diferentes tejidos y en diferentes capas de la pared de una planta tiene composición variada, esto demuestra que la polimerización “al azar” no es tan así y que la planta puede



**Figura 6:** Fórmula esquemática ilustrando los tipos de uniones mayoritarias ( $\beta$ -O-4; C-C) que componen la molécula de lignina. Esquema de Kirk y Cullen (1998).

controlar el proceso. Hay una mayor concentración de este polímero recalcitrante en la laminilla media con el tipo S-G predominantemente, pero también se encuentra en las distintas capas de celulosa de la pared secundaria caracterizada por el tipo S (Higuchi, 1990).

### **1.3. Organismos lignocelulósicos**

La degradación de los materiales lignocelulósicos es un paso central en el reciclado del carbono en el ecosistema terrestre. Los Basidiomycetes son los más importantes degradadores de madera y su habilidad consiste en degradar o modificar la lignina mediante un proceso enzimático originado en tiempos anteriores al Devónico, en paralelo con la evolución de las plantas vasculares.

Dentro de los hongos filamentosos se encuentran los más eficientes para la degradación o modificación de la lignina. Sobre la base del aspecto macroscópico de la madera atacada se estableció una clasificación de los diferentes patrones de pudrición. En la tabla 1 se resumen los distintos tipos de ataques a la madera y los hongos involucrados (Martínez et al., 2005)

Los Ascomycetes y los hongos mitospóricos, normalmente clasificados como hongos de la pudrición blanda (soft-rot fungi) pueden degradar lignina y polisacáridos pero a una muy baja velocidad (Eriksson et al., 1990)

Dentro de los Basidiomycetes encontramos: a) los hongos de la degradación castaña (brown-rot fungi) que degradan la celulosa y la hemicelulosa alterando parcialmente la estructura de la lignina sin su degradación definitiva quedando la madera de color marrón y b) los hongos de la pudrición blanca (white-rot fungi) que degradan la lignina, la celulosa y la hemicelulosa. Estos hongos degradan los tres componentes a la misma velocidad (ataque simultáneo) o hacen una degradación selectiva de la lignina y la hemicelulosa, en este caso la madera adquiere un color blanquecino (Jennings, 1995)

#### **1.3.1. Características fisiológicas de los hongos de la pudrición blanca.**

Los hongos son absorbotrofos, absorben los nutrientes necesarios para su crecimiento desde un sustrato disponible. Los componentes absorbidos están presentes en la solución que rodea a la célula. El sustrato disponible para el hongo debe ser reducido a sustancias solubles de bajo peso molecular que atraviesen la pared celular y el plasmalema para ser metabolizado en el interior de la célula

**Tabla 1:** Características de diferentes formas de pudrición de la madera

a- Degradación simultánea.

b- Degradación selectiva.

|                                                    | Hongos de la pudrición blanca.                                                                                                                                                                                     | Hongos de la pudrición marrón.                                                        | Hongos de la pudrición blanda.                                                                      |
|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Aspecto y consistencia de la madera atacada</i> | Apariencia blanquecina, de color más claro que la madera sana.                                                                                                                                                     | Color marrón, seca, quebradiza, se rompe en pequeños cubos.                           | Blanda en ambientes húmedos. Marrón y desmenuzable en ambientes secos.                              |
| <i>Tipo de madera atacada</i>                      | a) Maderas de Angiospermas, raro de Gimnospermas.<br>b) Maderas de Angiospermas y Gimnospermas.                                                                                                                    | Maderas de Gimnospermas, raro de Angiospermas.                                        | Maderas de Angiospermas.                                                                            |
| <i>Degradación de los componentes de la pared</i>  | a) Celulosa, lignina y hemicelulosa simultáneamente<br>b) Ataque selectivo inicial a la lignina y a la hemicelulosa, finalmente a la celulosa.                                                                     | Celulosa y hemicelulosa. La lignina es levemente modificada.                          | Celulosa y hemicelulosa. La lignina es levemente alterada.                                          |
| <i>Características anatómicas</i>                  | a) La pared celular es atacada progresivamente desde el interior del lumen. Contacto entre la hifa y la degradación<br>b) Lignina en laminilla media y pared secundaria por difusión. No hay contacto con la hifa. | Degradación a gran distancia de la hifa (mecanismo de difusión). La pared se degrada. | Se degrada la pared celular cercana a la hifa y comienza por el lumen celular.                      |
| <i>Agente causante</i>                             | a) Basidiomycetes y algunos Ascomycetes.<br>b) Basidiomycetes.                                                                                                                                                     | Basidiomycetes.                                                                       | Ascomycetes, Deuteromycetes y Basidiomycetes que realizan la pudrición blanda en forma facultativa. |

Los hongos son un eslabón importante en la degradación de la materia orgánica, pueden degradar polímeros de elevada complejidad a sustancias simples que luego son absorbidas por las hifas. Para poder convertir los abundantes polímeros que se encuentran en la naturaleza, principalmente

residuos de origen vegetal, en moléculas de bajo peso molecular, el primer paso es la secreción de enzimas extracelulares.

#### **1.3.1.1. Mecanismos de degradación de lignina**

La degradación de la lignina en la naturaleza es realizada mayoritariamente por un conjunto de enzimas que producen los basidiomicetes responsables de la pudrición de la madera. Hay varios organismos que degradan la lignina (Hatakka, 2001), pero los hongos de la pudrición blanca son, lejos, los más eficientes. El modelo de hongo para la degradación de la lignina es *Phanerochaete chrysosporium* (Kirk y Farrell, 1987). Se han reportado muchos otros hongos que degradan la lignina con mayor o menor eficiencia (Higuchi, 2004) La base de la mayoría de los trabajos sobre degradación de lignocelulósicos por acción de los hongos es más económica que ecológica, por este motivo se dirigen los estudios preponderantemente a la descomposición de la lignina incluyendo biodegradación, biorremediación y bioconversión.

#### **1.3.1.2. Enzimas extracelulares**

El sistema de secreción enzimática en los hongos filamentosos presenta modificaciones con respecto al sistema estudiado en células eucarióticas dado que existe una direccionalidad en el crecimiento y en el transporte de nutrientes hacia el ápice de la hifa. No se descarta que exista una cierta actividad secretora a lo largo de todo el micelio para atender la actividad metabólica pero es el ápice de la hifa el área de activa secreción enzimática.

Las principales enzimas que degradan la lignina son la lignina peroxidasa (Lip), la manganeso peroxidasa (MnP) y la lacasa (Reid, 1995). No todas las especies presentan todas las enzimas lignolíticas y se encuentran diferentes combinaciones de ellas (Hatakka, 1994). La LiP fue la primera enzima lignolítica descrita en el modelo *P. chrysosporium* (Glenn et al., 1983, Tien y Kirk, 1983). Se han encontrado otras enzimas involucradas en la degradación de la lignina a las cuales los autores se refieren como versátiles o híbridos de peroxidasa que son modificaciones de la MnP o de la LiP (Mester y Field, 1998, Ruiz-Dueñas et al., 2001)

La LiP y la MnP requieren  $H_2O_2$  para activarse, por este hecho, junto con la batería de enzimas lignolíticas se secretan enzimas generadoras de peróxido de hidrógeno. Algunos ejemplos son la glioxal oxidasa (GLOX) y la aril alcohol oxidasa (AAO). También hay enzimas generadoras de peróxido de hidrógeno intracelulares como la glucosa-oxidasa.

La degradación total de la lignina incluye una hemoflavina, celobiosa-quinona-oxidoreductasa. Esta enzima oxida la celobiosa a celobiolactona y reduce quinonas u otros radicales libres generados por las enzimas lignolíticas. Este proceso disminuye la reactividad de los productos oxidados dificultando su repolimerización (Ander, 1994). La Tabla 2 resume las enzimas involucradas en la degradación de la lignina.

**Tabla 2:** Enzimas involucradas en la degradación de la lignina, cofactores, sustratos, mediadores y efecto principal.

| Enzima                                   | Cofactor | Sustrato, mediador                                                       | Efecto principal o reacción                                                             |
|------------------------------------------|----------|--------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| Lignina peroxidasa, LiP                  | $H_2O_2$ | Alcohol veratrílico                                                      | Oxida el anillo aromático a radical catiónico.                                          |
| Manganeso peroxidasa. MnP                | $H_2O_2$ | $Mn^{2+}$ , ácidos orgánicos como quelantes, tioles, lípidos insaturados | Oxida $Mn^{2+}$ a $Mn^{3+}$ , luego oxida compuestos fenólicos a radicales fenoxilicos. |
| Peroxidasas versátiles                   | $H_2O_2$ | Compuestos similares a los requeridos por la LiP o MnP                   | El mismo efecto sobre los compuestos aromáticos y fenólicos como la LiP y la MnP        |
| Lacasa, Lac                              | $O_2$    | Hidroxi-benzotriazole, ABTS, como mediador                               | Oxida los fenoles a radicales fenoxilicos.                                              |
| Glioxal oxidasa, GLOX                    |          | Glioxal, metil glioxal                                                   | Oxida el glioxal a ácido glioxílico produciendo $H_2O_2$ .                              |
| Aril alcohol oxidasa, AAO                |          | Alcoholes aromáticos                                                     | Reduce el $O_2$ a $H_2O_2$ .                                                            |
| Glucosa 1-oxidasa (GOD)                  |          | Específicamente glucosa (intracelular)                                   | Reduce el $O_2$ a $H_2O_2$ .                                                            |
| glucosa 2-oxidasa                        |          | Actúa sobre diferentes azúcares (intracelular)                           | Reduce el $O_2$ a $H_2O_2$ .                                                            |
| Celobiosa: quinona 1-oxidoreductasa, CBQ |          | Celobiosa, quininas                                                      | Reduce <i>o</i> - y <i>p</i> - quinonas                                                 |

Las enzimas del complejo lignolítico, al igual que las celulolíticas, existen en formas múltiples. La producción de isoenzimas puede deberse a la expresión de genes diferentes o a modificaciones postraduccionales.

Los estudios realizados con medio de cultivos sintéticos muestran que con pequeñas variaciones en los medios (variaciones de fuentes de carbono, nitrógeno, macro y micronutrientes, pH etc.) los hongos producen diferentes formas de una misma enzima. Estas poseen similar capacidad catalítica pero presentan diferentes características físico-químicas.

En la naturaleza los hongos se encuentran con una amplia gama de sustratos lignocelulósicos y serían estos los disparadores de la producción de una u otra isoenzima.

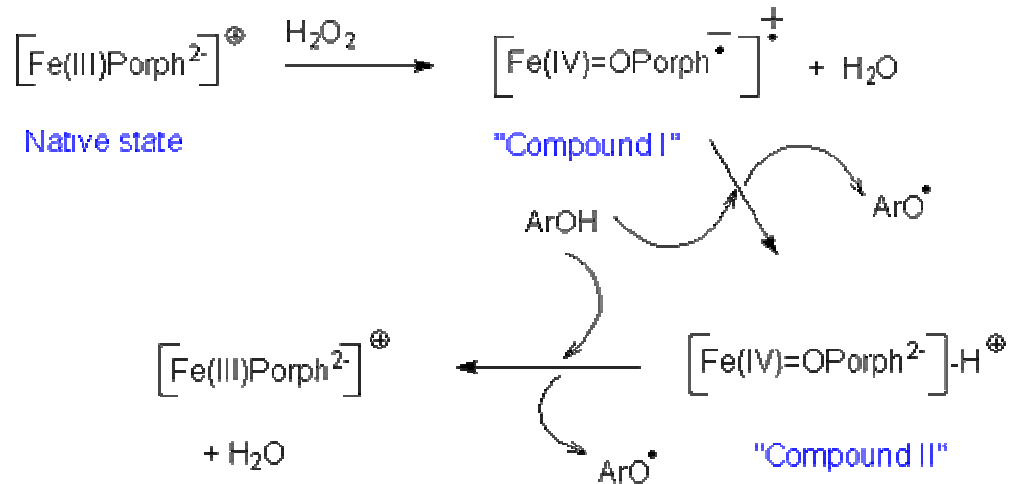
El conjunto de sucesos que conlleva a la degradación de la lignina requiere co-metabolitos que se originan en procesos metabólicos de otras fuentes de carbono que no son la lignina, por ejemplo celulosa o hemicelulosa. Para completar este panorama complejo sobre la degradación de la lignina se debe tener en cuenta que al presente que no se ha encontrado ningún organismo que utilice esta macromolécula como fuente de carbono (Kirk y Farrell, 1987, Hatakka, 2001).

#### **1.3.1.2.1. Lignina peroxidasa (LiP)**

La lignina peroxidasa (LiP) cataliza la oxidación de unidades fenólicas y no fenólicas de la lignina y compuestos similares. Esta enzima es bien conocida como parte del sistema lignolítico tanto en hongos afiloforales como agaricales (Glenn et al., 1983). Es una enzima extracelular monomérica, N-glicosilada, con una masa molecular entre 38 y 47 kDa, contiene un grupo hemo en su sitio activo y actúa con el mecanismo típico de las peroxidases (Tien et al., 1986).

La LiP cataliza la oxidación de varias cadenas laterales de la lignina y compuestos relacionados (Tien y Kirk, 1983) por la sustracción de un electrón a la vez de los radicales reactivos. La enzima es oxidada (figura 7) por acción del peróxido de hidrógeno y queda deficiente en 2 electrones (Compuesto I), luego de la primera sustracción de un electrón (Compuesto II) debe reestablecer su estado nativo con el grupo prostético como  $Fe^{3+}$ .





**Figura 7:** Cadena de reacciones de la LiP ilustrando estados de reducción del grupo hemo. La enzima nativa reacciona con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para producir un intermediario oxidado de dos electrones, compuesto I, el cual luego oxida al sustrato lignina ArOH para dar un intermediario oxidado de un electrón, el compuesto II, y un radical del sustrato. El compuesto II retorna a su estado nativo mediante una oxidación de una segunda molécula de sustrato.

La principal diferencia de la LiP con las otras peroxidasa es que tiene un potencial de oxidoreducción mayor que le permite oxidar fácilmente las unidades no fenólicas de la lignina (Tien, 1987).

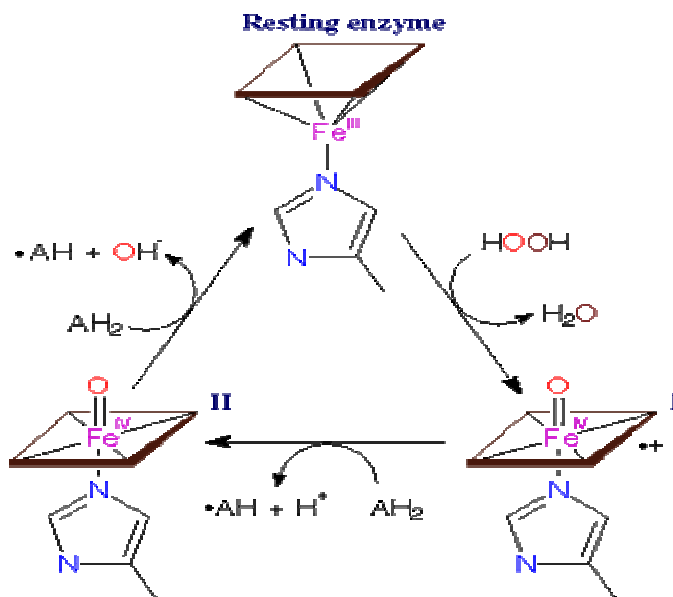
### 1.3.1.2.2. Manganeso peroxidasa (MnP)

La Manganeso peroxidasa (MnP), es exclusivamente producida por algunos basidiomicetes (aproximadamente 60 especies), fue descubierta poco después que la LiP en *P. chrysosporium* por Kuwahara et al., (1984) y descrita por Glenn y Gold (1985).

Por su incapacidad de degradar dímeros no fenólicos se consideró que jugaba un papel secundario en la degradación de la lignina. Sin embargo, en los últimos años y dado que no todos los hongos que degradan lignina producen LiP y que al igual que la lacasa es una enzima presente en la mayoría de los hongos de la pudrición blanca, su estudio ha despertado mayor interés (Hatakka, 1994).

Al igual que la LiP, la MnP es una glicoproteína extracelular que contiene un grupo hemo como grupo prostético. Tiene un peso molecular entre 40 y 50 kDa (max. 38-62 kDa) con un punto isoeléctrico que varía entre 3 y 7 con una media alrededor de 3-4 (Hofrichter, 2002).

La MnP requiere  $Mn^{2+}$  como sustrato reductor, en reacciones que tienen como sustrato compuestos como el dimetoxifenol la actividad de la MnP es independiente del manganeso (Archibald, 1992). El manganeso también puede actuar regulando la producción de MnP como en *Phlebia radiata* (Moilanen et al., 1996). La MnP oxida (figura 8) el  $Mn^{2+}$  a  $Mn^{3+}$  (Gold et al., 1989), éste es altamente reactivo y se acompleja con compuestos quelantes como el oxalacetato o el malato. (Cui y Dolphin, 1990, Kishi et al., 1994) los cuales son producidos por los mismos hongos (Hofrichter et al., 1999, Mäkelä et al. 2002) como resultado se forman pequeñas moléculas capaces de difundir por los poros de la pared de la célula vegetal a sitios inaccesibles para la enzima.



**Figura 8:** Cadena de reacciones de la MnP. El ciclo es similar al de la LiP sólo que depende de  $Mn^{+2}$  para completarlo. El compuesto I puede oxidar  $Mn^{+2}$  o sustratos, en la mayoría de los casos, fenólicos; el compuesto II solamente puede oxidar  $Mn^{+2}$  para completar su ciclo.

El potencial redox del sistema MnP-Mn es menor que el de la LiP y en forma preferencial oxida sustratos fenólicos. La velocidad de degradación de la lignina “in vivo” es controlada por los pasos más lentos de reacción, para el caso de la MnP la disponibilidad de  $H_2O_2$  o de  $Mn^{2+}$  es más importante que la capacidad catalítica de la enzima. Un exceso en la generación de  $H_2O_2$  puede generar la destrucción del sitio activo de la enzima, la velocidad de producción

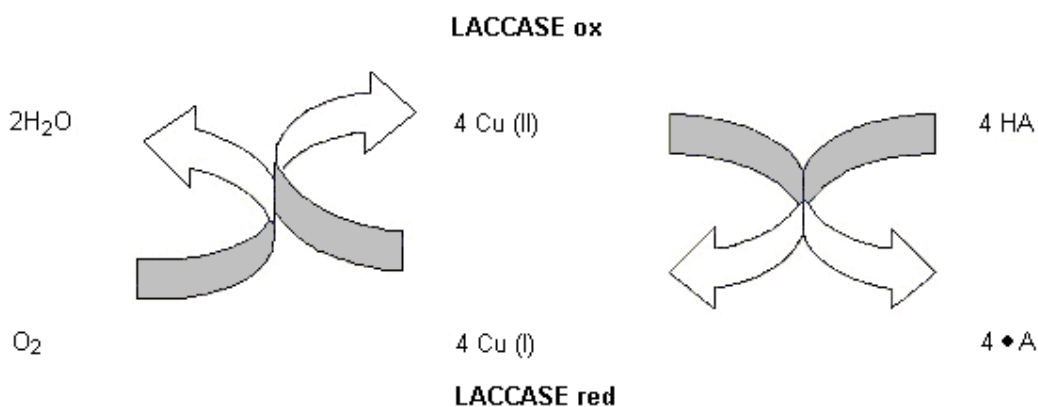
de  $H_2O_2$  puede tener importantes efectos sobre la degradación de la lignina (Palma et al., 1997).

### 1.3.1.2.3. Lacasa

Esta enzima está presente en la mayoría de los hongos de la pudrición blanca y no se detecta en los hongos de la pudrición castaña. Este hecho condujo a relacionarla con la degradación de la lignina.

La lacasa es una fenoloxidasa que contiene cobre y no requiere  $H_2O_2$  pero si usa oxígeno molecular (Thurston, 1994). La enzima es producida por plantas superiores, hongos y algunas bacterias (Bollag y Leonowicz, 1984, Thurston 1994, Yaropolov et al., 1994, Mayer y Staples, 2002, Claus, 2003). Al igual que la MnP, la lacasa prefiere grupos fenólicos libres y también forma radicales fenoxílicos como producto.

La lacasa reduce el  $O_2$  a  $H_2O$  y oxida sustratos fenólicos creando radicales libres (figura 9). Sin embargo, requiere la presencia de mediadores como ABTS o HBT para hacer viable la oxidación de ciertos compuestos no fenólicos y del veratril alcohol (Bourbonnais y Paice, 1990, Eggert et al., 1996, Call y Mücke, 1997, Collins y Dobson, 1997).



**Figura 9:** Mecanismo de oxidación catalizado por las lacasas. Este grupo de proteínas multicobre de baja especificidad cataliza la oxidación de un amplio rango de compuestos como *o*- y *p*-quinols y aminofenoles entre otros en concomitancia con la reducción de  $O_2$  a  $H_2O$ . No se produce  $H_2O_2$  en esta reacción.

La lacasa es producida por muchos hongos de la pudrición blanca (Hatakka, 1994). Esta enzima no había sido detectada en *P. chrysosporium* (Kirk y Farrell, 1987), en estudios recientes se ha determinado que esta especie tiene la capacidad de sintetizar lacasa variando las condiciones de cultivo (Gnanamani et al., 2006).

La masa molecular de la lacasa de los basidiomycetes varía entre 50 y 70 kDa, y es ligeramente más pequeña que la lacasa de las plantas (Thurston, 1994, Yaropolov et al., 1994) y su punto isoeléctrico varía entre 3 y 4 (Hatakka, 1994)

### **1.3.1.3. OTRAS ENZIMAS: Oxidasas**

Antes de saber que los hongos degradadores de lignina poseían peroxidasas, ya se conocía que producían  $H_2O_2$  (Koenigs, 1974). Cuando se descubrieron la peroxidasas lignolíticas (LiP y MnP) se asoció la producción del  $H_2O_2$  con estas enzimas. Hay oxidasas intracelulares y oxidasas extracelulares, siendo estas las más relevantes dado que generan el peróxido en el exterior de las hifas donde se produce la degradación de la lignina. Son las más importantes:

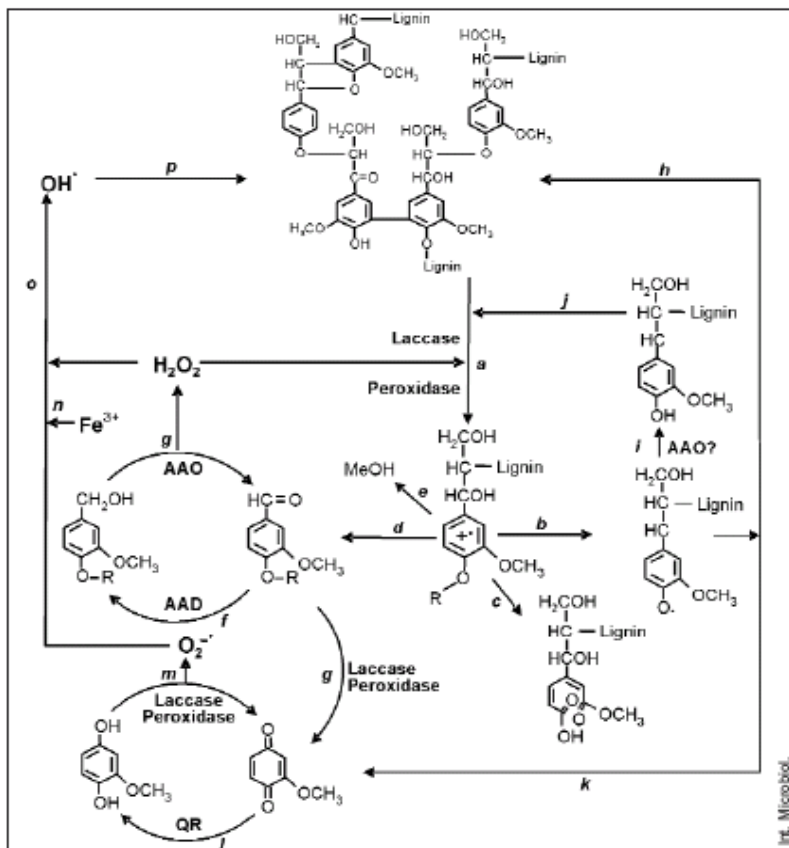
La glioxial oxidasa (GLOX) es una oxidasa extracelular capaz de oxidar metabolitos del hongo (glioxal y metilglioxal) y productos de degradación de lignina (formaldehído y glicolaldehído). Esta enzima es activada por la LiP en presencia de alcohol veratrílico, lo que sugiere un sinergismo de ambas enzimas (Kersten, 1990).

La aril-alcohol oxidasa (AAO), también extracelular, tiene una amplia especificidad de sustrato catalizando la oxidación de alcoholes primarios  $\alpha$ -insaturados y alcoholes alifáticos insaturados. Esta enzima también oxida aldehidos aromáticos. Se ha descrito que la AAO participa en un ciclo de producción controlada de  $H_2O_2$  a partir de metabolitos del hongo y de productos de la degradación de la lignina (Guillén et al., 1994).

La glucosa-oxidasa (GOD: glucosa 1-oxidasa) actúa específicamente sobre la glucosa y mediante la incorporación de  $O_2$  da gluconolactona con producción de  $H_2O_2$  y la glucosa 2-oxidasa puede actuar sobre diversos

azúcares pero con preferencia por glucosa. Ambas predominantemente intracelulares y se encuentran en peroxisomas próximos a la membrana plasmática.

La figura 10 (Martínez et al., 2005) muestra un esquema de integración de la actividad de las enzimas involucradas en la degradación de la lignina.



**Figura 10:** Esquema de biodegradación de la lignina (explicación en el texto)

Las lacasas y peroxidasas producidas por los hongos de la pudrición blanca de la madera oxidan el polímero lignina generando radicales aromáticos (a). Estos desarrollan diferentes reacciones no-enzimáticas, incluyendo la separación del grupo éter en el C4 (b), la ruptura del anillo aromático (c), separación de uniones Cα-Cβ (d) y demetoxilaciones (e). Los aldehídos aromáticos productos de las rupturas del polímero lignina en las uniones Cα-Cβ (f y g) son los sustratos para la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por la AAO en un ciclo de reacciones que involucra a las aril alcohol deshidrogenasas. Los radicales fenoxi generados por la remoción del grupo éter en el C4 (b) pueden ser

repolimerizados a lignina (**h**) si no son reducidos a compuestos fenólicos (**i**) por oxidasas como AAO. Los compuestos fenólicos formados pueden ser reoxidados por lacasas y MnP (**j**). Los radicales fenoxi pueden ser sometidos a clivajes de las uniones C $\alpha$ -C $\beta$  (**k**) originando *p*-quinonas. Las quinonas originadas en **g** y/o **k** contribuyen la activación por oxígeno en las reacciones cíclicas que involucra a quinona reductasa, lacasa y peroxidasas (**l**, **m**). Se produce la reducción del Fe<sup>+3</sup> presente en la madera (**n**) su reoxidación junto con la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a partir de un radical libre (OH<sup>-</sup>) (**o**). Esta última es la más fuerte oxidación en la degradación de la lignina (**p**) y es el estado inicial de decaimiento de la madera.

#### **1.4. Fermentación en Sustrato Sólido (SSF) vs. Fermentación Sumergida (SmF)**

La SmF se basa en el desarrollo de microorganismo donde los nutrientes son provistos en un medio líquido. La SSF es un sistema de cultivar estos mismos microorganismos en ausencia de agua libre.

Las SSF son conocida desde hace miles de años, el pueblo egipcio fabricaba su pan con levaduras y numerosos alimentos. Esta técnica reproduce las condiciones naturales a las cuales muchos microorganismos están adaptados. Los hongos superiores, Ascomycetes y Basidiomycetes han evolucionado como organismos terrestres y su crecimiento se da normalmente sobre sustratos sólidos.

Los hongos pueden ser cultivados en ambos sistemas con fines biotecnológicos, pero el cultivo de microorganismos en suspensión acuosa puede disminuir su eficiencia metabólica. Podemos considerar que la tecnología del SmF es una violación al hábitat natural de los organismos. Sin embargo los sistemas SSF se utilizan solamente para una pequeña proporción de enzimas y metabolitos secundarios dado los problemas de ingeniería que estos procesos presentan. Otra alternativa es utilizar organismos adaptados por ingeniería genética a la SmF para la producción de enzimas a escala industrial.

La SSF es definida como un sistema de cultivo de microorganismos sobre un soporte sólido húmedo. Pueden usarse soportes inertes con el agregado de medios de cultivo o sustratos orgánicos insolubles que son usados como fuente

de carbono y energía. La fermentación se lleva a cabo en ausencia de agua libre que es el medio natural al que estos microorganismos están adaptados.

En la tabla 3 se establecen las ventajas y problemáticas de la SSF respecto a la SmF.

**Tabla 3:** Ventajas biotecnológicas de la SSF sobre la tecnología de la SmF

| <i>Beneficios</i>                                                | <i>Consecuencias</i>                                                   | <i>Problemas a resolver</i>                                          |
|------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| <b>Beneficios biológicos</b>                                     |                                                                        |                                                                      |
| *Baja demanda de agua.                                           | Menor desperdicio de agua.                                             | Se establecen gradientes de humedad.                                 |
| *Alta concentración de producto final.                           | Importante reducción de costos.                                        |                                                                      |
| *La represión catabólica es mínima o ausente.                    | Fermentación en presencia de glucosa                                   |                                                                      |
| *Utilización de sustratos sólidos.                               | Alta concentración de sustratos.                                       | Se construyen gradientes de sustratos.                               |
|                                                                  |                                                                        | Se establecen gradientes de pH                                       |
| *Demanda reducida de condiciones de esterilidad.                 | Posibilidad de realizar fermentaciones con mezclas de microorganismos. |                                                                      |
| *Simulación de condiciones naturales.                            | Mejores condiciones para el cultivo de los microorganismos.            |                                                                      |
| *Cultivos de mezclas de microorganismos.                         | Producción de metabolitos en forma sinérgica.                          |                                                                      |
| <b>Beneficios de procedimiento</b>                               |                                                                        |                                                                      |
| *Alta productividad.                                             | Fermentadores de menor volumen.                                        |                                                                      |
| *Requiere poca cantidad de energía para mantener la temperatura. |                                                                        | Se producen gradientes de temperatura.                               |
| *Se facilita la aireación.                                       |                                                                        | Se crea un gradiente de oxígeno cuando se trabaja a grandes escalas. |
| *Utilización de fuentes de carbono no convencionales.            | Fuentes de carbono abundantes y de bajo costo.                         |                                                                      |
| *No se requieren compuestos anti-espuma.                         | Se reduce la pérdida de microorganismos durante la fermentación.       |                                                                      |

## 1.5. Biorremediación

Cuando la velocidad de incorporación de contaminantes supera la velocidad natural de degradación es necesaria la intervención humana. El uso de procesos de remediación incrementa o acelera la degradación de los contaminantes.

Se pueden usar varias estrategias para restaurar o remediar un ambiente contaminado: métodos físicos y/o químicos y la biorremediación que involucra la utilización de agentes biológicos. Estas técnicas pueden ser utilizadas en el mismo lugar donde ocurre la contaminación y ofrecen numerosas ventajas sobre las tecnologías “ex situ”.

Los tratamientos “in situ” tienen varias ventajas: elimina o reduce los costos de transporte, pueden ser aplicados a contaminantes diluidos y ampliamente difusos, minimiza los riesgos de manipulación con el transporte.

Biorremediación es la aplicación de un proceso biológico para eliminar la presencia de un compuesto químico peligroso en el medio ambiente.

Los principales agentes de biorremediación son plantas, microorganismos y asociaciones de plantas con microorganismos. Todos son agentes efectivos en la transformación de contaminantes orgánicos porque sus componentes enzimáticos son fuertemente catalíticos, esto hace que se produzca una extensiva modificación de la estructura química y de las propiedades contaminantes, en algunos casos se alcanza la total mineralización.

Sin embargo la eficiencia de los procesos biológicos depende de la biodegradabilidad de los contaminantes. La susceptibilidad de un contaminante a ser degradado a un producto menos tóxico está fuertemente influenciada por su estructura química, concentración y propiedades del contaminante, y por las condiciones del medio ambiente. Para que un contaminante sea biodegradado se requiere la interacción con los sistemas enzimáticos de los organismos degradadores. Si es soluble, puede ingresar fácilmente a las células, pero si es insoluble debe ser transformado en soluble. El primer paso de este proceso es la reacción catalítica de enzimas extracelulares liberadas al medio por las células del agente biológico. De esta forma se puede degradar desde compuestos naturales hasta compuestos xenobióticos (Coulibaly et al., 2003, D'Annibale et al., 2005).



Las enzimas extracelulares incluyen un importante rango de oxidoreductasas e hidrolasas. Ambos tipos de enzimas intervienen en la degradación y transformación de sustancias poliméricas a compuestos parcialmente degradados o productos oxidados que son fácilmente tomados por las células. Los compuestos ingresados a la célula pueden llegar a ser completamente mineralizados. Otra posibilidad es que compuestos recalcitrantes como los PAHs sean parcialmente oxidados por las enzimas extracelulares incrementando su polaridad y solubilidad en agua, de esta forma estos compuestos pueden ser biodegradados con mayor facilidad. (Meulenberg et al., 1997)

Las oxidoreductasas e hidrolasas de origen fúngico son un grupo de enzimas que cumplen un importante papel en el ciclo de la materia orgánica y una potencial herramienta en procesos de biodegradación.

La principal fuente para obtener estas enzimas son los basidiomycetes de la pudrición de la madera, los basidiomycetes terrícolas, hongos ectomicorrizicos, los microhongos del suelo y los actinomicetes.

Hay un interés creciente por los hongos como agentes biorremediadores (Pointing, 2001). Muchos hongos son organismos fuertes que toleran altas concentraciones de contaminantes, son más resistentes que las bacterias. En particular, los hongos de la pudrición blanca de la madera aparecen como organismos interesantes y especiales para la biorremediación por varias razones:

- A- Los hongos de la pudrición blanca están presentes en los ambientes naturales.
- B- Los hongos de la pudrición blanca son organismos especiales porque poseen un muy poderoso sistema de enzimas oxidoreductasas extracelulares: el sistema de enzimas degradadoras de lignina las cuales actúan sobre su sustrato natural, un heteropolímero amorfo y complejo, atacando diversos tipos de enlaces, esta baja especificidad les confiere la capacidad de oxidar otros compuestos como varios de los contaminantes ambientales. Otras enzimas no degradadoras de lignina como la celobiosa deshidrogenasa que es secretada cuando la celulosa es la fuente de carbono, puede directa o indirectamente oxidar varios

contaminantes. Como consecuencia del accionar de estas enzimas un vasto rango de sustancias tóxicas que contaminan el ambiente, incluyendo los de bajo peso molecular pueden ser degradadas o mineralizadas por los hongos de pudrición blanca.

- C- Los hongos de la pudrición blanca pueden crecer en sustratos sin costo o de muy bajo costo como residuos de las cosechas de cereales que pueden ser agregados como fuentes de nutrientes en la zona contaminada.
- D- Los hongos de la pudrición blanca son filamentosos, pueden extenderse sobre los suelos contaminados y penetrar en los sustratos, mientras que las bacterias no pueden hacerlo.
- E- Las enzimas degradadoras de lignina son en su mayoría constitutivas en la naturaleza. Esto evita que el organismo utilizado para la biorremediación tenga que adaptarse a la degradación del químico contaminante. Esta expresión constitutiva puede incrementarse con las condiciones del cultivo (Ikehata et al., 2004)

La transformación de varios compuestos recalcitrantes requiere la acción de las enzimas extracelulares en presencia de las células que le dieron origen. En otras palabras, la biodegradación de contaminantes comienza con las enzimas extracelulares pero es mucho más eficiente en presencia de la célula entera y sus vías metabólicas completas.

**Tabla: 4** Ejemplos de biodegradación de compuestos tóxicos por hongos de la pudrición blanca y la acción de sus oxidasas y peroxidasas extracelulares.

| Contaminante                         | Enzima        | Fuente                                                                        | Actividad                      |
|--------------------------------------|---------------|-------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| Colorantes Azo                       | Lacasa        | <i>Pycnoporus sanguineus</i>                                                  | Reduce más de 60%              |
| CCl <sub>4</sub> , CHCl <sub>3</sub> | LiP, MnP, CDH | <i>Phanerochaete chrysosporium</i>                                            | Degrada más de 50%             |
| PAHs                                 | LiP, Lacasa   | <i>P. chrysosporium</i> ,<br><i>Trametes versicolor</i>                       | Degrada 70 al 100%             |
| PCBs (1-6Cl sustitución)             | Lip, MnP      | <i>Coriolopsis polyzona</i> <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>T. versicolor</i> | Muy significativo              |
| TNT, RDX                             | LIP, MnP, CDH | Varios hongos de la pudrición blanca                                          | Degradación superior al 30-50% |

Otra alternativa aplicable a sitios contaminados es utilizar enzimas libres de células, aisladas de sus organismos originales. Las restricciones, potencialidad y propiedades de la detoxificación de contaminantes orgánicos por la acción de enzimas aisladas ha sido revisada por Gianfreda y Bollag (2002).

Como muestra la tabla 4 una de las fuentes de contaminación son los colorantes. La industria textil es gran productora de estos contaminantes. Desde mediados del siglo 17 se utilizan colorantes sintéticos, actualmente la producción anual es de 600 mil toneladas (600 kt). La industria textil desarrolla colorantes que sean resistentes a la transpiración, la luz, el agua, a muchos químicos incluyendo los agentes oxidantes y también resistentes al ataque microbiano. El 15 % del colorante usado se pierde en los procesos de tinción. Los efluentes conteniendo colorantes son pobremente mejorados con los tratamientos biológicos convencionales y los tratamiento abióticos son muy costosos (Robinson et al., 2001).

Para la recuperación de estos efluentes los hongos de la pudrición blanca son, lejos, los más eficientes por su capacidad de producir una o más enzimas degradadoras de lignina que degradan un importante rango de xenobióticos, entre ellos los colorantes.

Wesenberg et al., (2003) hicieron una importante revisión sobre el uso de los hongos de la pudrición blanca y sus enzimas en el tratamiento de efluentes de la industria textil. Quedan temas por resolver:

- a) No se tienen conocimientos sobre cuanto de los residuos decolorados son mineralizados.
- b) No hay una evaluación sobre la posible toxicidad de los intermediarios en la decoloración.
- c) También tenemos que considerar que los efluentes de la industria textil contienen en general más de un colorante, también contienen sales, alta conductividad, valores de pH extremos, agentes quelantes, detergentes, etc.
- d) Es posible que una cepa de hongo puede degradar un colorante y no otro. Otros hongos presentan un rango más amplio de actividad. También dependiendo de la cepa varían las enzimas

que se detectan en los sobrenadantes; Lac, MnP y LiP. Pero también se tienen reportes de procesos de decoloración mediados por los hongos de la pudrición blanca que no presentan niveles de estas enzimas detectables.

- e) ¿Cuál es la acción inicial de las enzimas de estos Basidiomycetes sobre los colorantes que permite su decoloración y mineralización? Faltan evidencias experimentales sobre acumulación de intermediarios tóxicos, hay una gran variabilidad en los resultados de los laboratorios y pocos estudios estiman la toxicidad de los productos residuales de la decoloración.

La degradación de uno de los más persistentes grupos de contaminantes, los colorantes orgánicos, requiere aportes de varias disciplinas. Nueva generación de colorantes análogos de los colorantes naturales, productos que cumplan con los requisitos de los nuevos diseños y altamente biodegradables. Construir sintéticos biodegradables a través de enlaces (éster, amida, acetato) que puedan ser completamente mineralizados por hidrolasas y oxidasas de microorganismos comunes, sin que se comprometan los requerimientos de la industria textil como la durabilidad del color sobre las fibras.

## 2. OBJETIVOS

### Objetivos generales:

Estudiar la posibilidad de utilizar a *Stereum hirsutum*, un hongo de la pudrición blanca de la madera, para la degradación de compuestos xenobióticos en procesos de biorremediación.

### Objetivos particulares:

- Estudiar los parámetros nutricionales y condiciones de cultivo que afectan la producción de enzimas lignolíticas en *S. hirsutum* cepa BAFC 2234.
- Caracterizar parcialmente las actividades enzimáticas.
- Comprobar la resistencia de *S. hirsutum* a condiciones de estrés, considerando la posibilidad de ser utilizado en procesos de biorremediación.
- Comprobar la capacidad de *S. hirsutum* de degradar y detoxificar compuestos xenobióticos.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Organismos

Los hongos utilizados pertenecen al cepario de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

El trabajo se realizó con *Stereum hirsutum* cepa BAFC 2234.

El hongo *Phanerochaete chrysosporium* cepa BAFC 232 y BAFC 246 se utilizó como bioindicador en las experiencias de decoloración y detoxificación.

Las cepas de *P. chrysosporium* y *S. hirsutum* fueron mantenidas a 4°C, mediante resiembras periódicas, en tubos pico de flauta con medio MG.

Para la obtención de inóculo se sembró cada cepa en medio de cultivo Agar-Agua y se incubó a 28°C durante 2 días para *P. chrysosporium* y durante 5 días para *S. hirsutum*.

### 3.2. Medios de cultivo

Todas las drogas utilizadas fueron de grado analítico y usadas sin previa purificación.

#### 3.2.1. Medio Malta (MG)

| Componente                     | Peso o volumen |
|--------------------------------|----------------|
| Extracto de malta              | 12 g           |
| Glucosa                        | 10 g           |
| Agua destilada                 | 1000 ml        |
| Agar (para medio MG agarizado) | 20 g           |

### 3.2.2. Agar – Agua

| Componente     | Peso o volumen |
|----------------|----------------|
| Agar           | 20 g           |
| Agua destilada | 1000 ml        |

### 3.2.3. Glucosa – Asparagina (GA)

| Componente                           | Peso o volumen |
|--------------------------------------|----------------|
| Asparagina monohidrato               | 3 g            |
| Glucosa                              | 15 g           |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 0.5 g          |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 0.5 g          |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>      | 0.6 g          |
| Solución de micronutrientes A        | 2 ml           |
| Solución de micronutrientes B        | 2 ml           |
| Tiamina 1 mg/ml                      | 100 µl         |
| Agua destilada                       | 1000 ml        |

#### Solución micronutrientes A

| Componente                                          | Peso o volumen |
|-----------------------------------------------------|----------------|
| CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O                | 200 mg         |
| MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O                | 45 mg          |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 35 mg          |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O | 10 mg          |
| ZnCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O                 | 1.75 g         |
| Agua destilada                                      | 1000 ml        |

#### Solución micronutrientes B

| Componente        | Peso o volumen |
|-------------------|----------------|
| FeCl <sub>3</sub> | 500 mg         |
| Agua destilada    | 1000 ml        |

- El pH final es 6.45.
- Las concentraciones basales de cobre y manganeso en este medio son de 1.6  $\mu\text{M}$  y 4.5  $\mu\text{M}$  respectivamente.
- El medio GA se ensayó con 20 g de glucosa para determinar el requerimiento de glucosa.
- En experiencias con modificación de pH inicial, el pH se ajustó con  $\text{ClH}$  0.1 N entre 3.23 y 6.45 y con  $\text{NaOH}$  0.01 N para valores superiores a 6.45.

#### **3.2.4. Medios para fermentación en sustrato sólido**

Se utilizó salvado de trigo, salvado de soja o la mezcla 1:1 de ambos. Los sustratos se llevaron a 75% (Peso/Volumen) de humedad con agua corriente.

Todos los medios de cultivos fueron autoclavados a 121 °C, 1.2 atm. Durante 20 minutos los medios líquidos y agarizados y 30 minutos los medios con salvado.

### **3.3. Condiciones de cultivo**

Los cultivos en medio líquido se realizaron en frascos Erlenmeyers de 100 ml conteniendo 15 ml de medio.

Los cultivos con salvado se realizaron en frascos Erlenmeyers de 100 ml, prepesados, conteniendo 4 gramos de salvado y 12 ml de agua. Los cultivos para el escalado se realizaron en potes de polipropileno de 250 ml con tapa del mismo material conteniendo 20 g de salvado y 60 ml de agua.

Los Erlenmeyers y tubos de ensayo fueron tapados con algodón, forrados en gasa quirúrgica y cubiertos con papel aluminio.

Todos los cultivos se desarrollaron en forma estática a 28°C bajo iluminación continua. Los cultivos sometidos a estrés por temperatura fueron sometidos a otro régimen de temperaturas (ver punto 3.7.).



### **3.4. Inóculo**

Los cultivos en medio líquido fueron inoculados con tacos de 0.5 cm de lado del borde externo de colonias de 5 días creciendo en agar-agua. Los cultivos en salvado se inocularon con tacos de 0.5 cm de lados del borde externo de colonias de 5 días creciendo en MG agarizado.

### **3.5. Procesamiento de los cultivos**

**3.5.1.** Los cultivos en SmF fueron cosechados de la siguiente forma:

- por filtración en embudo Büchner, a presión reducida, sobre discos de papel de filtro Whatman GP.
- el micelio se secó en estufa a 80 °C hasta peso constante y se determinó crecimiento por biomasa seca.
- los cultivos testigos, luego de secados y pesados, fueron molidos en mortero de porcelana y guardados a -20 °C; estos cultivos permitieron relacionar la biomasa estimada como quitina en los cultivos en SSF con la biomasa seca de los cultivos desarrollados en SmF.
- los sobrenadantes de cultivo fueron conservados a -20 °C y utilizados para las determinaciones de actividades enzimáticas y proteínas solubles.

**3.5.2.** Los cultivos en SSF fueron cosecharon de la siguiente forma:

- se pesan los erlenmeyers para determinar el peso fresco final.
- se homogeniza suavemente.
- se pesa una porción de 2 g a la que se le agregan 5 volúmenes de agua destilada y se agita 20 min.
- se centrifuga a 2000g durante 10'.
- los extractos de compuestos hidrosolubles obtenidos fueron conservados a -20 °C y utilizados para las determinaciones de actividades enzimáticas y proteínas solubles.

- otra porción se pesa para la determinación del peso seco final.
- los sistemas salvado-micelio secos fueron molidos en mortero de porcelana y guardados a  $-20^{\circ}\text{C}$  para la determinación de quitina como estimación de biomasa seca usando como patrón de referencia la quitina de la biomasa seca de los cultivos en medio líquido testigos.
- en los cultivos desarrollados en potes se fraccionó una porción para utilizar en ensayos de decoloración y el resto se procesó como los cultivos en erlenmeyer.

### 3.6. Inductores

Al medio basal GA se le incorporaron inductores de la actividad lacasa y MnP. Se realizaron diversos ensayos:

#### 3.6.1. Primer ensayo de inducción: Agregado de cobre y manganeso

Soluciones madres de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y de  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  10 mM se adicionaron al medio GA hasta alcanzar concentraciones 25, 50, 75, 100, 125, 250, 500, 750 y 1000  $\mu\text{M}$  a tiempo cero.

#### 3.6.2. Segundo ensayo de inducción: Otros inductores

Se ensayaron otros inductores catiónicos, aromáticos y compuestos naturales:

- Inductores cationes: cromo, calcio, hierro, zinc, cobre.
- Inductores aromáticos o naturales: Xilidina (Ponceau 2R), Ac. Siríngico, Vainillina, Ac. Vainílico, Cumarina, Ac. Ferúlico y aserrín.

Se utilizaron dos formas de inducción.

- Agregado del inductor a tiempo 0 (cero) y cosecha a los 17 días.
- Método de sustitución, los cultivos desarrollados en medio GA por 8 días se resuspendieron en el medio de inducción (asparagina 1 g/l, sales, inductor). Las concentraciones de los inductores utilizadas varían entre

20 µM y 1 mM según el compuesto y la experiencia que se desarrolló. Las soluciones de cationes se esterilizaron en autoclave, las soluciones de compuestos aromáticos se esterilizaron por ultrafiltración con membrana de 0.2 µm de poro.

**3.6.3. Tercer ensayo de inducción:** Efecto combinado del cobre y pH inicial del medio de cultivo sobre la producción de lacasa y manganeso peroxidasa

Se realizaron medios de cultivo con combinaciones en las concentraciones de cobre y pH inicial. Se eligieron 3 concentraciones de CuSO<sub>4</sub> y dos valores de pH iniciales. 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 siguiente tabla:

| Factor                 | Valor real y (codificado) |
|------------------------|---------------------------|
| CuSO <sub>4</sub> (µM) | 0 (-1); 125 (0); 250 (1)  |
| pH                     | 5 (-1); 6,5 (1)           |

Los valores de actividad obtenidos fueron ajustados a la ecuación lineal Ec1, con tres coeficientes.

$$Y = aX_1 + bX_2 + cX_1X_2 \quad Ec1$$

Donde Y es la variable respuesta (actividad lacasa o MnP), X<sub>1</sub> es la concentración de CuSO<sub>4</sub>, X<sub>2</sub> es el valor de pH inicial, finalmente a, b y c son los coeficientes a hallar mediante el ajuste a la Ec1. Cuanto mayor sea el coeficiente, 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.

**3.7. Estrés:** Variaciones de temperatura y pH

El micelio fue cultivado en medio líquido sintético con diferentes condiciones iniciales de temperatura y pH. Las incubaciones se realizaron a 8,

16, 23, 28 y 37°C y diferentes combinaciones de ellas. El pH del medio fue ajustado en un rango de 3 a 10 con ClH 1N y NaOH 0.01N. Se determinó el peso seco del micelio y la actividad de las enzimas Lacasa y MnP (Tabla 5).

**Tabla 5:** Situaciones de estrés a las que sometieron los cultivos.

| Experiencia temperatura y pH<br>Condiciones experimentales |               | Experiencia con diferentes temperatura<br>Condiciones experimentales |                                 |
|------------------------------------------------------------|---------------|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| A                                                          | 37 °C, pH 6,4 | a                                                                    | 15 días a 28 °C                 |
| B                                                          | 28 °C, pH 6.4 | b                                                                    | 7 días a 28 °C y 8 días a 37 °C |
| C                                                          | 23 °C, pH 6.4 | c                                                                    | 14 días a 28 °C y 1 día a 37 °C |
| D                                                          | 16 °C, pH 6.4 | d                                                                    | 7 días a 28 °C y 8 días a 16 °C |
| E                                                          | 8 °C, pH 6.4  | e                                                                    | 14 días a 28 °C y 1 día a 16 °C |
| F                                                          | 28 °C, pH 5   | f                                                                    | 7 días a 28 °C y 8 días a 8 °C  |
| G                                                          | 28 °C, pH 3   | g                                                                    | 14 días a 28 °C y 1 día a 8 °C  |
| H                                                          | 28 °C, pH 8   |                                                                      |                                 |
| I                                                          | 28 °C, pH 10  |                                                                      |                                 |
| J                                                          | 37 °C, pH 5   |                                                                      |                                 |

### 3.8. Determinaciones analíticas

#### 3.8.1. Determinación de proteínas

##### 3.8.1.1. Proteínas de sobrenadantes de SmF y SSF

El dosaje de proteínas en los sobrenadantes (proteínas extracelulares), fue realizado por el método de Bradford (1976), utilizando seroalbúmina bovina (BSA) 1 mg/ml como estándar. Las proteínas se midieron en el extracto reservado para actividad enzimática.

### **3.8.1.2. Proteínas totales de micelio**

Se utilizaron las muestras previamente procesadas (3.5.1. y 3.5.2.).

Se tomaron 50 mg de micelio o sólidos de cultivos secos, según sea el caso (SmF o SSF), los que fueron hidrolizados por 30 minutos en baño a 100 °C en 1 ml de NaOH 1N. Las muestras se centrifugaron 20 minutos a 1000 x g y las proteínas extraídas fueron valoradas, en el sobrenadante, por el método de Bradford (1976), utilizando seroalbúmina bovina (BSA) 1mg/ml como estándar.

### **3.8.2. Dosaje de quitina**

Se utilizaron las muestras previamente procesadas (3.5.1. y 3.5.2.).

Se tomaron 50 mg de micelio o 100 mg de sólido de cultivos, según el caso (SmF o SSF), los que fueron hidrolizados por 4 horas en baño a 100°C en 2 ml de ClH 6N. Los hidrolizados neutralizados, se centrifugan 10 minutos a 1000 x g. Se determinó el contenido de N acetil glucosamina (NAGA) liberado de la quitina luego de la hidrólisis del material (Plassard et al., 1982) utilizando glucosamina 1 mg/ml como estándar.

### **3.8.3. Determinación de pH**

Se midió el pH de medios de cultivo y soluciones buffers utilizando un pHmetro Photovolt Modelo 110.

### **3.8.4. Actividades enzimáticas**

#### **3.8.4.1. Actividad lacasa (EC 1.10.3.2.)**

La actividad lacasa se valoró de acuerdo al método de Niku-Paavola et al., (1990), por oxidación del sustrato ABTS (2,2' – azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-ácido sulfónico) 5mM. La reacción se realizó en buffer acetato de sodio 0.1 M a pH 3.5, y se midió el incremento de absorbancia a 420 nm. ( $\epsilon_{420} = 36/\text{mM cm}$ ). La mezcla de reacción que se incubó a 30°C contenía 2.5 ml de sustrato y entre 20 y 100  $\mu\text{l}$  del sobrenadante del cultivos (SmF) o del extracto acuoso (SSF).

Unidad de actividad: una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  del producto oxidado por minuto bajo

las condiciones del ensayo. La actividad enzimática se expresa como UE/ml del sobrenadante de cultivo o por gramos del sistema S+H.

#### **3.8.4.2. Actividad Manganeso peroxidasa (MnP) (EC 1.11.1.13)**

La actividad Mn-peroxidasa se midió siguiendo el método descrito por Kuwahara et al. (1984), usando como sustrato 2.5 ml rojo fenol 0.01 % p/v y  $\text{SO}_4\text{Mn}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1 mM en buffer succinato de sodio 0.1 M a pH 4.5. La mezcla de reacción contenía 2.5 ml de sustrato y 20 a 100  $\mu\text{l}$  del sobrenadante de cultivo (SmF) o del extracto acuoso (SSF). La reacción se inició por el agregado de 20  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  0.2 mM, se incubó a 30 °C y paró mediante el agregado de 40  $\mu\text{l}$  de NaOH 5N. El aumento de absorbancia se leyó a 610 nm ( $\epsilon_{610} = 22/\text{mM cm}$ ).

Unidad de actividad: una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  del producto oxidado por minuto bajo las condiciones del ensayo. La actividad enzimática se expresa como UE/ml del sobrenadante de cultivo o por gramos del sistema S+H.

#### **3.8.4.3. Actividad lignin peroxidasa (LiP). (E.C. 1.11.1.14)**

La actividad lignin peroxidasa se midió siguiendo el método descrito por Tien y Kirk (1983) basado en la oxidación del veratril alcohol a veratril aldehído. La mezcla de reacción contenía: 2.5 ml de buffer tartrato de sodio 50 mM a pH 3, 40  $\mu\text{l}$  de veratril alcohol (concentración final 2 mM) y 200  $\mu\text{l}$  del sobrenadante de cultivo (SmF) o del extracto acuoso (SSF). La reacción se inició con el agregado de 20  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  0.4 mM. La lectura del producto de reacción se realizó a 310 nm ( $\epsilon_{310} 9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

Unidad de actividad: una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  del producto oxidado por minuto bajo las condiciones del ensayo. La actividad enzimática se expresa como UE/ml del sobrenadante de cultivo o por gramos del sistema S+H.

#### **3.8.4.4. Actividad Glioxal oxidasa (GLOX) (EC 1.2.3.5)**

La actividad de glioxal oxidasa (GLOX) se midió usando dos reacciones acopladas según el método de Kersten (1990). La mezcla de reacción contiene 2.5 ml de buffer 2,2-dimetilsuccinato de sodio 50 mM a pH 6, rojo fenol al 0.01% p/v, metilglioxal como sustrato de GLOX al 0.18 % v/v y peroxidasa de rábano 1mg/ml que se incorpora al sustrato en el momento de usar más 200  $\mu$ l del sobrenadante de cultivo (SmF) o del extracto acuoso (SSF). La incubación se realizó a 30 °C durante 30 minutos, la reacción se frenó con 50  $\mu$ l de NaOH 2 N. La lectura del producto de reacción se realizó 610 nm ( $\epsilon_{610} = 22/\text{mM cm}$ ). Se hizo una curva patrón con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 60  $\mu$ M.

Unidad de actividad: una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu$ mol del producto oxidado por minuto bajo las condiciones del ensayo. La actividad enzimática se expresa como UE/ml del sobrenadante de cultivo o por gramos del sistema S+H.

#### **3.8.5.**

**Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. Los valores que se representan tienen una desviación estándar menor al 10%.**

### **3.9. Caracterizaciones bioquímicas**

#### **3.9.1. pH óptimo**

Para la determinación del pH óptimo de la actividad enzimática de lacasa y MnP se disolvieron los sustratos correspondientes en buffer adecuados.

En la determinación del pH óptimo de lacasa se utilizó buffer citrato-fosfato 0.1M con pH entre 2,6 y 5,8 para la preparación del sustrato.

En la determinación del pH óptimo de MnP se utilizó buffer succinato 0.2 M con pH entre 3 y 5.8 para preparar el sustrato. En esta reacción se requiere hacer un blanco para cada pH ensayado, los colores desarrollados por el blanco varían desde el naranja al morado según el pH.

Para la determinación del pH óptimo de la actividad enzimática de lacasa y MnP se utilizaron los extractos crudos de SmF.

### **3.9.2. Temperatura óptima**

Para determinar la temperatura óptima de la actividad enzimática de lacasa y MnP, los ensayos se realizaron como lo especifica el punto 3.8.4.1. para la lacasa y según el punto 3.8.4.2. para la MnP, modificando la temperatura de incubación entre 25 y 65 °C

Para la determinación de la temperatura óptima de la actividad enzimática de lacasa y MnP se utilizaron los extractos crudos de SmF.

### **3.9.3. Estabilidad enzimática**

Se determinó para ambas enzimas, lacasa y MnP, la estabilidad con la temperatura en los extractos crudos de la SmF. Los ensayos se realizaron como lo especifica el punto 3.8.4.1. para la lacasa y según el punto 3.8.4.2. para la MnP. Los extractos se mantuvieron a 30, 40 y 50°C durante 24 horas, se tomaron muestras en forma periódica determinando la actividad residual.

### **3.9.4.**

**Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. Los valores que se representan tienen una desviación estándar menor al 10%.**

## **3.10. Análisis electroforético**

Los extractos crudos de SmF y SSF se corrieron en sistema vertical. Se utilizaron geles de poliacrilamida para la separación con: 9% de acrilamida y sodio dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) en buffer Tris ClH 1.5 M a pH 8.8. Como pregel o gel de concentración se utilizó acrilamida al 4% en buffer Tris ClH 0.125 M a pH 6.8. Se utilizó un equipo Mini-Protean 3, Bio-Rad y como marcador de peso molecular BlueRanger Prestained Pierce.

Se utilizaron muestras de 5 µl de sobrenadante al que se le incorpora 1µl de azul de bromofenol 2mg/ml para marcar el frente. Como buffer de corrida se utilizó Tris-glicina (pH 8.3) y se aplicó un voltaje constante de 150 voltios.



Cuando el frente llega a 1.5 cm por encima del borde inferior del gel se detiene el proceso, se retira el gel y se fija durante 10 minutos en 10% (v/v) de ácido acético y 40% (v/v) de metanol.

#### **3.10.1. Determinaciones de la presencia de lacasa en los extractos crudos**

Los geles previamente fijados se sumergen en sustrato para lacasa, solución de ABTS en buffer acetato a pH 3.5, en la misma concentración que se utilizó para medir actividad enzimática. Los geles se incubaron a 36 °C hasta la aparición de las bandas verdes típicas de esta reacción, aproximadamente 10 minutos.

#### **3.10.2. Determinaciones de la presencia de MnP en los extractos crudos**

Los geles previamente fijados se sumergen una solución de dimetoxifenol (DMP) 0.5 mM en buffer succinato pH 4.5, MnSO<sub>4</sub> 1 mM y se adiciona H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.2M.

El DMP reacciona con Lacasa y con MnP, pero ambas reacciones son a tiempos diferentes, tienen diferente coloración cuando la incubación se hace tras noche y las bandas de Lacasa se identifican previamente con ABTS.

#### **3.10.3. Determinación del peso molecular de Lacasa y MnP**

En los geles tratados según el punto 3.10.2. se corrieron los marcadores de peso molecular BlueRanger Prestained Pierce que abarca un rango de peso 215 kDa a 18,3 kDa.

#### **3.10.4. Actividad decolorante de la Lacasa**

Los geles previamente fijados durante 10 minutos se sumergieron en solución de **IC** (Índigo Carmín) 0.3 mM o **VM** (Verde de malaquita) 0.1 mM en buffer acetato 0,1 M, pH 3,6. Este ensayo se planeó también con **X** (Xilidina [Ponceau 2R]), pero el contraste de color no fue suficiente como para registrar la acción de la enzima mediante fotografía. Se descartó la solución de colorante y se incubaron a 36 °C con los siguientes tratamientos: a) sin ningún agregado, b) con agregado de HBT 8 mM y c) con agregado de ABTS 0,5 mM. Se preservaron de la desecación con papel film.

### **3.10.5. Actividad decolorante de la MnP**

Los geles previamente fijados durante 10 minutos se sumergieron en solución de con Índigo Carmín 0,3 mM en buffer succinato 0.1 M, pH 4,5 suplementado con MnSO<sub>4</sub> 1 mM durante 10 minutos, se descartó la solución de colorante y se inicia el proceso de decoloración con el agregado de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.2mM. Se incubaron a 36°C, y se preservaron de la desecación con papel film.

### **3.11. Ensayos de decoloración con cultivos desarrollados en SSF**

Se utilizaron soluciones de **X** e **IC** en concentración 20 µM y soluciones de **VM** en concentración 10 µM. A 30 ml de cada solución se le agregaron 2 gramos de peso fresco del cultivo del micelio creciendo sobre el sustrato sólido (**S+H**) sin desintegrar. Se realizaron lecturas de la absorbancia en tiempo 0 (antes del agregado de S+H) y a intervalos de 10 minutos durante la primera hora y cada 30 minutos durante la segunda hora. Las longitudes de onda utilizadas fueron: X 505 nm, IC 605 nm y VM 615 nm., que corresponden a sus máximos de absorción.

#### **3.11.1. Ensayos de decoloración. Escalado**

Se utilizaron los cultivos desarrollados en potes de polipropileno para obtener una mayor masa del sistema (S+H). Se utilizó el sistema óptimo de decoloración previamente ensayado, micelio creciendo en salvado de soja.

Porciones de S+H (soja) de 13 días se suspendieron en una solución de VM con una relación 30 gramos de peso fresco en 500 ml de solución de colorante. Se realizaron dos estudios: a) secuencial: solución inicial 10 µM, 24 horas de contacto, llevado nuevamente a 10 µM, 24 horas de contacto; b) solución inicial 20 µM, se tomaron muestras a 2, 3, 4 y 24 horas de contacto entre el S+H y el VM. La valoración de la actividad decolorante se estimó por pérdida de la absorbancia de la solución de VM a 615 nm.

### 3.12. Detoxificación

Los ensayos de detoxificación se realizaron sobre los diferentes efluentes originados por decoloración del Verde de Malaquita (3.12.1.) complementados con glucosa (1%) y extracto de malta (1,2%) o sea, medio MG líquido donde el agua destilada fue reemplazada por la solución de VM decolorada. Los testigos del nivel de detoxificación se realizaron en forma paralela con cultivos en MG líquido con VM en concentraciones 0, 2, 4, 8 y 16  $\mu\text{M}$ .

Estos ensayos se llevaron a cabo con la cepa *Phanerochaete chrysosporium* BAFC 232. Esta cepa es sensible al VM (Paninutti y Forchiassin, 2004). Se realizaron curvas de crecimiento en forma paralela en los distintos medios. Se estimó el crecimiento por la biomasa seca como se indica en 3.5.1.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Cultivos en medio líquido

#### 4.1.1. Optimización del medio de cultivo

##### 4.1.1.1. Crecimiento de *Stereum hirsutum* con diferentes concentraciones de glucosa

Experiencias anteriores realizadas en nuestro laboratorio evaluaron la capacidad de esta cepa de producir enzimas lignolíticas. *S. hirsutum* evidenció títulos importantes de estas enzimas comparados con los organismos ampliamente estudiados como *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* y *Bjerkandera* sp. BOS55 entre otros (Godio et al., 2000). Los autores estudiaron los efectos de las condiciones de cultivos sobre la actividad lignolítica de *S. hirsutum* y estimaron, para esta cepa, crecimiento y producción de ligninasas con diferentes fuentes de nitrógeno y con variaciones en las concentraciones de glucosa en SmF.

Establecieron como medio de cultivo óptimo para el crecimiento y la producción de enzimas lignolíticas el medio GA (Glucosa- Asparagina), con asparagina como fuente de nitrógeno, 3 gramos por litro, y glucosa como fuente de carbono, 20 gramos por litro de medio.

En los estudios realizados, donde se censó la concentración de la fuente de carbono desde 2.5 g l<sup>-1</sup> hasta 30 g l<sup>-1</sup>, el rango de estimación de glucosa salta de 10 a 20 g l<sup>-1</sup>. Por este motivo se cultivó la cepa en medio GA con diferentes concentraciones de glucosa con el fin de estimar el medio mínimo óptimo (menor costo) para la producción de ligninasas (lacasa y MnP).

Los cultivos se desarrollaron con dos concentraciones de glucosa, la concentración óptima determinada anteriormente, 20 g l<sup>-1</sup> y 15 g l<sup>-1</sup>. Se estableció que con 15 gramos de glucosa la producción de exoenzimas es

ligeramente menor al medio con 20 gramos (Figura 11, A y B). Sobre la base de reducir costos se optó por el medio GA (15 g l<sup>-1</sup> de glucosa y 3 g l<sup>-1</sup> de asparagina). Este medio permite obtener una concentración relativamente importante de enzimas con esa relación de fuentes C/N.

#### **4.1.1.2. Influencia del pH inicial del cultivo sobre el crecimiento y la producción de ligninasas.**

La actividad de las enzimas lignolíticas es óptima a pH ligeramente ácidos. Se planteó la posibilidad de que el pH inicial del cultivo tuviese influencia en la producción de ligninasas.

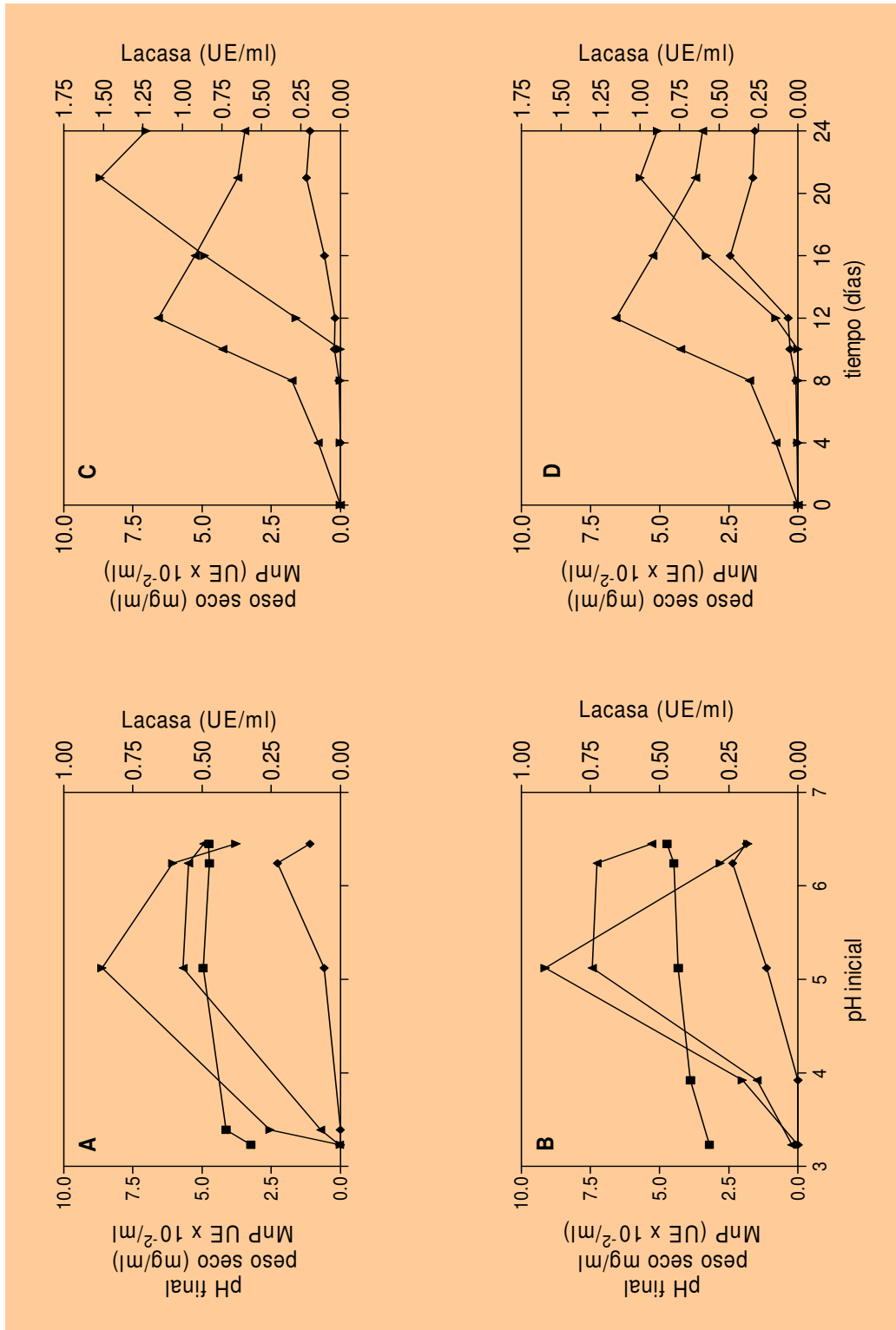
Se cultivó la cepa en medio GA con diferentes pH iniciales: 3.23, 3.92, 5.12, 6.24 y 6.45.

La producción de biomasa fue fuertemente influenciada por el pH. Valores de pH inferiores a 4 generaron un crecimiento casi nulo o mínimo. La formación de biomasa fue pareja para pH que varían en el rango de 5.12 a 6.24 para ambas concentraciones de glucosa como fuente de carbono. Con pH mayor a 6.24 se registra una caída abrupta del peso seco.

La actividad de ligninasas también fue influenciada por el pH inicial de los cultivos. Los cultivos con pH inicial 5,2 resultaron óptimos para la producción de lacasa, los cultivos con pH inicial 6,24 fueron óptimos para la producción de MnP.

Esta experiencia preliminar que permitió un ajuste de las condiciones del medio de cultivo arrojó otros resultados importantes. Los cultivos con 15 días de desarrollo micelial alcanzaron un pH entre 4 y 5 independientemente del pH inicial con excepción de los cultivos iniciados a pH 3.23, donde se registró muy poco crecimiento y no se modificó el pH inicial. *S. hirsutum* es una cepa que puede crecer en medios con diferentes pH, produce enzimas lignolíticas en un espectro amplio ácido-base y el micelio durante su desarrollo produce la amortiguación del pH.

Los máximos de actividad lignolítica en esta experiencia coincidieron con los máximos de peso seco, tanto para lacasa como para MnP, dado que la biomasa fue pareja entre los pH óptimos para la producción de ambas enzimas.



**Figura 11:** Crecimiento de *S. hirsutum* en medio GA: (A) glucosa 15 g/l y pH inicial: 3.23, 3.92, 5.12, 6.24 y 6.45; (B) glucosa 20 g/l y pH inicial: 3.23, 3.92, 5.12, 6.24 y 6.45; (C) glucosa 15 g/l y pH inicial 5,12; (D) glucosa 15 g/l y pH inicial 6.24. ■ pH final de los cultivos, ◆ MnP, ▼ lacasa, ▲ peso seco.

La figura 11 (A y B) muestra en forma conjunta los resultados para las dos concentraciones de glucosa y los diferentes pH iniciales.

#### **4.1.2. Curva de crecimiento y producción de ligninasas de *S. hirsutum***

Existen tres tipos de enzimas que oxidan las unidades de lignina: ligninperoxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y lacasa (Kirk y Farrell, 1987). No todos los hongos de la pudrición blanca producen los tres tipos de enzimas (Hatakka, 1994). La cepa *S. hirsutum* es productora de lacasa y MnP, no se detectó producción de LiP.

Las curvas de crecimiento (figura 11, C y D) en medio GA con 15 g l<sup>-1</sup> de glucosa y con pH inicial 5.12 y 6.24 arrojaron nuevos resultados.

Los máximos de producción de estas enzimas no coinciden con el máximo de biomasa del micelio.

La biomasa presentó un máximo al día 12 de cultivo, en forma independiente del pH inicial. Si bien se evidenció títulos enzimáticos desde los inicios de la fase logarítmica, los máximos se registraron durante el metabolismo secundario.

La máxima actividad de lacasa se observó en cultivos de 21 días, para ambos pH iniciales del medio en coincidencia con el decaimiento del micelio.

La MnP presentó la máxima actividad en los cultivos de 16 días con pH inicial 6,24 y cinco días después en los cultivos a pH 5,12 (Figura 11 C y D).

La producción de MnP mostró estar influenciada por el pH inicial del cultivo de dos maneras: en el título máximo que ocurre los 16 días de cultivo con pH inicial 6,24 y en el estado del desarrollo del micelio, los cultivos con pH inicial 5,12 presentaron los mayores valores de actividad de MnP a los 21 días de cultivos.

##### **4.1.2.1. Condiciones óptimas de actividad y estabilidad de las enzimas**

###### **4.1.2.1.1. pH óptimo**

Se determinó el pH óptimo para la actividad de las enzimas incubando a una temperatura estándar, 30°C.

El pH óptimo registrado para la actividad lacasa fue pH 3.6 y para MnP el pH óptimo fue 4.5.

#### **4.1.2.1.2. Temperatura óptima**

Con los sustratos a pH óptimo para cada enzima se estableció la temperatura óptima de reacción. Para la lacasa resultó la temperatura óptima de reacción 50°C, para la MnP la temperatura óptima resultó 58°C.

Lacasa tiene como temperatura óptima 50°C y pH 3.6.

MnP tiene como temperatura óptima 58°C y pH 4.5.

#### **4.1.2.1.3. Estabilidad**

Para ambas enzimas la temperatura óptima de reacción no resultó ser la de máxima estabilidad. La actividad lacasa decae rápidamente cuando la temperatura es superior a 30°C. La MnP tolera temperaturas superiores (40 a 50°C) por más tiempo que la lacasa pero presenta mayor estabilidad a 30°C.

Por este motivo se continuó trabajando con los pH óptimos pero a 30°C que es la temperatura de mayor estabilidad.

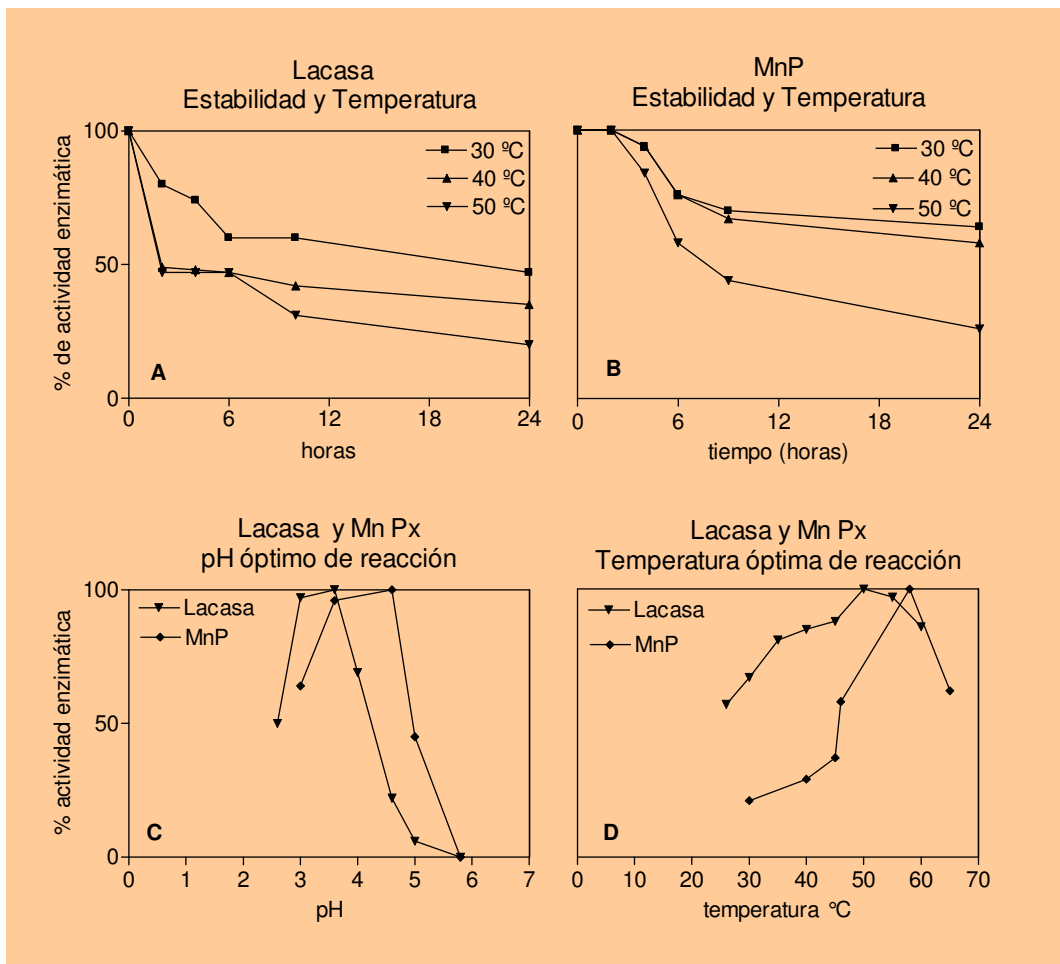
Los resultados se muestran en la figura 12.

#### **4.1.2.2. Inducción de actividad enzimática**

Hay pocos reportes de cepas productoras de ligninasas en concentraciones con potencialidad para una explotación económica.

La producción de Lacasa es la más investigada porque esta enzima no requiere la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se recurre a sistemas y/o medios que aceleren la producción de estas enzimas y su actividad. Se ha estudiado como variaciones en las condiciones de cultivo como inmovilización del micelio sobre soportes inertes u orgánicos, incorporación a los cultivos de metales pesados, compuestos aromáticos, xenobióticos recalcitrantes y otros factores influyen sobre la producción de enzimas lignolíticas en varias especies de hongos.





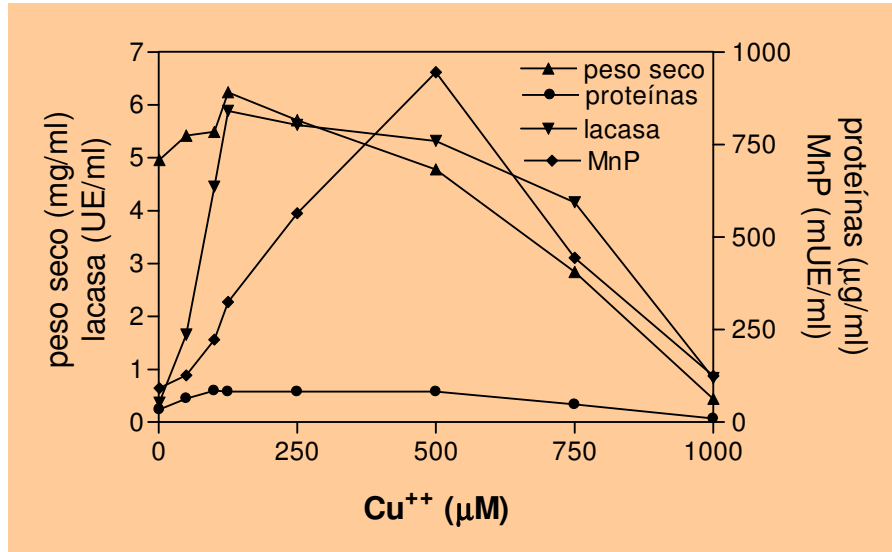
**Figura 12:** Estabilidad en función de la temperatura para las enzimas: Lacasa (A) y MnP (B). pH óptimo de reacción (C) y temperatura óptima (D) de reacción para ambas enzimas.

#### 4.1.2.3. Cobre y manganeso como inductores de actividad enzimática

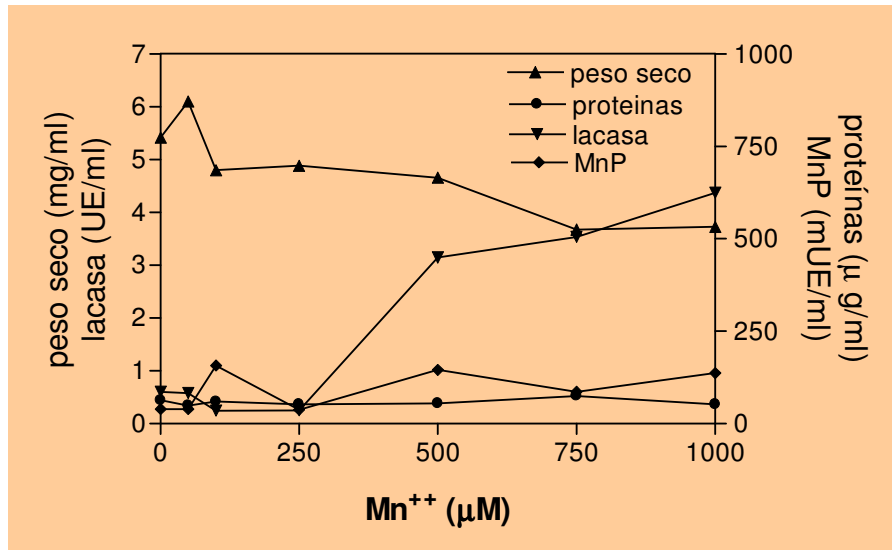
Sobre la base de datos bibliográficos se ensayaron dos inductores catiónicos que están bien establecidos, cobre y manganeso. Los resultados fueron los esperados con ciertas variantes:

- El cobre induce tanto la actividad de lacasa como de MnP (figura 13).
- El manganeso también induce la actividad de ambas enzimas (figura 14).

El cobre no tuvo influencia en la cantidad total de proteínas solubles y afectó el crecimiento cuando la concentración de este metal en el medio superó los 125  $\mu\text{M}$ . La actividad lacasa alcanzó el máximo en esta concentración y continuó una cinética similar a la de la biomasa. La MnP presentó un máximo de



**Figura 13:** Crecimiento de la cepa, proteínas solubles y actividad enzimática en medio GA suplementado con cobre de 1.6 a 1000  $\mu\text{M}$ .



**Figura 14:** Crecimiento de la cepa, proteínas solubles y actividad enzimática en medio GA suplementado con manganeso de 0.45 a 1000  $\mu\text{M}$ .

actividad con 500  $\mu\text{M}$  de cobre en el medio, cuando se registró un importante descenso en el crecimiento.

La inducción de la actividad de la MnP en función de la concentración de manganeso tiene una cinética particular, hay una inducción en bajas concentraciones, luego una disminución para nuevamente producirse la inducción (Figura 14). Concentraciones de  $\text{Mn}^{++}$  ligeramente superiores a las que contiene el medio GA favorecen el desarrollo vegetativo en forma coincidente con la disminución de la producción de enzimas.

En las sucesivas experiencias que se han realizado, *S. hirsutum* mostró que un buen desarrollo vegetativo no siempre es el camino óptimo para obtener una buena producción de enzimas. Tanto el Cobre como el Manganeso afectan el crecimiento micelial cuando superan concentraciones de 125  $\mu\text{M}$ , pero teniendo menor crecimiento vegetativo la producción de enzimas tiene importantes valores absolutos (Figura 13 y 14) y de actividad específica (Tabla 6 y 7).

**Tabla 6:** Variaciones de la actividad específica de Lacasa a diferentes concentraciones de  $\text{Cu}^{++}$  y  $\text{Mn}^{++}$  referidas a peso seco del micelio y proteínas solubles.

| <b>lacasa</b>                  |                |                    |
|--------------------------------|----------------|--------------------|
| Concentración<br>$\mu\text{M}$ | UE / peso seco | UE / prot. soluble |
| $\text{Cu}^{++}$ 1.6           | 0.074          | 0.010              |
| $\text{Cu}^{++}$ 500           | 1.110          | 0.064              |
| $\text{Cu}^{++}$ 1000          | 1.880          | 0.083              |
| $\text{Mn}^{++}$ 50            | 0.095          | 0.012              |
| $\text{Mn}^{++}$ 500           | 0.675          | 0.057              |
| $\text{Mn}^{++}$ 1000          | 1.174          | 0.084              |

**Tabla 7:** Variaciones de la actividad específica de Manganese peroxidasa a diferentes concentraciones de  $\text{Cu}^{++}$  y  $\text{Mn}^{++}$  referidas a peso seco del micelio y proteínas solubles.

| <b>MnP</b>                     |                |                    |
|--------------------------------|----------------|--------------------|
| Concentración<br>$\mu\text{M}$ | UE / peso seco | UE / prot. soluble |
| $\text{Cu}^{++}$ 1.6           | 18.54          | 2.68               |
| $\text{Cu}^{++}$ 500           | 201.00         | 11.49              |
| $\text{Cu}^{++}$ 1000          | 284.00         | 12.56              |
| $\text{Mn}^{++}$ 50            | 6.51           | 0.81               |
| $\text{Mn}^{++}$ 500           | 31.25          | 2.65               |
| $\text{Mn}^{++}$ 1000          | 36.38          | 2.63               |

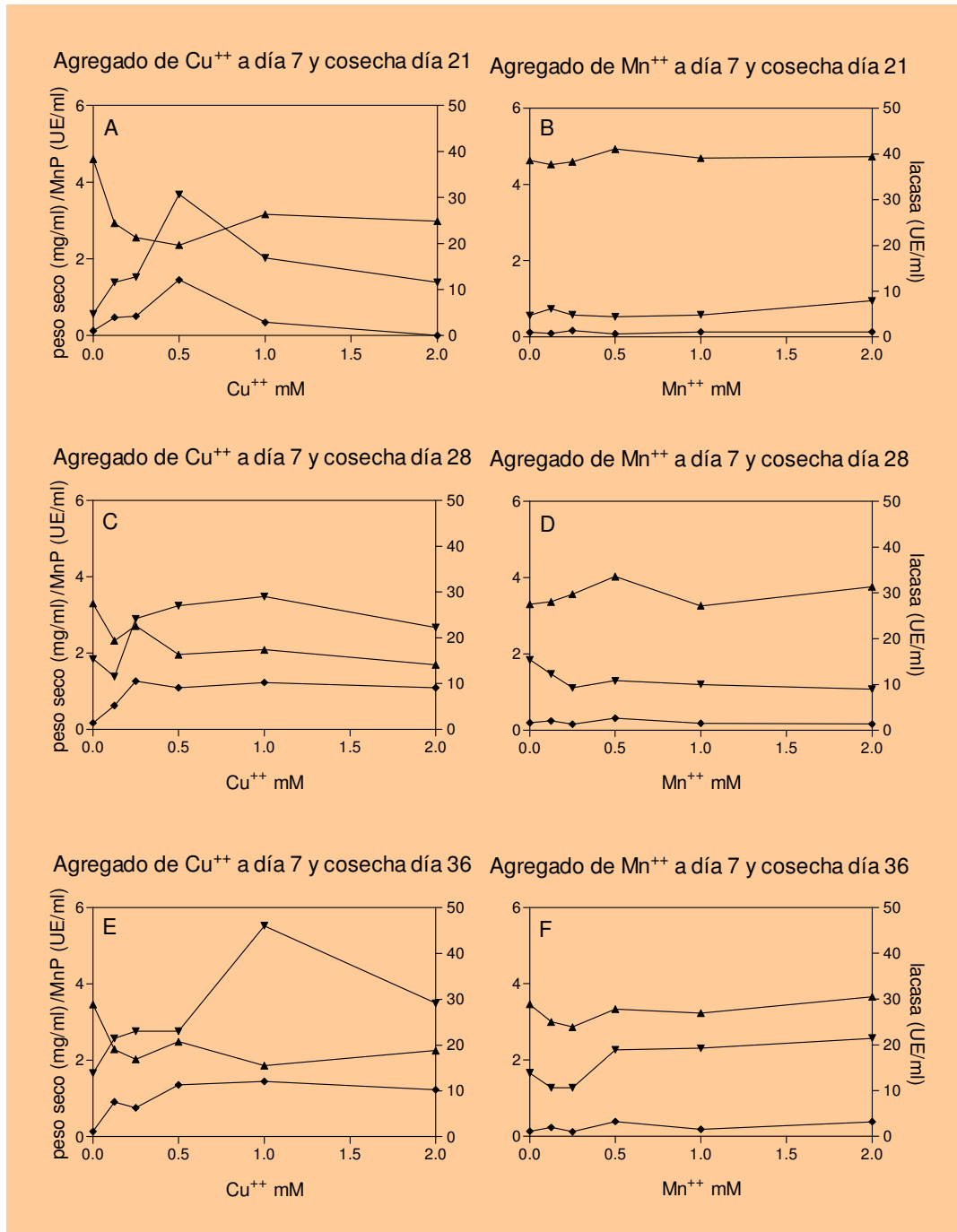
#### 4.1.2.4. Inducción con $\text{Cu}^{++}$ y $\text{Mn}^{++}$ sobre cultivos de 7 días de desarrollo

En base a observaciones sobre “crecimiento micelial - producción de exoenzimas - concentración de  $\text{Cu}^{++}$  y  $\text{Mn}^{++}$ ”, se diseñó una experiencia en la cual a cultivos de 7 días se le incorporó la solución madre de los inductores en forma aséptica hasta alcanzar concentraciones finales de 0 a 2000  $\mu\text{M}$ . Los cultivos continuaron su desarrollo y se cosecharon a 14, 21 y 29 días de incorporado el inductor catiónico. Esta experiencia se diseñó (tabla 8) para observar si el micelio con 7 días de desarrollo era más resistente al Cobre y al Manganese. Se realizaron controles incorporando el inductor a tiempo 0.

**Tabla 8:** Diseño experimental de siembras, inducción y cosecha.

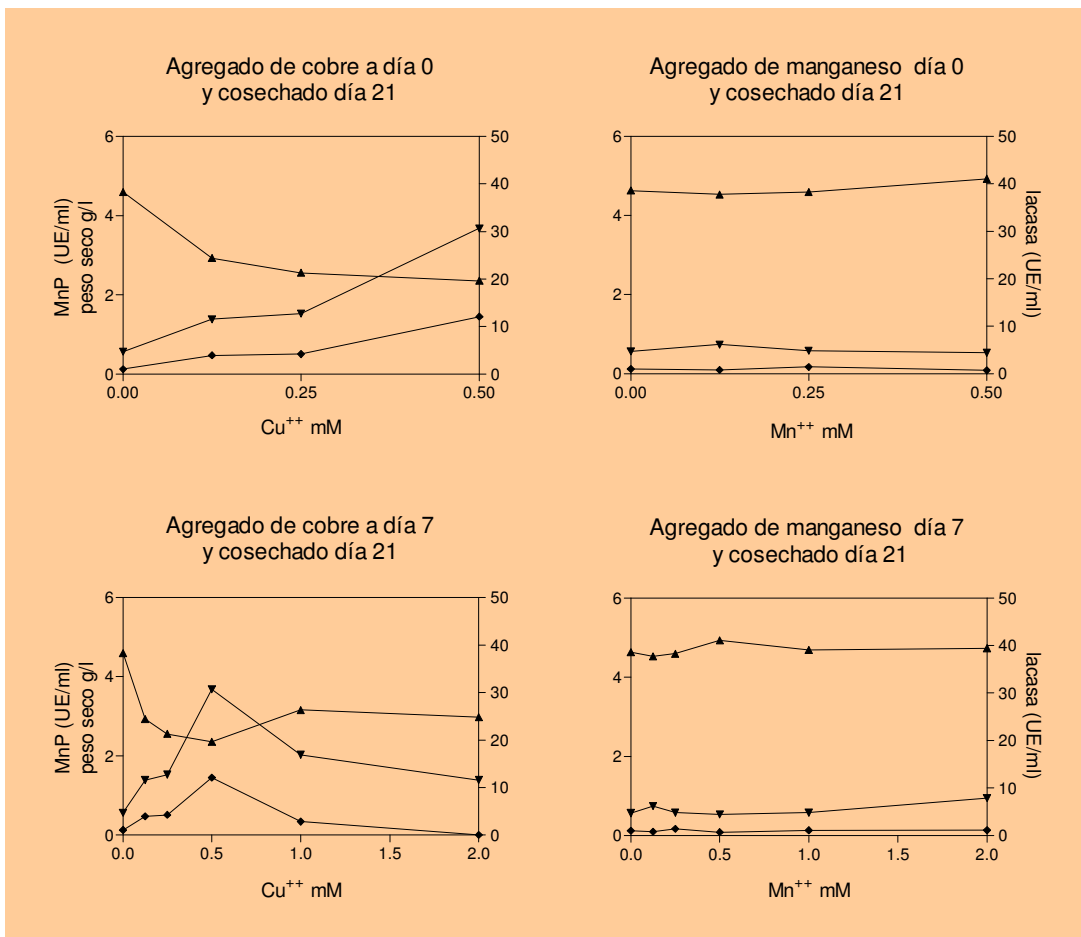
| Incorporación del<br>inductor $\text{Cu}^{++}/\text{Mn}^{++}$ | Fecha de cosecha                          |                                           |                                           |
|---------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|
|                                                               | Día 0 (cero)                              | 21 días de cultivo<br>21 días de inductor | 28 días de cultivo<br>28 días de inductor |
| Día 7 (siete)                                                 | 21 días de cultivo<br>14 días de inductor | 28 días de cultivo<br>21 días de inductor | 36 días de cultivo<br>29 días de inductor |

Los resultados que se observan en la figura 15 y 16. La producción de enzimas sigue dos patrones: a) En la figura 15 se observa que la actividad enzimática es mayor a mayor concentración de inductor luego de un mayor tiempo de



**Figura 15:** Crecimiento y actividad enzimática en cultivos suplementados con cobre y manganeso a los 7 días de cultivo. Peso seco ▲, Lacasa ▼, MnP ◆.

incubación utilizando  $\text{Cu}^{++}$  como inductor. Cosechando a los 21 días se observa un máximo para ambas enzimas a 500  $\mu\text{M}$  de cobre, los cultivos de 36 días tienen un máximo para lacasa a 1 mM de cobre. La curva de producción de MnP no mostró variaciones apreciables durante el tiempo de desarrollo de los cultivos siendo muy similar en los muestreos de 28 y 36 días. El peso seco presenta fluctuaciones en las concentraciones más bajas del inductor y tiende a ser constante a mayor concentración y a mayor tiempo de cultivo. Podemos observar en el gráfico A de la figura 15 que con una concentración de  $\text{Cu}^{++}$  500  $\mu\text{M}$  los máximos de ambas enzimas coinciden con el mínimo de peso seco. Los cultivos con  $\text{Mn}^{++}$  como inductor no presentan variantes importantes. b) En la figura 16 se comparan los cultivos de 21 días con los inductores incorporados a 0 y 7 días. Observamos que la producción máxima de enzimas ocurre a la



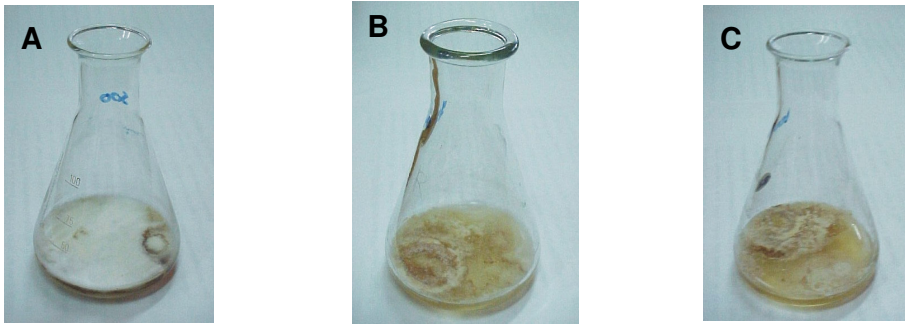
**Figura 16:** Crecimiento y actividad enzimática en cultivos suplementados con cobre y manganeso día 0 y 7 de cultivo. Peso seco ▲, lacasa ▼, MnP◆.

misma concentración en ambas experiencias cuando el inductor es cobre. En ambos gráficos se observa los máximos de enzimas coincidiendo con mínimos de peso seco. El agregado de manganeso no introduce variantes importantes.

Cuando las condiciones de desarrollo se alejan de las óptimas, se puede considerar que el hongo está sometido a situaciones de “stress”, se observa en el micelio la producción de un pigmento marrón, probablemente melanina. En la figura 17 se observa el efecto del cobre y en la figura 18 se observa la acción del manganeso sobre este mismo fenómeno.



**Figura 17:** Coloración desarrollada por el micelio en cultivos con agregado de cobre 1mM en el medio GA.



**Figura 18:** Coloración desarrollada por el micelio en cultivos con agregado de manganeso en el medio GA; **A** 0.5 mM, **B** 0.75 mM y **C** 1 mM.

#### 4.1.2.5. Otros inductores

Se ensayaron otros inductores catiónicos, aromáticos y compuestos naturales:

- Inductores catiónicos: cromo, calcio, hierro, zinc, cobre.
- Inductores aromáticos o naturales: Xilidina (Ponceau 2R), Ac. Siríngico, Vainillina, Ac. Vainílico, Cumarina, Ac. Ferúlico y aserrín.

Se utilizaron dos formas de inducción.

- agregado del inductor a tiempo 0 (cero), cosecha 17 días.
- método de sustitución (cambio de medio a cultivos de ocho días).

Se determinaron tres enzimas: dos ligninasas, lacasa y MnP y una productora de  $H_2O_2$ , Glioxal oxidasa (Glox).

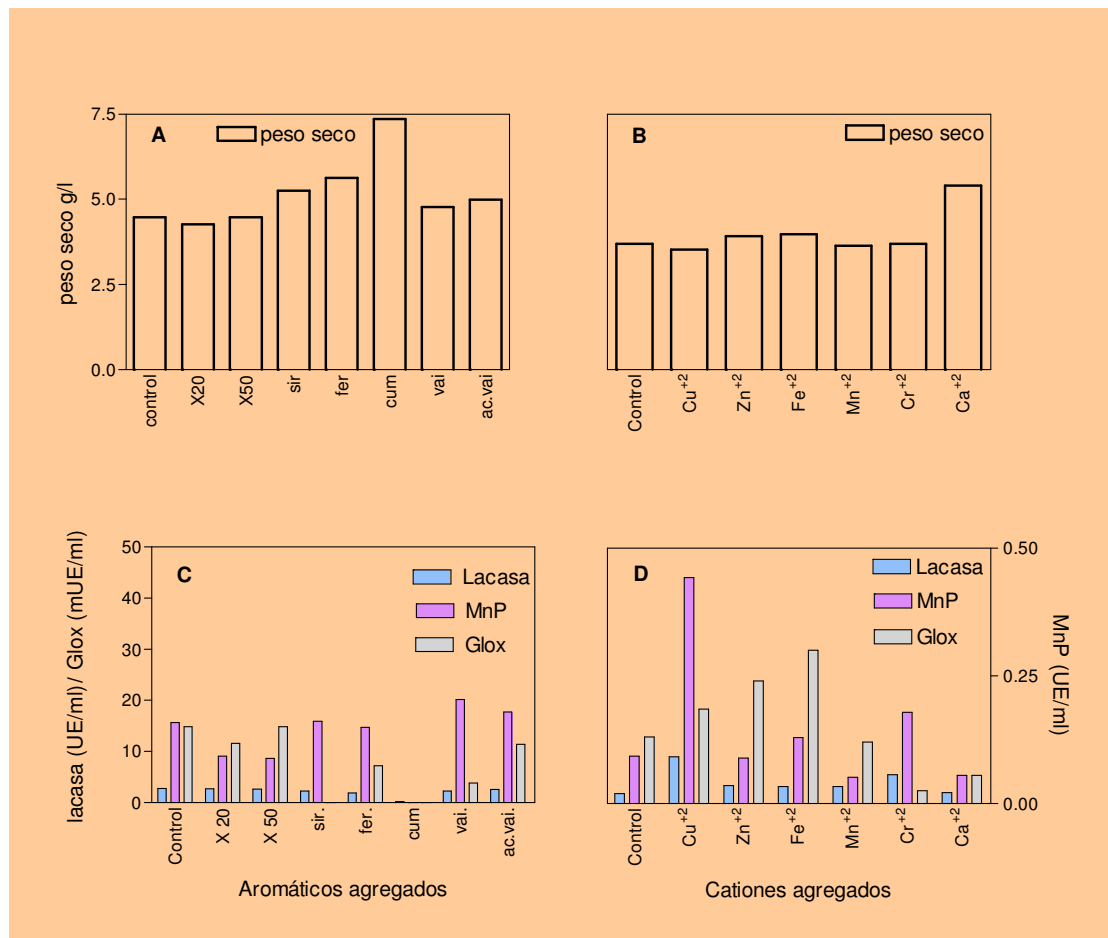
Incorporación de inductores a tiempo cero

En todas las experiencias se registró que el crecimiento micelial no se condice con la producción de enzimas. Cuando el desarrollo micelial es óptimo



la producción de enzimas es mínima. Siendo la máxima expresión el efecto de la cumarina y el calcio (figura 19).

Elementos tóxicos como el cromo resultaron ser buenos inductores, al igual que el hierro (figura 19 B y D) sin afectar el crecimiento micelial, el peso seco de las muestras es similar al control en ambos casos.



**Figura 19:** Crecimiento micelial y producción de enzimas. **A** y **B** peso seco en g/l. **C** y **D** producción de enzimas lignolíticas y la oxidasa GLOX. Concentraciones utilizadas: Cationes 250  $\mu$ M, Xilidina 20 y 50  $\mu$ M, otros aromáticos 1mM. Control: GA, **X**: Xilidina, **sir**: Ac. Siringico, **fer**: Ac. Ferúlico, **cum**: Cumarina, **vai**: Vainillina, **ac. vai**: Ac. Vainílico.

Es más importante la influencia de los metales que la de los compuestos aromáticos. Estos últimos con una estructura similar a monómeros de lignina, son menos desencadenantes en la producción de ligninasas que los metales.

El cobre es el catión de mayor influencia tanto en la producción de lacasa como de MnP, seguido por el cromo, zinc, hierro y manganeso con un comportamiento similar. La producción de Glox es máxima con hierro como inductor, y es coincidente con una buena producción de MnP, no ocurre esto cuando el inductor es cobre (figura 19 D).

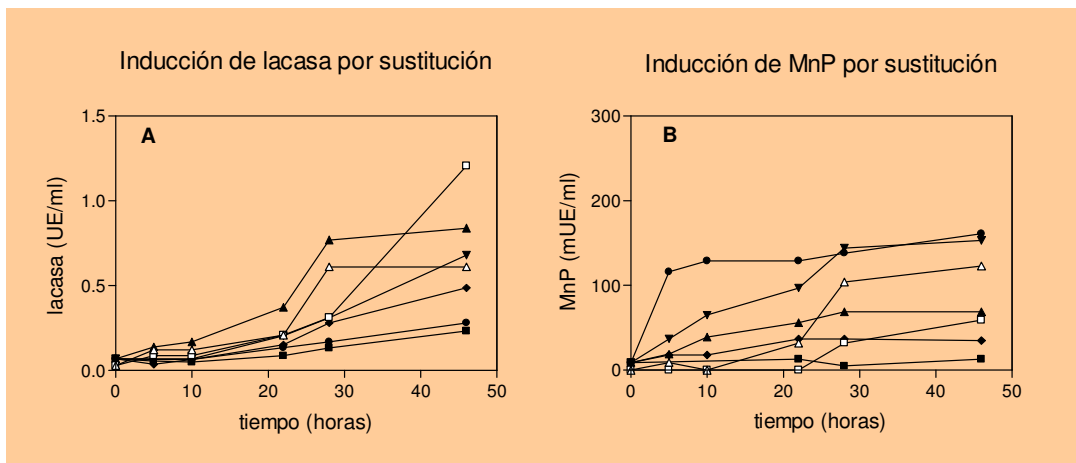
Los compuestos aromáticos, a excepción de la cumarina, no presentaron inducción ni represión importante sobre las ligninasas respecto al control. La producción de lacasa es similar con todos los otros inductores. La producción de MnP aumentó un 25% aproximadamente cuando el inductor fue Vainillina y un 10% con Ac. Vainílico. La Glox es inhibida respecto al control por Ac. Ferúlico, Vainillina, Ac. Siríngico y la Cumarina, siendo estos dos últimos los que produjeron la máxima inhibición. Cuando los compuestos utilizados como inductores son Ac. Ferúlico y Vainillina hay una inhibición de la Glox de entre el 50 y 75 % respecto al control, este hecho no está acompañado en un descenso en la actividad de la MnP, en el caso del Vainillina hay además una ligera inducción de MnP (figura 19 C), Dado que la actividad de la MnP requiere la generación de  $H_2O_2$  no sería conveniente recurrir a estos compuestos como inductores de ligninasas.

#### Inducción por sustitución

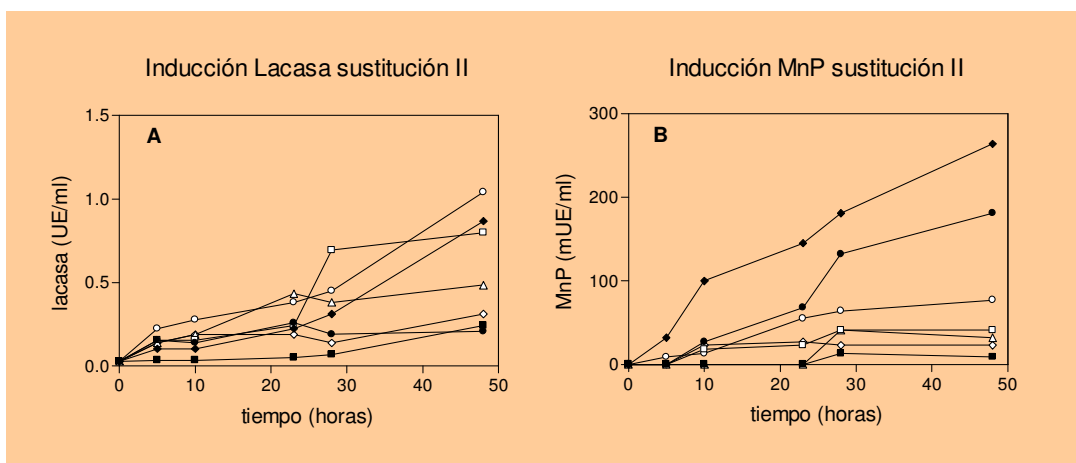
En esta experiencia se incrementó la concentración de los inductores (figura 20 y figura 21), se experimentó con diferentes compuestos y a concentraciones variadas. El micelio bien desarrollado de *S. hirsutum* (ocho días de crecimiento) tolera concentraciones que no puede tolerar en tiempo cero.

Con el inductor aplicado a tiempo cero se puede obtener una excelente actividad específica (UE/g peso seco, tablas 6 y 7) pero la producción industrial requiere altas cantidades de unidades enzimáticas. El método de inducción por sustitución es factible de ser utilizado porque produce más unidades de actividad enzimática.

El cobre es el mejor inductor para lacasa. Utilizando  $Cu^{++}$  125  $\mu M$  se obtienen 0,84 UE/ml, con  $Cu^{++}$  500  $\mu M$  (una concentración cuatro veces mayor) se obtiene 1,207 UE/ml (figura 20 A) o sea un incremento del 52%.



**Figura 20:** Inducción por sustitución. Cultivos crecidos en GA 8 días, pasados a medios de inducción: ■ GA (control), ◆ Xilidina 20 μM, △ Xilidina 1 mM, ● Aserrín 100mg/erlenmeyer, ▲ Cu<sup>++</sup> 125 μM, □ Cu<sup>++</sup> 500 μM ▼ Mn<sup>++</sup> 125 μM.



**Figura 21:** Inducción por sustitución. Cultivos crecidos en GA 8 días, pasados a medios de inducción: ■ GA (control), ◆ Ac. Siríngico 1mM, ● Ac. Ferúlico 1mM, □ Ac. Ferúlico 0,5 mM, △ Cumarina 1mM, ○ Vainillina 1mM, ◇ Ac. Vainílico 1mM.

En la inducción de la MnP el Cu<sup>++</sup> tiene poca influencia y se observa un efecto inhibitorio cuando se incrementa la concentración. El micelio tratado con Cu<sup>++</sup> 500 μM produce menos enzima que el micelio tratado con Cu<sup>++</sup> 125 μM (figura 20 A).

El  $Mn^{++}$  es un buen inductor tanto de Lacasa como de MnP (figuras 20 A y B). Las concentraciones mayores de  $Mn^{++}$  produjeron un precipitado que interfirió en las determinaciones.

Los compuestos aromáticos presentan comportamientos diferentes como inductores.

El Ac. Siríngico es un buen inductor para la MnP y de relativa importancia para lacasa (figura 21 A y B).

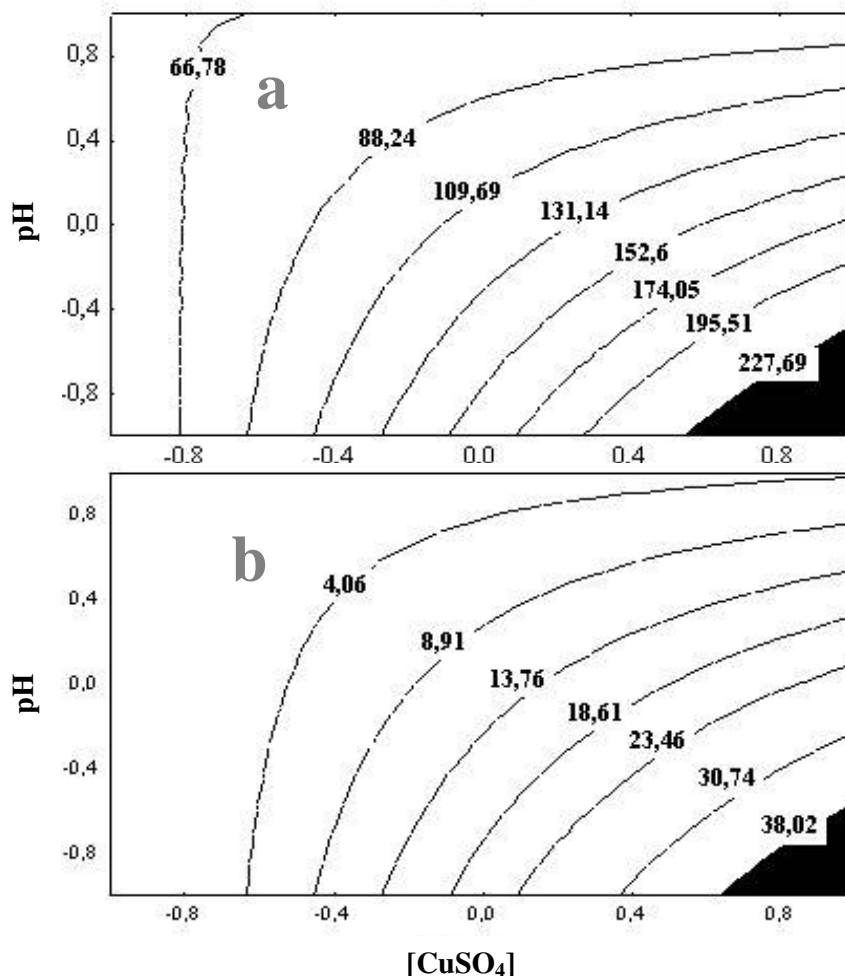
La Cumarina, que colocada en tiempo cero reprime la producción de enzimas (figura 19 C), es un pobre inductor tanto para lacasa como para MnP en el método por sustitución (figuras 21 A y B). El Ac. Ferúlico resulta ser un buen inductor de MnP (figura 21 B) al igual que el aserrín que contiene un alto porcentaje de este compuesto (figura 20 B). Ninguno de estos dos compuestos son de gran importancia para la actividad de lacasa.

#### **4.1.2.6. Efecto combinado del cobre y pH inicial del medio de cultivo sobre la producción de lacasa y manganeso peroxidasa**

Son muchos los factores que afectan la producción de enzimas lignolíticas en hongos causantes de pudrición blanca. Para la cepa en estudio se observó una influencia importante del cobre y del pH. Debido a esto, se realizó un estudio combinado de la influencia de ambos factores en la producción de estas enzimas. Para esto los datos de actividad obtenidos fueron ajustados a la ecuación (en materiales y métodos, Ec1, pag. 32), obteniéndose valores de correlación ( $R^2$ ) 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.

$$\begin{aligned} \text{Lacasa} &= 11,51 + 14,16 X_1 - 9,53 X_2 - 12,52 X_1 X_2 & (R^2 = 0,80) \\ \text{MnP} &= 116,33 + 61 X_1 - 47 X_2 - 57 X_1 X_2 & (R^2 = 0,81) \end{aligned}$$

Luego del ajuste se encontró que para *S. hirsutum* existen interacciones negativas entre los factores pH y cobre para la producción de ambas enzimas (-12,52 y -57 para lacasa y MnP respectivamente), junto con un efecto positivo del cobre sobre ambas actividades: coeficiente a.



**Figura 22:** Gráficos de contorno, según las ecuaciones mostradas al pie, para la producción de MnP ( $\text{mU ml}^{-1}$ ) (a) y lacasa ( $\text{U ml}^{-1}$ ) (b). La zona sombreada corresponde a las condiciones que producen la mayor actividad.  $X_1$ : cobre;  $X_2$ : pH. Los valores en los ejes están codificados según la tabla 1.

A partir de estas ecuaciones se confeccionaron gráficos de contorno (figura 22) 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  $\text{Cu}^{++}$  es la más alta y el valor de pH el más bajo (interacción negativa).

#### 4.1.2.7. Estrés por temperatura y pH

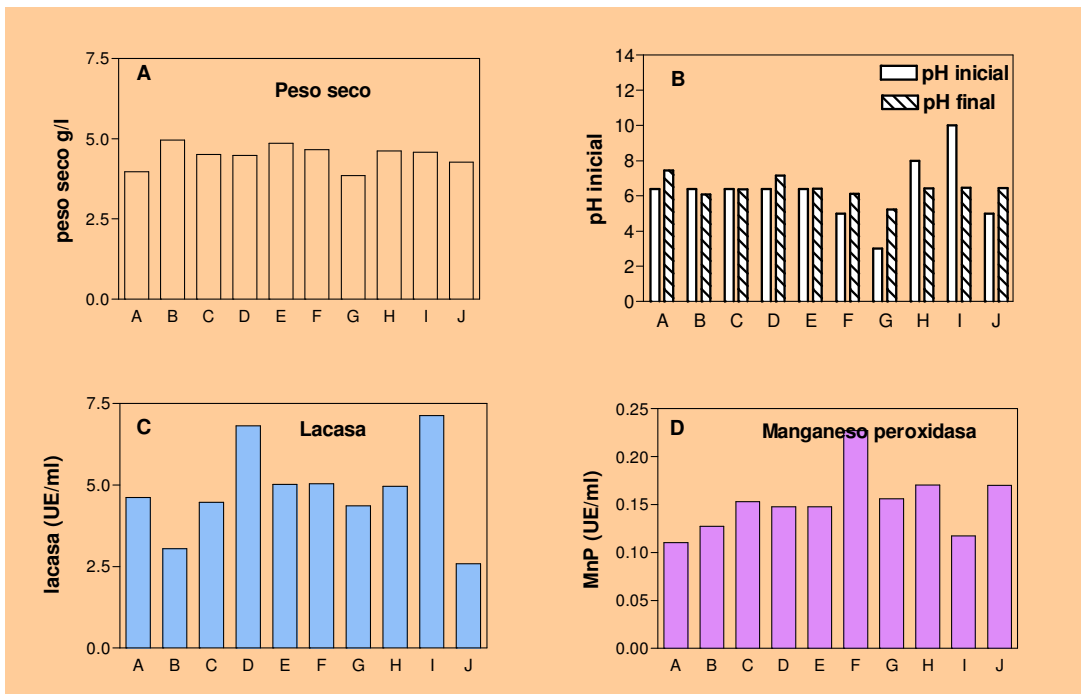
Los ensayos con metales pesados, compuestos aromáticos recalcitrantes y las combinaciones de cobre, manganeso y pH, arrojaron resultados promisorios de una relación entre la producción de enzimas lignolíticas y las condiciones extremas del cultivo. Se establecieron condiciones de cultivo que permitieran comprobar esta hipótesis. Los cultivos fueron sometidos a estrés por pH y por temperatura y se realizaron combinaciones de ambos factores. Las condiciones experimentales se muestran en la tabla 9.

**Tabla 9:** Condiciones experimentales para establecer la relación entre el estrés y la producción de ligninasas.

| Condiciones experimentales<br>(resultados en figura 23) |               | Condiciones experimentales<br>(resultados en figura 24) |                                 |
|---------------------------------------------------------|---------------|---------------------------------------------------------|---------------------------------|
| A                                                       | 37 °C, pH 6,4 | a                                                       | 15 días a 28 °C                 |
| B                                                       | 28 °C, pH 6.4 | b                                                       | 7 días a 28 °C y 8 días a 37 °C |
| C                                                       | 23 °C, pH 6.4 | c                                                       | 14 días a 28 °C y 1 día a 37 °C |
| D                                                       | 16 °C, pH 6.4 | d                                                       | 7 días a 28 °C y 8 días a 16 °C |
| E                                                       | 8 °C, pH 6.4  | e                                                       | 14 días a 28 °C y 1 día a 16 °C |
| F                                                       | 28 °C, pH 5   | f                                                       | 7 días a 28 °C y 8 días a 8 °C  |
| G                                                       | 28 °C, pH 3   | g                                                       | 14 días a 28 °C y 1 día a 8 °C  |
| H                                                       | 28 °C, pH 8   |                                                         |                                 |
| I                                                       | 28 °C, pH 10  |                                                         |                                 |
| J                                                       | 37 °C, pH 5   |                                                         |                                 |

La producción de estas enzimas también se incrementa cuando las condiciones de cultivo se tornan desfavorables en cuanto a temperatura y pH. Los cultivos creciendo a diferentes temperaturas no presentan grandes variantes en el crecimiento (figura 23 A), se registró el peso seco máximo, 4,99 g/l a 28°C y el mínimo, 3,97 g/l a 37°C. No ocurre lo mismo con las enzimas: la mayor producción de Lacasa (figura 23 C) se detecta a 16°C y es 2,23 veces superior a

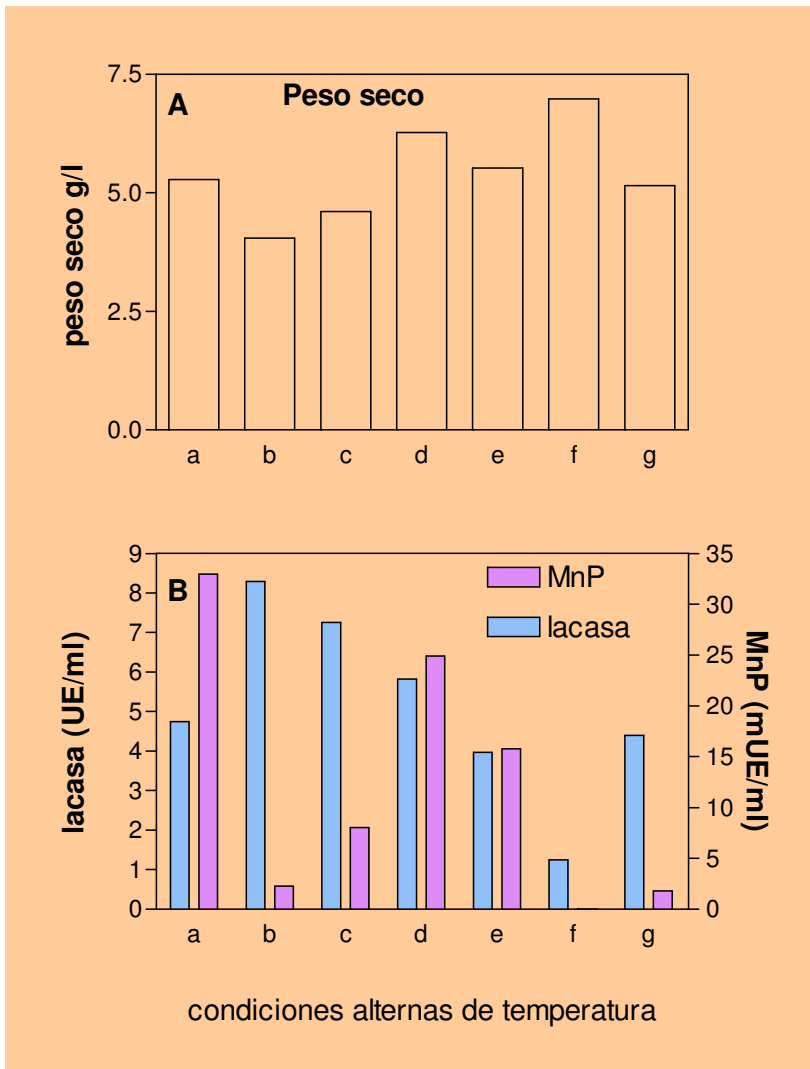
la detectada en los sobrenadantes de los cultivos desarrollados a 28°C, condición estándar, la producción de MnP es más uniforme con un pico a los 23°C (figura 23 D). El pH, también produce variaciones en la actividad de las enzimas, se registraron máximos para lacasa cuando las condiciones iniciales son alcalinas, pH 10 (figura 23 C) y un máximo para MnP cuando las condiciones iniciales son ácidas, pH 5 (figura 23 D). Estos estudios permiten observar la capacidad buffer del micelio, sin importar cual es el pH inicial en 15 días de cultivo los sobrenadantes tienden a la neutralidad (figura 23 B).



**Figura 23:** Crecimiento del micelio (A), pH inicial y final (B), producción de Lacasa (C) y producción de MnP (D) con variaciones en el pH inicial y temperatura de incubación (las condiciones de cultivo se indican en la Tabla 9, pag. 59).

Las combinaciones de diferentes temperaturas a lo largo de los 15 días de cultivo mostraron que el micelio crecido 7 días a 28°C y 8 días a 16°C produce en forma simultánea ambas enzimas, por el contrario el mismo período a 37°C, inhibe la actividad de la MnP e induce a la lacasa. Al igual que en otras experiencias, las variaciones en la masa micelial son menores a las variante en

la producción de enzimas. En la condición **f** (figura 24 A), el crecimiento es 1,75 veces mayor que en condición **b**. La diferencia de producción de enzimas (figura 24 B) es 6,3 veces mayor en la condición **b** respecto a **f** para la lacasa y para la MnP 33 veces mayor en la condición **a** que en **f**. Un dato relevante que se observa en los gráficos es la concordancia entre los cultivos con máximo crecimiento vegetativo y la menor producción de enzimas lignolíticas.



**Figura 24:** Crecimiento del micelio (**A**) y producción de enzimas Lacasa y MnP (**B**) en condiciones alternas de temperatura (las condiciones de cultivo se indican en la Tabla 9, pag 59).



## 4.2. Cultivos en medio sólido

La fermentación en estado sólido (SSF) es un sistema de cultivo que permite obtener metabolitos secundarios y enzimas en importantes concentraciones con bajo costo. Para los Basidiomycetes de la pudrición blanca, los residuos agroindustriales (figura 25) representan un sustrato similar a los sistemas naturales donde se desarrolla.

Los componentes lignocelulósicos aportan nutrientes y soporte para su crecimiento. El crecimiento en ausencia de agua libre, además de ser la forma más parecida al desarrollo de estos hongos en su hábitat natural, reduce la posibilidad de contaminación.



**Figura 25:** Desarrollo del micelio de *Stereum hirsutum* en un residuo agroindustrial, cáscara de soja.

*S. hirsutum* fue cultivado en Salvado de Trigo, en Salvado de Soja y en la mezcla 1:1 de ambos Salvados con 75% de humedad.

Los parámetros medidos a lo largo de 42 días permitieron determinar el estado de los cultivos: crecimiento estimado por quitina y por proteína del micelio, actividad metabólica estimada por pérdida de peso seco del sustrato, y actividad extracelular evaluada por proteínas solubles, actividad Lacasa y Manganese Peroxidasa.

La SSF tiene varias dificultades (ver Introducción, página 20), la pérdida de humedad es una de ellas. Durante las dos primeras semanas de cultivo la pérdida de humedad alcanza entre el 10 y el 20% según el sustrato. Hacia el final de la experiencia estas pérdidas llegan al 69% en el caso más extremo, cuando el sustrato es Salvado de Trigo (figura 26 A).

El descenso de peso seco, indicador de actividad metabólica, tiene una pendiente más o menos constante hasta los 14 días de cultivo, pasadas las dos semanas, esta pendiente se va reduciendo hasta acercarse a cero a las 4 semanas de cultivo (figura 26 B).

El crecimiento medido tanto en proteínas de micelio como en quitina muestra el máximo desarrollo cuando el sustrato es Salvado de Soja (figura 26 C y D, símbolo ■). Este dato es importante, los mejores resultados en los ensayos de decoloración realizados con el hongo creciendo en SSF se obtienen cuando el sustrato es Salvado de Soja. En los otros dos sistemas el crecimiento es menor, con la particularidad que el crecimiento en la mezcla 1:1 de ambos salvados muestra un comportamiento ligeramente inferior al promedio de ambos sistemas puros, esto, también se verá reflejado en la actividad decolorante.

Las proteínas solubles se producen en forma logarítmica durante los primeros 14 días de cultivo en los tres medios utilizados. A partir de la tercera semana de cultivo se produce un descenso y luego un incremento, esto pasa en todos los cultivos pero en diferentes tiempos (figura 26 F). La producción más estable se da en Salvado de Trigo. La mezcla de ambos salvados presenta un brusco descenso luego del máximo, retomando la producción de proteínas extracelulares después al finalizar la tercera semana. Cuando la SSF se produce sobre Salvado de Soja el incremento inicial es más suave, con una

zona de estabilidad durante la tercera semana de cultivo, continúa una ligera baja y finalmente retoma la producción de proteínas solubles.

La figura 26 nos permite comparar en forma conjunta la producción de enzimas, lacasa y MnP, con proteínas extracelulares y crecimiento de micelio medido en base a quitina.

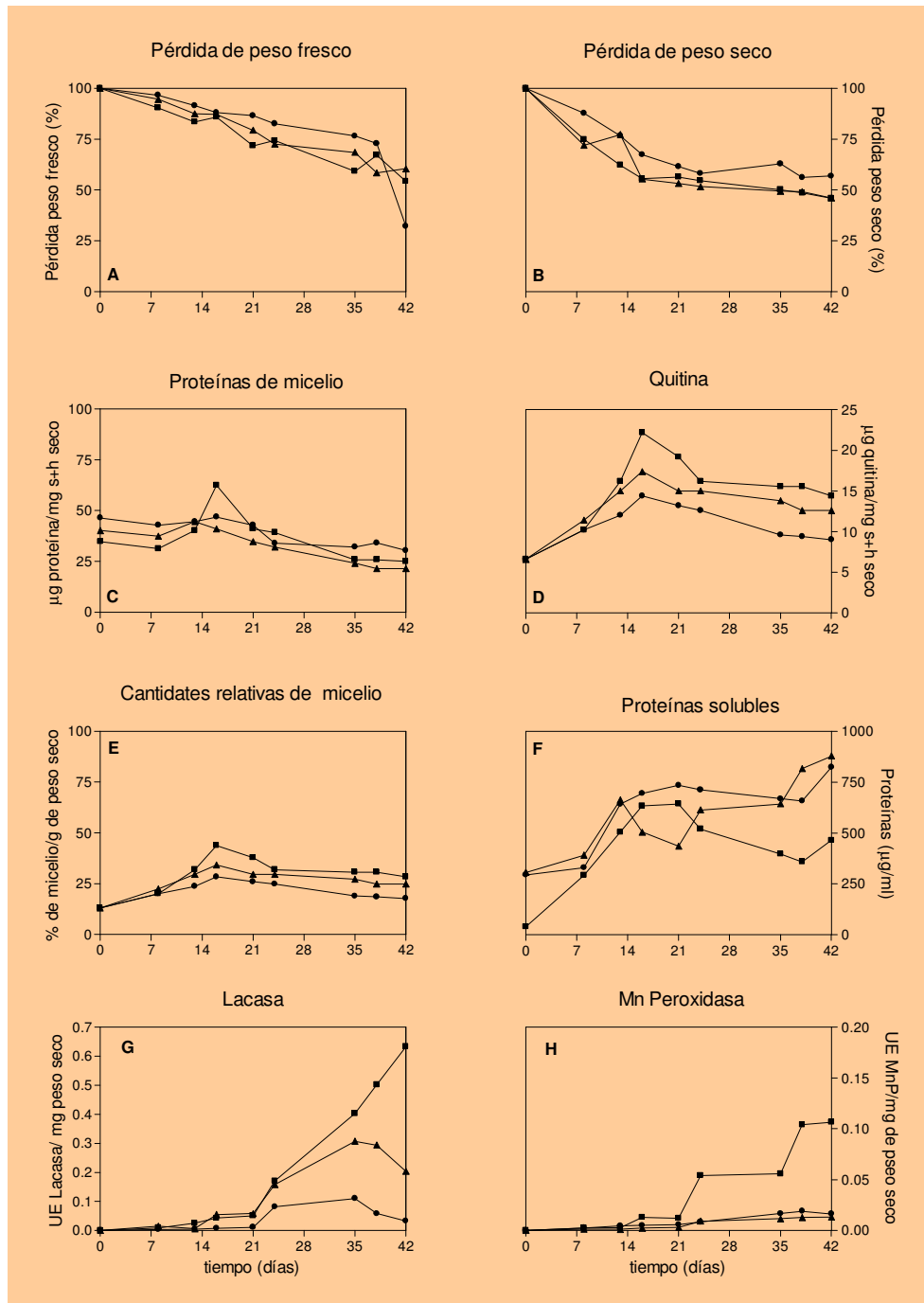
La mayor producción de enzimas ocurre en Salvado de Soja (figura 26 G y H), al igual que el mayor crecimiento (figura 26 D). En cuanto a las proteínas son más abundantes en Salvado de Trigo o en la mezcla de ambos Salvados (figura 26 F). La producción masiva de ambas enzimas ocurre en un micelio que comienza a percibir el estrés por falta de agua. Los cultivos de 21 días perdieron del 14 al 29 % de su peso fresco. Esto significa que la humedad del SSF al día 42 es de 68 % en el caso más extremo que es coincidente con el caso de mayor producción de enzimas en Salvado de Soja.

### 4.3. Ensayos de decoloración

Los ensayos de decoloración y detoxificación se realizaron con cultivos en SSF. Se utilizaron los tres sistemas referidos en crecimiento sobre sustratos sólidos: salvado de soja, salvado de trigo y la mezcla 1:1 de ambos.

*S. hirsutum* crece formando una trama de micelio muy consistente de difícil disgregación. Las hifas envuelven al sustrato otorgando a la estructura del sistema S+H una consistencia firme y corchosa. Este hecho facilita el trabajo con esta especie en procesos de biorremediación. El complejo S+H flota sobre el líquido a tratar, interactúan principalmente los compuestos solubles resultantes de la actividad metabólica del hongo. De esta forma no interfieren en las estimaciones de decoloración la turbidez originada por disgregación del sustrato.

De los tres sustratos ensayados, T, S y T+S, se observan resultados que difieren por un lado en la edad óptima de cultivo para producir los máximo de decoloración y por otro lado es diferente la actividad decolorante frente a cada compuesto sea Índigo Carmín (**IC**), Verde de Malaquita (**VM**) o Xilidina [Ponceau 2R] (**X**).



**Figura 26:** Desarrollo de los cultivos en SSF en tres sustratos diferentes: ■ cáscara de soja, ▲ salvado de trigo y cáscara de soja en una relación 1:1 y ● salvado de trigo. Parámetros medidos: **A** pérdida peso fresco; **B** pérdida de peso seco; **C** y **D** estimación de crecimiento por proteínas y por quitina del micelio; **E** expresión del crecimiento relativo al estado metabólico, **F** proteínas solubles, **G** actividad lacasa, **H** actividad MnP.

El hongo cultivado en sustratos diferentes varía su actividad decolorante. Es en general más activo el sistema S+H cuando el sustrato es salvado de soja.

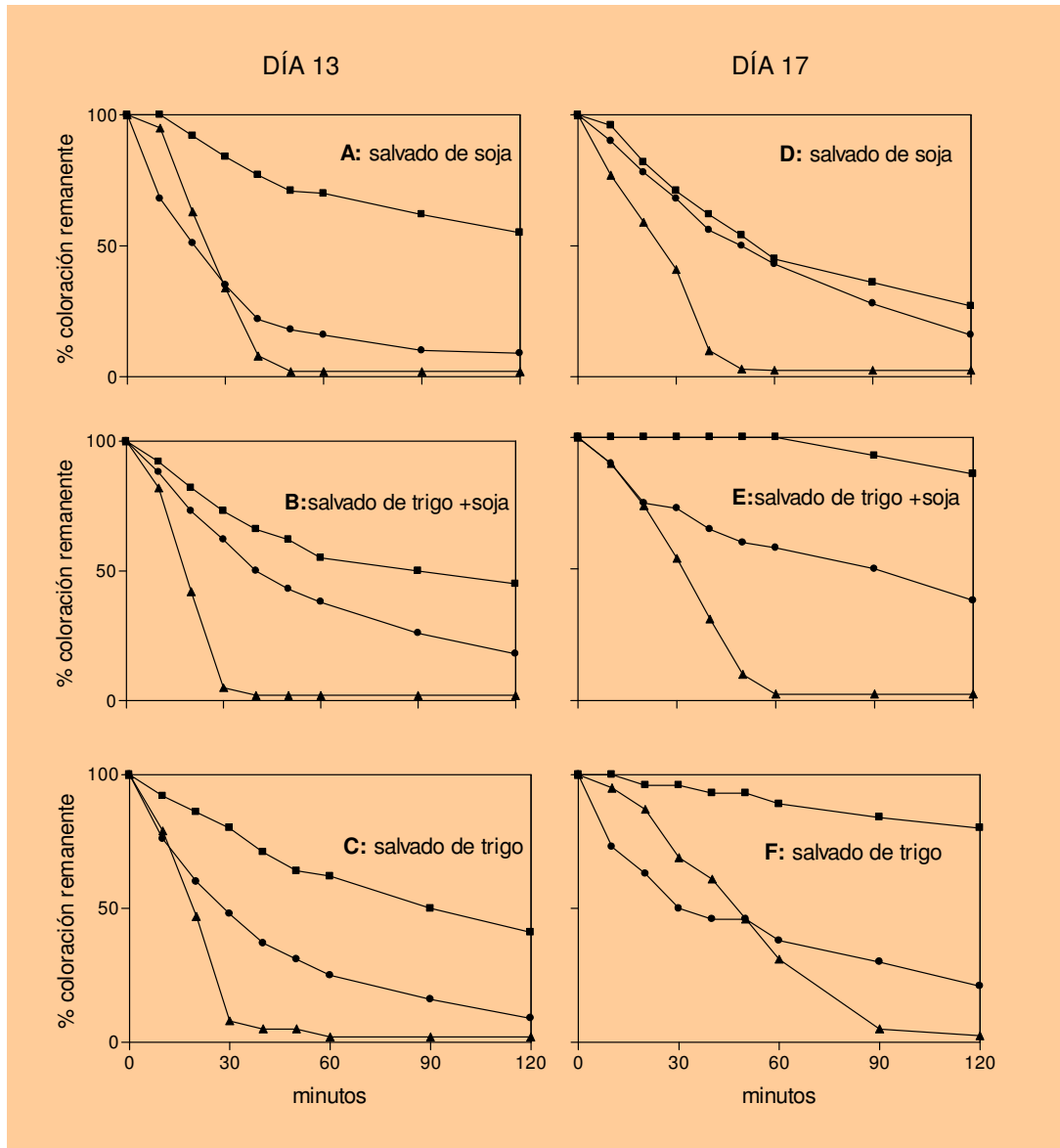
Cuando la cepa crece sobre salvado de soja como sustrato se ha observado que los cultivos de 13 días son más eficaces en la decoloración del VM y del IC (figura 27 A, B y C) y los cultivos de 17 días son más eficaces en la decoloración de X (figura 27 D) Esto se observa (figura 27) en los primeros muestreos (día 13 y día 17). Con el tiempo (día 20 a 28 de cultivo) la actividad decolorante del hongo creciendo sobre los tres sustratos es similar (figura 28), menor y requiere mayor tiempo de contacto entre el sistema S+H y la solución a decolorar. El hongo cultivado en sustrato mezcla de salvado de soja y de trigo 1:1, no muestra resultados intermedios con respecto a cuando se los cultiva en cada sustrato al 100% (figura 27). De todas las mediciones realizadas los óptimos se muestran en la tabla 10.

**Tabla 10:** Sistemas óptimos de decoloración para cada colorante.

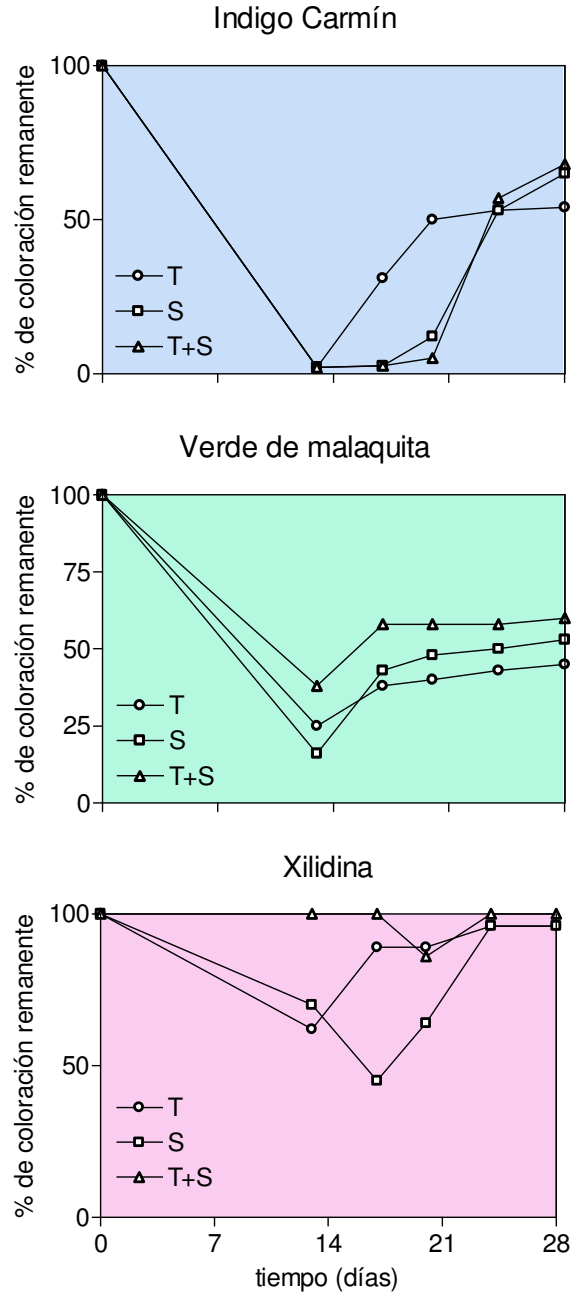
| Colorante    | Decoloración (%) | Sustrato Sólido | Día de cultivo (días) | Tiempo contacto (minutos) |
|--------------|------------------|-----------------|-----------------------|---------------------------|
| Xilidina     | 77               | S. Soja         | 17                    | 120                       |
| Índigo       | 98               | 1Trigo:1Soja    | 13                    | 40                        |
| V. malaquita | 97               | S. Soja         | 13                    | 120                       |

Sobre cada sistema ensayado para decoloración se midió actividad lacasa, MnP y Glox en el total del medio ensayado. La GLOX, es una oxidasa extracelular que genera el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> necesario para la activación de la MnP.

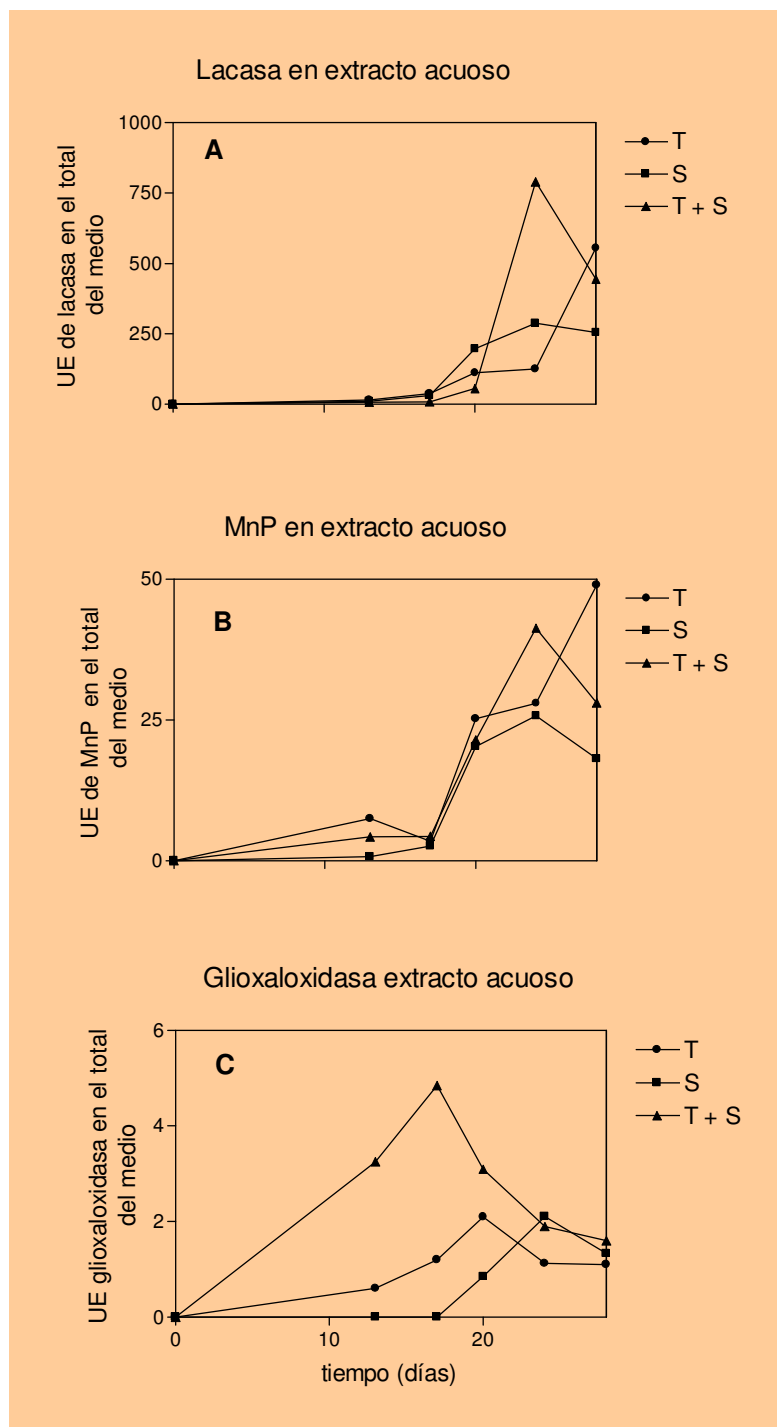
En los tres medios la actividad lacasa y MnP comienza a ser importante finalizando la tercera semana coincidente con la experiencia anterior (figura 26 G y H; figura 29 A y B). La actividad GLOX es variada con los tres medios (figura 29 C). Varía la producción máxima y el momento del desarrollo en que esto ocurre. La máxima actividad de GLOX se midió el día 17 de cultivo cuando el sustrato es Trigo-Soja.



**Figura 27:** Degradación del los colorante VM 10 μM (●), IC 20 μM (▲) y X 20 μM (■) por *S. hirsutum* creciendo en tres sustratos sólidos y en dos momentos de su curva de crecimiento: día 13 (A, B, C) y día 17 (D, E, F)



**Figura 28:** Curvas de decoloración de los diferentes S+H (○ Trigo, □ Soja, △ Trigo +Soja) para cada colorante en función de la edad del cultivo.



**Figura 29:** UE de enzimas: lacasa (A), MnP (B) y GLOX (C) en el extracto acuoso del total del medio+hongo (16 gramos de peso fresco) en los cultivos de las diferentes edades que se ensayó decoloración. ▲T+S, ■ S, ● T



En los cultivos donde el sustrato es Soja o Trigo alcanza aproximadamente el mismo valor pero en momentos diferentes del desarrollo; el día 20 cuando crece sobre Trigo y el día 24 cuando crece sobre Soja.

En los cultivos realizados sobre la mezcla de ambos salvados el valor de GLOX es dos veces el valor de GLOX en cada uno de los salvados en forma individual.

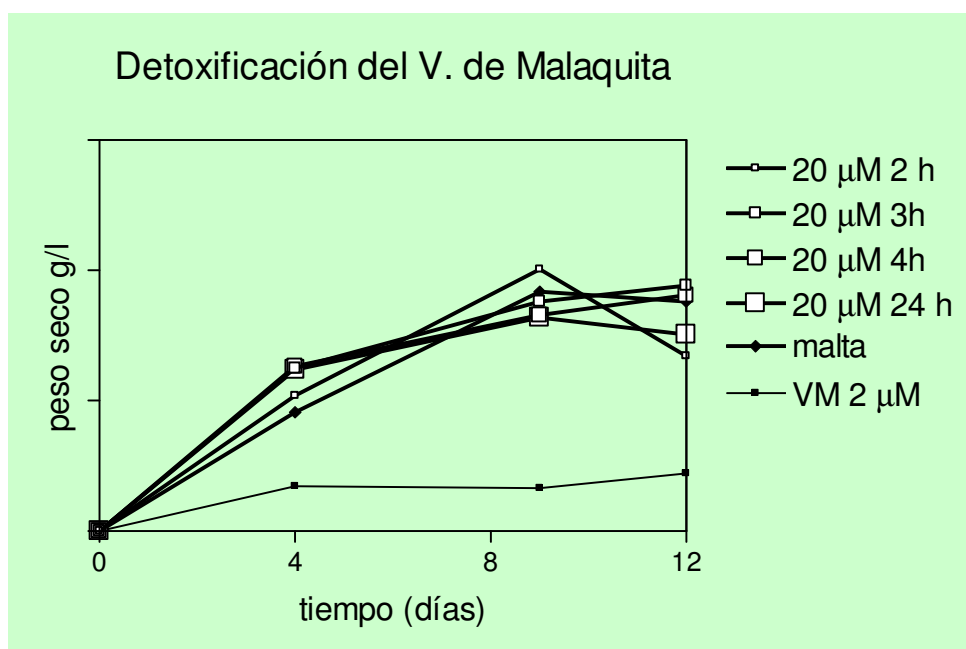
#### **4.4. Decoloración y detoxificación de VM, un fungicida**

Porciones de S+H (soja) de 13 días, condición óptima, se suspendieron en un solución de VM con una relación 30 gramos de peso fresco en 500 ml de solución de colorante. Se realizaron dos estudios: a) secuencial: solución inicial 10  $\mu$ M, 24 horas de contacto, llevado nuevamente a 10  $\mu$ M, 24 horas de contacto; b) 20  $\mu$ M en forma inicial, se tomaron muestras a 2, 3, 4 y 24 horas de contacto entre el S+H y el VM (tabla 11).

Con las soluciones decoloradas se realizaron estudios de toxicidad. El grado de detoxificación se estableció con *Phanerochaete chrysosporium*, un Basidiomycete sensible al VM (Papinutti y Forchiassin, 2004). La cepa se cultivó en medio malta líquido con VM en concentraciones 0, 2, 4, 8 y 16  $\mu$ M como control del nivel de resistencia de *P. chrysosporium* al colorante. En forma paralela se cultiva el hongo en las soluciones decoloradas suplementadas con glucosa y extracto de malta. Los resultados (figura 30 y tabla 11) muestran la total detoxificación. El proceso es altamente eficiente, 2 horas de contacto entre el sistema S+H y la solución de VM 20  $\mu$ M son suficientes para la detoxificación. *P. chrysosporium* crece en todas las soluciones decoloradas con la misma cinética que en el medio testigo sin colorante (concentración 0 de VM). Se registró un leve crecimiento fúngico cuando el medio contiene un máximo de 2  $\mu$ M del colorante, en concentraciones mayores de VM no hubo crecimiento.

**Tabla 11:** Decoloración y de detoxificación de VM a diferentes tiempos.

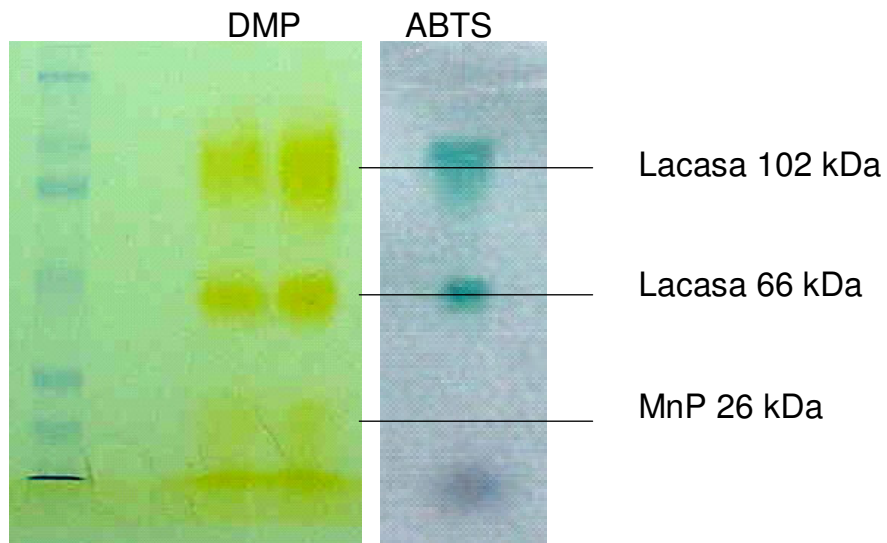
| V de Malaquita<br>( $\mu\text{M}$ ) | T de contacto<br>(h) | Decoloración<br>(%) | Toxicidad<br>(%) |
|-------------------------------------|----------------------|---------------------|------------------|
| 10 + 10                             | 24 + 24              | 96                  | 0                |
| 20                                  | 2                    | 66                  | 0                |
| 20                                  | 3                    | 80                  | 0                |
| 20                                  | 4                    | 86                  | 0                |
| 20                                  | 24                   | 96                  | 0                |



**Figura 30:** La curva inferior ( $\blacksquare$ ) muestra la inhibición que ejerce el VM sobre el crecimiento de *P. chrysosporium*. La curva con símbolo  $\blacklozenge$  muestra el crecimiento estándar para esta cepa en medio MG líquido. Las demás curvas con símbolos  $\square$  muestran el crecimiento de la cepa sensible al VM en las soluciones de VM decoloradas durante diferentes tiempos.

## 4.5. Estudios Electroforéticos

Los sobrenadantes de los cultivos en medio líquido y los extractos acuosos de los cultivos en SSF fueron analizados mediante técnicas de electroforesis. El análisis electroforético realizado en gel de poliacrilamida conteniendo SDS evidenció dos isoenzimas de lacasa y una de MnP (figura 31). Las dos técnicas utilizadas para revelar ligninasas, ABTS y DMP, nos permiten inferir que las bandas de PM 102 y 66 kDa corresponden a dos isoformas de lacasa. El revelado con DMP marca rápidamente la presencia de lacasa y es coincidente con lo revelado por el ABTS. La banda de PM 26 kDa correspondiente a MnP, se aprecia transcurridos 30 minutos de revelado con DMP. Los geles incubados “tras noche” presentan bandas constituidas por un precipitado marrón rojizo. Las bandas de lacasa tienen una tonalidad amarillo más fuerte que a la banda de MnP; estas bandas cambian si se incuba el gel tras noche a 5°C, las correspondientes a lacasa son marrones y la correspondiente a MnP son rojizas.



**Figura 31:** Gel revelado con DMP y ABTS donde se identifican dos isoenzimas de lacasa de 102 y 66 kDa y una MnP de 26 kDa.

#### **4.5.1. Electroforesis y decoloración.**

Las técnicas combinadas de electroforesis y decoloración permiten establecer el rol de cada enzima lignolítica en la degradación de colorantes.

El presente trabajo muestra claramente que la lacasa y la MnP producidas por *Stereum hirsutum* tienen actividad decolorante y que estas acciones decolorantes son diferentes para cada enzima y entre ambas isoenzimas de lacasa.

##### **4.5.1.1. Acción decolorante de la lacasa**

La discrepancia entre los máximos de decoloración y los máximos de enzimas lignolíticas llevó a valorar el poder decolorante de las enzimas individualmente. Se realizó un ensayo combinado de electroforesis y decoloración. Los geles fueron fijados y sumergidos por 10 minutos en soluciones de IC o VM en buffer acetato pH 3,6.

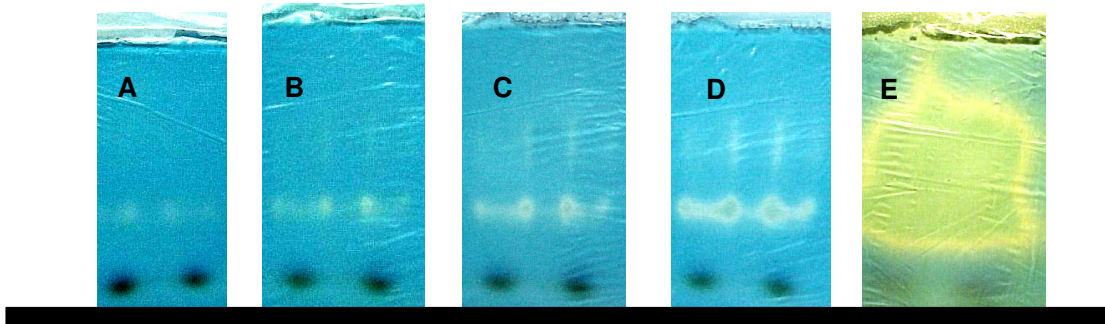
En los geles teñidos con IC o VM no se observa inicialmente decoloración. Con el agregado de mediadores de lacasa, el desarrollo de la decoloración es inmediato en el gel teñido con IC y este continúa durante las siguientes horas ampliando la zona sin color (figura 32). Los geles teñidos con VM se decoloran transcurridas tres horas y continúa por las 24 horas siguientes (figura 33).

El comportamiento de ambas isoenzimas es diferente frente a los dos colorantes y a la interacción con el mediador. El gel teñido con IC presentó en primera instancia la aparición de las bandas sin color (figura 32 A, B), luego, en coincidencia con la zona decolorada se observa la aparición del color verde que adquiere el ABTS por oxidación (figura 32 C, D y E).

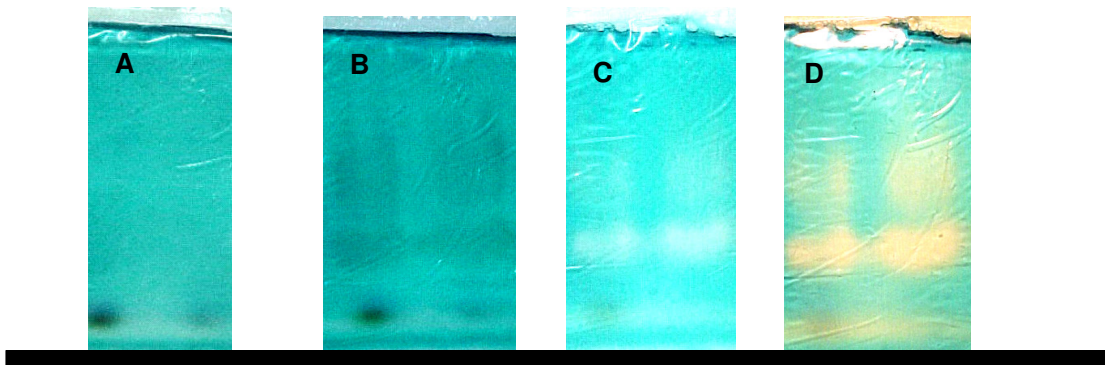
Cuando el gel fue teñido con VM, en primera instancia se observa un oscurecimiento por la transformación del ABTS (figura 33 B) y luego la pérdida de color en ambas bandas de las isoenzimas (figura 33 C y D).

La utilización del ABTS como mediador permite visualizar la decoloración y verificar simultáneamente el rol decolorante de la lacasa, dado que, el ABTS actúa como mediador y como detector de la presencia de esta enzima (figura 32 y 33).

El HBT como mediador tiene una acción leve en el gel teñido con IC (figura 32 A). No se observó decoloración en los geles teñidos con VM y con HBT como mediador.



**Figura 32:** Secuencia de decoloración durante 24 horas en geles teñidos con solución de IC 0.3 mM en buffer acetato pH 3,6. (A) Agregado de HBT 8 mM, incubación 5 minutos. (B, C, D, E) agregado de ABTS 0.5 mM. Tiempos de incubación: B 5', C 15', D 30' y E 24 horas.



**Figura 33:** Secuencia de decoloración durante 24 horas en geles teñidos con solución de VM 0.1 mM en buffer acetato pH 3,6 con agregado de ABTS 0.5 mM. Las imágenes corresponden a diferentes tiempos de incubación: A 5', B 15', C 3 h y D 24 horas.

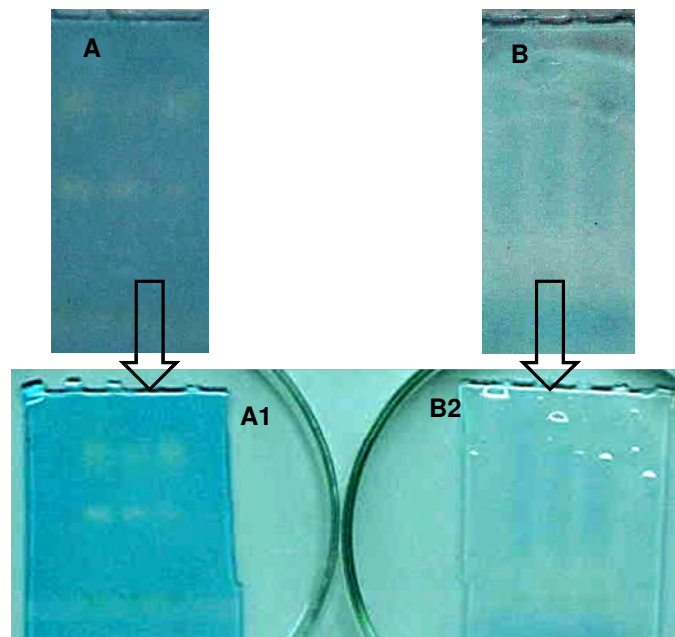
#### 4.5.1.2. Acción decolorante de la MnP

Los gels fueron fijados y sumergidos por 10 minutos en soluciones de IC en buffer succinato pH 4,5 con la adición de manganeso.

La decoloración se inicia con el agregado de  $H_2O_2$ . Este inicio de la decoloración se produce en el área correspondiente a la banda de 26 kDa. Esta decoloración es mucho más rápida y expansiva que la de la lacasa. No se limita al área de la banda y desde el origen se extiende hacia el resto del gel.

En la figura 34 se puede observar en forma paralela un gel teñido con solución de IC en buffer acetato pH 3,6 con ABTS (figura 34 A) y un gel teñido con solución de IC en buffer succinato pH 4,5 con la adición de manganeso y con  $H_2O_2$  (figura 34 B).

El área de decoloración por acción de la lacasa se limita a las bandas de 102 y 66 kDa (figura 34 A), la decoloración por acción de la MnP se inicia en la banda de 26 kDa, inmediatamente se extiende en forma lateral (figura 34 B).

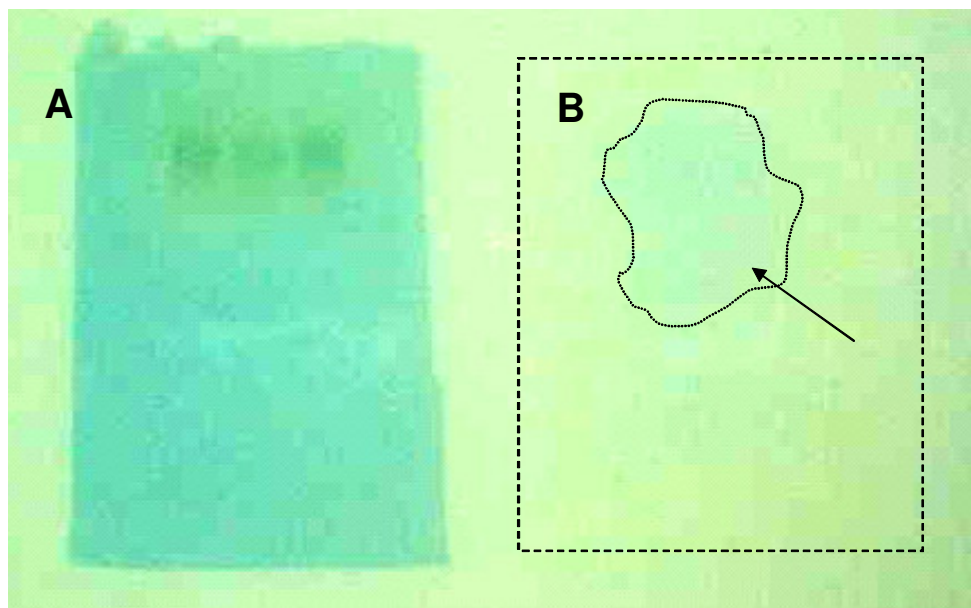


**Figura 34:** Secuencia de decoloración en gels teñidos con IC: **A** y **A1** en buffer acetato a pH 3,6 y mediador ABTS; **B** y **B1** en buffer succinato a pH 4,5 y  $H_2O_2$ .

En el gel A continúa la decoloración durante la incubación, pero siempre en forma restringida al área de las bandas (figura 34 A1). Por el contrario, en el gel B, la acción decolorante se expande por casi todo el gel (figura 34 B1).

Estos mismos geles fueron reteñidos y en ambos casos se inició un segundo ciclo de decoloración sin el agregado de mediadores o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

La isoenzima de lacasa de 66 kDa no produjo decoloración ni reacción con ABTS, si se produjo decoloración en la banda correspondiente a 102 kDa (figura 35 A). La degradación del IC por acción de la MnP fue otra vez expansiva y de amplia acción transcurridas las 24 horas de decoloración (figura 35 B).



**Figura 35:** Decoloración de geles de geles por acción de Lacasa y MnP. Segundo ciclo: **(A)** Gel reteñido con solución de IC en buffer acetato pH 3,6, 24 horas de incubación, se nota la acción decolorante da la isoenzima con peso molecular 102 kDa en este segundo ciclo. **(B)** Gel reteñido con solución de IC en buffer succinato a pH 4,5, 24 horas de incubación, se denota con línea punteada el borde del gel y en su interior el resto de zona no decolorada (flecha) que es coincidente con el área decolorada por la lacasa.

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Cultivos en medio líquido

#### 5.1.1. Optimización del medio de cultivo y de la producción de ligninasas

*Stereum hirsutum* es un Basidiomicete que pertenece al grupo causante de la pudrición blanca de la madera. Las posibilidades de utilizar estos hongos filamentosos en procesos de biorremediación son muchas. Los estudios actuales se vuelcan a la proliferación de las cepas en diferentes medios y sustratos con el objetivo de lograr un buen desarrollo y una abultada producción y actividad de enzimas. Un requerimiento básico en estos procesos es que la proliferación del hongo no tenga consecuencias secundarias para el medio ambiente, que no sea peor el remedio que la enfermedad; además es importante que la producción sea a bajo costo dado los volúmenes que se requieren para resolver problemas originados por residuos industriales.

Los estudios realizados en este trabajo permiten describir a *S. hirsutum* como un productor mediano de Lacasa, buen productor de MnP, resistente a condiciones extremas y con respuestas positivas en cuanto a producción de exoenzimas en condiciones de estrés, situación común en los tratamientos de efluentes industriales donde a los compuestos recalcitrantes se les suma pH extremos, temperaturas variadas, presencia de metales pesados y alteraciones en el  $\psi_a$ .

Petr Baldrian (2006) hace una importante revisión sobre las lacasas producidas por hongos y sus propiedades. Si bien se ha detectado lacasa en diversos hongos se considera que hay “grupos fisiológicos” productores de lacasa constituidos por los Basidiomycetes causantes de la pudrición blanca de la madera y los pequeños descomponedores, hongos saprofitos degradadores de lignina.

Casi todas las especies de hongos causantes de la pudrición blanca fueron reportados como productores de lacasa en diferentes grados (Hatakka, 2001). La mayor parte de la actividad de esta enzima es extracelular aunque hay reportes en *Agaricus bisporus*, *Phanerochaete chrysosporium* y *Siullus granulatus* que presentan actividad lacasa intra y extracelular y *Pleurotus*



*ostreatus*, es probable que presente una isoenzima de lacasa intracelular o incluida en la pared celular; la actividad lacasa esta asociada exclusivamente con la pared celular en el basidiomicete de la pudrición blanca *Irpex lacteus* (Svobodová, 2005).

*S. hirsutum*, produce dos isoenzimas de lacasa extracelulares de aproximadamente 66 y 102 kDa. El medio de cultivo GA, con glucosa como fuente de carbono y asparagina como fuente de nitrógeno, es un buen medio para la producción la enzima, no se ve inhibida por incremento en la fuente de nitrógeno en el medio. El análisis de la influencia de la concentración en la fuente de carbono fue el punto inicial del presente trabajo y complementario de Godio et al. (2000).

En las condiciones estándar establecidas (15 g de glucosa por litro de medio GA y pH inicial 5.12) la producción de lacasa es de valores cercanos a 1 UE/ml al igual que cuando el cultivo se desarrolla con 20 g de glucosa por litro. Razón por la cual se continuó realizando cultivos con 15 g de glucosa por litro.

Los valores de actividad lacasa en los medios basales citados en bibliografía son variados, *Coriolopsis rigida* 0,1 UE/ml a los 24 días de cultivo (Saparrat et al. 2002), *Trametes trogii* en medio GA produce 4 UE/ml a los 27 días de cultivo (Levin et al. 2002), el Ascomycete *Botryosphaeria* sp. produce en forma constitutiva 0,05 a 0,08 UE/ml (Dekker y Barbosa, 2001), *Thelephora terrestres*, un hongo ectomicorrícico, cuando crece en medio líquido mínimo produce 0.45 UE/ml (Kanunfre y Zancan, 1998).

La MnP está presente en un gran número de hongos de la pudrición blanca de la madera y una cepa produce aproximadamente entre la décima y la centésima parte de MnP que de Lacasa. Casos extremos son: *Fomes sclerodermeus*, un productor de lacasa, no se detecta MnP cuando se lo cultiva en medio con glucosa, peptona y extracto de levadura sin inductores (Papinutti y Martínez, 2006) y *Pleurotus ostreatus*, que en medios semisintéticos sin peptona produce 0,74 UE/ml de MnP y no se detecta lacasa (Kamitsuji et al., 2004) . *Irpex lacteus* produce en cultivos estacionarios 0.72 UE/ml (Novotny et al., 2004). *Panus trigrinus* en SmF con aireación produce 4,3 UE/ml de lacasa y 0,4 UE/ml de MnP (Fenice et al., 2003).

*S. hirsutum*, en medio basal (GA), produce 0,9 UE/ml de lacasa y 0,08 UE/ml de MnP.

Es posible estimular o inducir la producción de ligninasas con técnicas variadas. Los avances en esta materia han sido revisados por Ikehata et al. (2004). Modificaciones en las condiciones de cultivo, el uso de inductores, el uso de sustratos de bajo costo para el desarrollo del micelio como los residuos agroindustriales e investigaciones en nuevas cepas de hongos conducen a incrementar la producción de estas exoenzimas con posibilidad de uso a nivel industrial.

#### **5.1.1.1. Inductores**

##### **5.1.1.1.1. Metales pesados**

Los hongos requieren trazas de metales pesados como cobre, hierro, manganeso, zinc para su crecimiento. El manganeso además de sus funciones como micronutriente participa directamente en el ciclo de la degradación de la lignina por acción de la MnP y el cobre forma parte de los sitios activos de la lacasa. Estos metales pueden estar en exceso, en concentraciones tóxicas que causan alteraciones en la morfología, la fisiología y afectan la reproducción. Metales como el mercurio, el cobre o el níquel han sido desarrollados a nivel industrial como antifúngicos para preservar la madera.

Los hongos de la pudrición blanca tienen una particular resistencia a los metales pesados en concentraciones normalmente tóxicas. No es la situación natural de la madera, pero la concentración en el suelo puede ser entre 10 y 100 veces mayor que la madera. Estos niveles se incrementan por la polución industrial (cercañas a las vías del ferrocarril, plantas de incineración, destilerías), produciéndose contaminación por metales pesados que generalmente ocurre en forma conjunta con polución por aromáticos policíclicos (Baldrian, 2003).

Este grupo fisiológico de hongos filamentosos puede tomar los metales pesados del entorno y concentrarlos en su micelio con estrategias variadas. La capacidad de tolerar y retener metales pesados constituye una posibilidad más de utilizar estos hongos en procesos de biorremediación en forma exitosa.

Los metales pesados incorporados al medio de cultivo basal son tolerados por *S. hirsutum*, cromo, cobre, hierro, zinc, calcio y manganeso en concentraciones 250  $\mu\text{M}$ , no afectan el crecimiento del micelio y producen incrementos en la actividad de lacasa, MnP y GLOX, una enzima generadora del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sustrato de la MnP. El cromo, un residuo de la industria del cuero, es altamente tóxico, la cepa en estudio no presentó disminución del crecimiento con cromo 250  $\mu\text{M}$  y la producción de enzimas lignolíticas fue superior al medio basal. Los cultivos desarrollados con zinc y con hierro presentaron un ligero incremento en la actividad lacasa y MnP y aproximadamente duplicaron la actividad GLOX. El zinc decrece la actividad lacasa en *Pleurotus ostreatus* y no afecta la producción de esta enzima en *Pleurotus sajor-caju* (Soden y Dobson, 2001). Para *Phanerochaete chrysosporium*, bajas concentraciones de zinc (18  $\mu\text{M}$ ) incrementan la actividad LiP y MnP (Singhal y Rathore, 2001).

El agregado de cobre 125  $\mu\text{M}$  a los cultivos de *S. hirsutum* incrementa la actividad de lacasa 7 veces y la actividad de MnP aumenta aproximadamente 10 veces con cobre 500  $\mu\text{M}$ . Los ensayos con manganeso también fueron exitosos, la actividad de la lacasa se incrementó 5 veces con manganeso 1mM y la actividad de la MnP incrementó 1,5 veces el valor registrado en el medio basal. Estos resultados se correspondieron con los esperados, Galhaup et al. (2002) obtienen una producción de 330 UE/ml de lacasa con *Trametes pubescens* en medio semisintético con el agregado de cobre 2 mM. La adición de cobre (1 mM) o de cadmio (2 mM) en cultivos de *Pleurotus ostreatus* de 12 días (Baldrian y Gabriel, 2002) incrementa la actividad lacasa 9 y 5 veces respectivamente. La particularidad de *S. hirsutum* es el incremento de ambas enzimas ligninolíticas en presencia de cobre y manganeso. El manganeso tiene una fuerte ingerencia en la actividad de MnP de *Fomes sclerodermeus*, pero el cobre tiene un efecto negativo sobre esta enzima (Papinutti y Forchiassin, 2003). Cultivos de *Clitocybula dusenii* y de la cepa i63 (Scheel et al., 2000) presentaron inducción de actividad lacasa y MnP con el agregado al medio de  $\text{Mn}^{+2}$  133  $\mu\text{M}$ .

Los cultivos presentaron diferente comportamiento cuando los cultivos se desarrollaron desde tiempo cero con los metales pesados o cuando estos se incorporaron a cultivos con un buen desarrollo (7 días para *S. hirsutum*). La tolerancia a concentraciones elevadas de cobre y manganeso es mayor, 2 mM.

La actividad de las enzimas lacasa y MnP presentaron variaciones con la edad de los cultivos. Los máximos de actividad lacasa se registraron en cultivos de 36 días con cobre 1 mM y en cultivos de 28 días con manganeso 0,5 mM. Los máximos de actividad MnP se observaron con cobre 1mM a los 36 días de cultivo. Estos datos difieren con los de Bladrian y Gabriel (2002) para *Pleurotus ostreatus*, la concentración de cobre óptima resultó 1 mM independientemente del día de cultivo cuando la cepa se desarrolla en salvado de trigo con adición de cobre. Esta experiencia permitió corroborar que en diferentes condiciones de cultivo, los máximos de actividad de MnP no coinciden con los máximos de biomasa, las cepas *Dichomitus squalens*, *Irpex flavus* y *Polyporus sanguineus* (Gill y Arora, 2003) presentaron el mismo fenómeno.

Los cultivos realizados para evaluar la interacción entre el pH inicial del cultivo y la concentración de cobre arrojaron importantes resultados. Son pocos los reportes sobre el pH inicial del cultivo como factor regulador de la producción de ligninasas (Gill y Arora, 2003). En este trabajo se observó un efecto individual muy marcado del pH y además del efecto de la interacción del pH con la concentración de cobre en el medio, se mostró que la regulación del pH inicial del medio es muy importante no solo por el factor *per se* sino por posibles interacciones con otros compuestos

#### **5.1.1.1.2. Compuestos aromáticos**

Los compuestos aromáticos que están relacionados estructuralmente con la lignina juegan un papel importante en el incremento de ligninasas en los hongos filamentosos causantes de la pudrición blanca de la madera. Uno de los primeros trabajos que determina la relación entre la estructura química de estos compuestos y la capacidad de inducción de ligninasas lo desarrollaron Shuttleworth et al. (1986). Se han publicado muchos trabajos que relacionan el incremento de las ligninasas en respuesta a aromáticos recalcitrantes para diferentes especies de hongos y también el efecto sobre determinada isoenzima de algunas especies (Terrón et al., 2004).

La mayor parte de los trabajos publicados sobre el tema investigan la efectividad de determinados compuestos aromáticos sobre la inducción de las lacasas (Soden y Dobson, 2001, Lo et al., 2001, Dekker et al., 2002).

Scheel et al. (2000) establecieron para *Clitocybula duseinii* b11, *Nematoloma frowardii* b19 y para la cepa i63-2 el  $Mn^{2+}$  y el veratril alcohol como verdaderos inductores a nivel transcripcional de la MnP y Maeda et al. (2001) demostraron que la 2,5 xilidina modula la expresión del de la MnP en *Elfvigia applanata* ). En *Polyporus sanguineus* la producción de MnP se incrementa 12 veces suplementando con guayacol el medio basal o el medio con extracto de malta, en estos mismos medios, el veratril alcohol suprime la producción de la enzima (Gill y Arora, 2003).

*S. hirsutum* presentó diferente comportamiento en la inducción de la enzimas lignolíticas según los métodos utilizados. Cuando se suplementó con compuestos aromáticos a tiempo cero no se detectó en general incrementos importantes en la actividad de las enzimas. Se observó una inhibición de todas las ligninasas por la cumarina, sin producirse una reducción en el crecimiento. La actividad como inductores de los aromáticos es importante cuando se hacen los cultivos por sustitución. El micelio de 8 días de cultivo fue resistente a concentraciones más altas de inductores y se obtuvieron máximas actividades para MnP con ac. siríngico y ac. ferúlico 1 mM. La actividad lacasa se vio inducida por el ac. siríngico, ac. ferúlico y vainillina 1 mM.

Los resultados obtenidos con el uso de compuestos aromáticos estructuralmente relacionados con la lignina como inductores no justifican su utilización para la producción de ligninasas a nivel industrial con la cepa en estudio. Pero estos resultados, al igual que los obtenidos en los cultivos con metales pesados, son indicativos de la capacidad de la cepa de coexistir con xenobióticos de estructura y origen diverso.

#### **5.1.1. 2.Estrés**

Se sabe que estos organismos son capaces de producir lacasa bajo situaciones de estrés provocadas por condiciones ambientales y en presencia de algunos componentes potencialmente inductores (Gnanamani et al., 2006) y que la transcripción de los genes de MnP es influenciada por estrés originado por compuestos químicos (Maeda et al., 2001).

Los metales pesados, inducen la síntesis de ligninasas y producen, en muchos casos, una reducción del crecimiento del micelio y cambios en su

morfología como incremento en la ramificación de las hifas y cambios en el color del micelio (Baldrian, 2003).

No siempre una reducción del crecimiento coincide con un máximo de producción de ligninasas, ensayos realizados con *Trametes pubescens* (Galhaup et al., 2002) con compuestos aromáticos mostraron una inhibición en la producción de lacasa cuando el inductor era el ácido vainillico acompañado de una reducción del crecimiento. En *Trametes trogii*, el cobre en concentraciones superiores a 1 mM producen una reducción en el crecimiento del hongo acompañado de una disminución de la actividad MnP sin afectar la actividad lacasa (Levin et al., 2002).

Las diversas condiciones de cultivo que se utilizan con este grupo de hongos filamentosos tendiente a producir una mayor cantidad de enzimas lignolíticas, como proyecto de una escala industrial, se alejan del medio natural de los hongos y en muchos casos son extremas, situaciones de estrés.

El micelio de diferentes cepas sometido a situaciones de estrés puede responder en forma positiva. La cepa en estudio, *S. hirsutum*, respondió a situaciones extremas como temperatura, pH, metales pesados y combinaciones de ellas incrementando la actividad de ligninasas.

Se observó máxima actividad para lacasa en diferentes condiciones extremas (16 °C-pH 6,4 y 28 °C-pH 10). La MnP presentó un máximo dentro de condiciones estándar de cultivo (28 °C y pH 5), los otros tratamientos presentaron una disminución leve en la actividad de la MnP. Esta cepa sometida a diferentes condiciones de temperatura y pH presentó actividad de ambas enzimas en igual o mayor proporción que las condiciones estándar de cultivo.

En todas las experiencias se observó una amortiguación del pH extremo al que se inician los cultivos hacia un pH cercano a la neutralidad en la fase estacionaria del crecimiento.

Durante el desarrollo de los cultivos de *S. hirsutum* en SmF se observó en forma constante que el micelio sometido a condiciones extremas presenta pigmentación en tonos de marrón y que el medio de cultivo se torna ambar claro en forma coincidente con la detección de actividad de enzimas lignolíticas.

El crecimiento de esta cepa en condiciones extremas, como panorama general, muestra resistencia a temperaturas, metales pesados, sustancias

aromáticas, pH ácidos y alcalinos. En todas las situaciones se desarrolló relativamente bien, con producción de ligninasas y amortiguación del pH. *S. hirsutum* debe ser una cepa a considerar en las primeras etapas de un tratamiento de biorremediación, dado que cubre los requerimientos planteados por Baldrian y Gabriel (2002).

### **5.1.1.3. Melanización del micelio**

Son muchos los reportes de hongos melanizados. Los trabajos corresponden a muy diferentes líneas de investigación: en patógenos como *Wangiella dermatitidis* y *Alternaria alternata* (Jacobson et al., 1995) en este trabajo se establece la función antioxidante de la melanina; los halófitos *Hortaea werneckii*, *Phaeothea triangularis* y el halotolerante *Aureobasidium pullulans* (Turk et al., 2004) presentan melanina; *Atriplex canescens*, un endofito que presenta hifas melanizadas en los microesclerocios que le permiten superar situaciones de estrés (Barrow y Aaltonen, 2001); *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* y var. *graminis* presenta melanización del micelio bajo condiciones de estrés osmótico con ClK o sacarosa (Elliott y Henson, 2001). Hongos melanizados, *Hortaea werneckii*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Cladosporium* sp., and *Aureobasidium pullulans*, fueron descritos en agua hipersalinas (Méjanelle et al., 2001). Gómez y Nosanchuk (2003) hicieron una revisión sobre los hongos patógenos en humanos y la resistencia de estos patógenos a los antifúngicos en forma paralela con el incremento de melanina en la pared de las células fúngicas. da Silva et al. (2006) establecen relaciones similares para el patógeno *Paracoccidioides brasiliensis*. *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides*, *Mucor hiemalis* y *Paecilomyces lilacinus* son hongos aislados en la zona de exclusión de Chernobyl, presentan melanina en sus hifas y son tolerantes al  $\text{H}_2\text{O}_2$   $10^{-1}$  M (Ivanova et al., 2005).

Si bien en este trabajo no se hizo determinaciones de melanina, en los cultivos realizados en medio líquido en condiciones extremas, metales pesados, aromáticos, pH, temperatura, se observó en el micelio en mayor o menor grado

una tonalidad castaño oscuro. Se puede inferir la síntesis de melanina en respuesta a situaciones de estrés y será tema de próximas investigaciones.

## 5.2. Cultivos en medio sólido

Los cultivos en fermentación en sustrato sólido (SSF) resultaron adecuados para *S. hirsutum*.

En un frasco erlenmeyer de 100 ml con 15 ml de medio GA se producen 13,5 UE de lacasa y 1,2 UE de MnP, en un frasco erlenmeyer de 100 ml con 4 gramos de cascarilla de soja con 75 % de humedad se producen 2000 UE de lacasa y 201 UE de MnP.

Los parámetros utilizados para evaluar el metabolismo del hongo, proteínas solubles, contenido de quitina, proteínas de micelio y pérdida de peso seco presentaron diferencias leves entre los tres medios de cultivo utilizados. Los cultivos desarrollados en cascarilla de soja presentaron mayor biomasa estimada como quitina y como proteínas de micelio. La biomasa de la mezcla S+T 1:1 fue intermedia entre la biomasa producida en cada uno de los sustratos sólidos por separado. Los máximos de proteínas solubles coincidieron con los máximos de biomasa y no presentaron diferencias entre los tres sustratos durante la trofofase, durante el desarrollo de la fase estacionaria se observaron diferencias de poca relevancia.

Los niveles de enzimas variaron mucho según el sustrato utilizado y alcanzaron valores máximos entre los días 35 y 42 de cultivo. Los cultivos crecidos en cascarilla de soja produjeron 2,5 veces más lacasa que los cultivos de S+T 1:1 y 4 veces más MnP que los cultivos en S+T 1:1 y que en T.

Tanto la producción de lacasa como de MnP no alcanzaron valores intermedios en la mezcla de ambos sustratos a modo de media.

Estos datos son importantes para formular un medio de cultivo que permita la máxima producción de enzimas pero no son concluyentes cuando se define una estrategia de biorremediación, los cultivos en SSF activos como decolorante fueron los más jóvenes, 13 y 17 días de crecimiento. En este punto no hay diferencias importantes en la producción de las enzimas lignolíticas. La



única diferencia importante que se observó fue en la producción de GLOX, con un máximo en los cultivos de 17 días en S+T, triplicando lo producido en T solo.

La máxima producción de enzimas cuando el sustrato sólido es cáscarilla de soja es coincidente con la producción de *Fomes sclerodermeus* en el mismo sustrato en comparación con la mezcla 1:1 S+T (Papinutti y Forchiassin, 2007). Una posible explicación a este comportamiento diferencial respecto a la producción de enzimas en ambos sustratos puede ser la disponibilidad de componentes lignocelulósicos en mayor proporción o con mayor disponibilidad. La respuesta de *S. hirsutum* a los compuestos aromáticos como inductores es relativamente baja, por lo tanto, otra posible explicación es una mayor proporción y/o una mayor solubilidad de los hidratos de carbono en el salvado de trigo puede ejercer una represión sobre la producción de ligninasas. Una de las ventajas de la SSF es la resistencia a la represión catabólica, pero depende de cuál es el sustrato sólido y de cómo se establece un gradiente de azúcar en el microambiente que se crea entre las hifas del hongo y las partículas del sustrato (Viniestra-Gonzalez y Favela-Torres, 2006). Los niveles de ambas enzimas lignolíticas, lacasa y MnP se incrementan en SSF a partir del día 21 de cultivo en forma coincidente con un importante descenso del peso fresco del sistema. La deshidratación del sistema produce estrés por ausencia de agua disponible y por descenso del  $\Psi_a$ , *S. hirsutum* produce en SSF enzimas lignolíticas también en situaciones extremas.

### **5.3. Degradación de colorantes**

En 1856 William Henry Perkin descubrió accidentalmente el primer colorante sintético de uso comercial, un derivado del alquitrán, la mauveína. Hacia fines del siglo XIX la industria de los colorantes sintéticos estaba en pleno desarrollo. Los colorantes se utilizan en varias industrias como las imprentas, las fábricas de pinturas entre otras, pero la industria que consume mayor cantidad de colorantes es la industria textil.

Todos los colorantes industriales se diseñan para que sean resistentes a la transpiración, a los lavados, a la luz y a muchos compuestos químicos incluyendo los agentes oxidantes. La última fase de la producción de telas

coloreadas es el lavado para eliminar los excedentes de tintura consumiendo grandes cantidades de agua y volcando al medio ambiente una importante proporción de estos pigmentos (Wesenberg et al., 2003). Se estima que aproximadamente 280.000 toneladas de colorantes textiles son descargados por año al medio ambiente como efluentes industriales en el mundo (Maas y Chaudhari, 2005).

Los efluentes de la industria textil son tratados por medios convencionales. Las plantas de tratamiento utilizan métodos físicos, biológicos y químicos (Pala y Toket, 2002; Zhang et al., 2003), pero no son suficientes para cubrir los requerimientos de esta industria. Los colorantes residuales son volcados en los cursos de agua y producen además de contaminación visual, un importante impacto por consumo de oxígeno en los cuerpos de agua, la reducción de la tasa fotosintética por la no penetración de la luz en las capas superficiales de agua y la acción tóxica, mutagénica y cancerígena que tienen muchos colorantes (Michaels y Lewis, 1985; Chung et al., 1992).

Estos componentes requieren de un alto poder oxidativo para que se modifique su estructura. Son pocos los microorganismos, bacterias y hongos, que pueden combatir esta contaminación, dentro de estos, los hongos de la pudrición blanca son el grupo fisiológico por excelencia para degradar los colorantes sintéticos. Esta propiedad está basada en que producen una o más enzimas extracelulares lignolíticas (Martínez et al., 2005), que gracias a su falta de especificidad por el sustrato son capaces de degradar un gran número de xenobióticos.

Los ensayos realizados en este trabajo mostraron que *S. hirsutum* es una cepa que puede utilizarse en la degradación de colorantes. Se ensayaron colorantes de tres grupos: indigoide (IC), azoico (X) y trifenilmetano (VM) y en todos los casos se obtuvo una importante degradación del colorante en períodos cortos (40 a 120 minutos) y con poca masa de micelio (2 gramos de peso fresco del sistema S+H).

*S. hirsutum* mostró una gran capacidad para aprovechar sustratos naturales como soporte para su crecimiento denso y profuso. La posibilidad simultánea de crecer sobre el soporte nutritivo y degradar compuestos recalcitrantes permitiría alcanzar la mineralización completa de estos últimos. *S.*

*hirsutum* se nutre del sustrato sin la necesidad de realimentación para mantener sus propiedades detoxificantes como ocurre en *Trametes versicolor* que necesita el agregado de glucosa (Shin et al., 2002). Tampoco requiere del agregado de mediadores de la actividad lacasa (Fabbrini et al., 2002, Pozdnyakova et al., 2004), los intermediarios para las reacciones de oxidación serían suministrados por el metabolismo del hongo. Camarero *et al.* (2005) determinaron que fenoles producidos por la degradación natural de la lignina, podrían actuar como intermediarios en la oxidación de colorantes.

Los parámetros evaluados en este trabajo permitieron considerar que la acción del hongo sobre los compuestos recalcitrantes no coincide con los máximos de actividad de las enzimas lignolíticas determinados. Posiblemente, durante los primeros días de cultivo, la cepa tenga una actividad más agresiva para degradar el sustrato y establecerse. La mayor actividad fisiológica produciría la presencia de mediadores e intermediarios internos o la potenciación de las ligninasas. Un posible mediador interno en la cadena de oxidación es la citocromo P450 monoxigenasa. El rol de la citocromo P450 monoxigenasa en la degradación de xenobióticos ha sido citada, y su inhibición frenó procesos de oxidación de xenobióticos en *Phlebia lindtneri* (Mori y Kondo, 2002). El sistema S + H mostró una alta eficiencia. 4 gramos de sustrato seco, hidratado e inoculado produjeron 21 gramos de sistema S+H fresco con un total de 15 U de lacasa. Cuando establecimos las condiciones de detoxificación, se agregaron 30 g de sistema S+H fresco en 500 ml de solución de VM 20  $\mu$ M con una relación de 0,042 U/ml. En estas condiciones se produjo una detoxificación de 100% con dos horas de contacto. En general, en los reportes sobre actividad decolorante se encontraron concentraciones de enzimas mayores. Con extractos crudos de *Pleurotus ostreatus* se requirieron 30 U/ml de lacasa para obtener degradación (Hou et al., 2004). El proceso de decoloración llevado a cabo en un bioreactor de 2 litros con *Trametes versicolor* utilizó 1,5 U de lacasa por ml (Robinson et al., 2001).

El tiempo requerido para alcanzar la decoloración en nuestro sistema también es menor que los encontrados en otros casos. Ensayos de decoloración de RBBR con cultivos inmobilizados de *Irpex lacteus* en forma estacionaria requirieron de 2 días de contacto (Kasinath et al., 2003).

Es complejo establecer comparativamente cuál es el sistema óptimo para degradar colorantes a nivel industrial y qué cepa es más activa como decolorante. Los trabajos de laboratorio publicados no siguen un esquema similar de tratamiento, hay variaciones en la cepa utilizada, en el sistema de cultivo, en el tipo y concentración inicial del colorante y otros.

Verma y Madamwar (2005) hicieron estudios de decoloración con un Basidiomycete, cepa PV 002. En este trabajo ensayaron la degradación de colorantes azo y la influencia de variables como pH inicial, fuente de carbono y nitrógeno, temperatura y agitación. Observaron que hay una fuerte correlación entre la actividad lignolítica y la degradación de los colorantes, siendo las condiciones óptimas 26 °C y pH 7.

Asgher et al. (2006) comparan la actividad decolorante de cuatro cepas de hongos, *Phanerochaete chrysosporium*, *Coriolus versicolor*, *Ganoderma lucidum* y *Pleurotus ostreatus*. El colorante Drimarene Orange K-GL fue completamente decolorado (0.2 g/l después de 8 días) y la cepa más activa fue *Phanerochaete chrysosporium* seguida por *Pleurotus ostreatus*. *Phanerochaete chrysosporium* y *Coriolus versicolor* son activos degradadores de Remazol Brilliant Yellow 3GL, Procion BluePX-5R y Cibacron Blue P-3RGR. Los autores no hacen un estudio de producción de ligninasas, basan su trabajo en la optimización de la decoloración.

*Coriolus versicolor* mostró una gran capacidad para degradar y decolorar las aguas residuales de una planta productora de glutamato monosódico. Los autores (Jia et al., 2007) obtuvieron un óptimo de degradación y decoloración a pH 5 en 5 días de cultivo y un 10 % de aguas residuales. La actividad lacasa registrada en el pico de máxima degradación (5 días), fue de 0,256 UE/ml, muy baja. En nuestro laboratorio, *Coriolus versicolor* var. *antarticus* es la cepa de mayor actividad decolorante y pobre productora de enzimas lignolíticas.

Eichlerová et al., (2006) establecen que la agitación en los cultivos de *Ischnoderma resinsum* es inhibitoria de los procesos de decoloración de Orange G.

Las citas anteriores nos otorgan una visión de diversos autores sobre el tema hongos lignolíticos, producción de ligninasas y decoloración. Coinciden con la revisión hecha por Gianfreda y Rao (2004) en que estos microorganismos

son los más adecuados para degradar xenobióticos con estructura similar a la lignina, entre ellos los colorantes textiles sintéticos.

EL trabajo de revisión hecho por Baldrian (2006) centra la discusión en la producción de lacasa y sus propiedades, pero, si bien los reportes sobre degradación de tinturas industriales están correlacionados en muchos casos con la actividad de enzimas lignolíticas, no siempre coincide que la cepa con máxima producción de exoenzimas sea la más adecuada para la degradación de tal o cual colorante.

Rodriguez Couto y Toca-Herrera (2007) hacen una revisión en la que comparan la producción de lacasa en reactores de SmF y SSF, concluyen que uno de las desventajas del SSF es requerir el desarrollo de nuevos reactores o modificar la configuración de los existentes. Nos acerca a la idea que resolver el problema del tratamiento de aguas residuales de la industria textil requiere el trabajo conjunto de varias disciplinas experimentales y de ingeniería.

Las lacasas, por ser oxidasas que no requieren peróxido como intermediario, han sido más estudiadas que las peroxidasas que si lo requieren y además, en general, se encuentran en una proporción de 1 a 100 con respecto a las lacasas. Son pocos los trabajos que hacen hincapié en el rol de las peroxidasas como decolorantes (López et al., 2004).

#### **5.4. Electroforesis y decoloración**

En el presente trabajo los ensayos electroforéticos mostraron la participación de las enzimas lignolíticas, particularmente la lacasa, en el proceso de decoloración. La decoloración de los geles teñidos con IC y VM, coincidentes con la posición de la enzima detectada con ABTS es una prueba relevante. La decoloración de los geles fue óptima cuando se utilizó ABTS como mediador y no con HBT. Ünyayar et al. (2005) utilizaron un método similar en el cual los geles teñidos con Drimarene Blue X3LR fueron decolorados y luego sumergidos en una solución de guayacol para revelar la presencia de lacasa.

El procedimiento utilizado en esta investigación permitió un seguimiento de la acción decolorante de las dos isoenzimas de lacasa que produce *S.*

*hirsutum* y su diferente comportamiento frente a los colorantes IC y VM. La retención del gel permitió corroborar la actividad de estas enzimas y su grado de saturación dado que la banda de 102 kDa cumple con los dos ciclos de decoloración y no la banda de 66 kDa, esta última que preludia la acción decolorante aparentemente se satura antes que la izoenzima de 102kDa. Los extractos corridos en geles con el sistema SDS-PAGE, sin ningún tratamiento de renaturalización de proteínas, presentan decoloración.

Los últimos ensayos realizados permitieron inferir que tanto las lacasas como la MnP tienen acción decolorante, estas acciones son diferentes: las lacasas requieren ABTS como mediador y la MnP  $H_2O_2$ . La velocidad de reacción de ambas enzimas es diferente. La MnP presentó una acción rápida y expansiva, la lacasa una velocidad mucho menor y con actividad restringida al área de la banda, expandiéndose hacia los alrededores de la banda transcurridas las 24 horas.

Los reportes sobre identificación de la lacasa como decolorante mediante la utilización de técnicas electroforéticas se dan en simultáneo con esta comunicación (Erkurt et al., 2007; Murugesan et al., 2007; Mouso et al., 2007)

No se detectaron en la bibliografía reportes de la MnP como decolorante mediante técnicas electroforéticas.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

Ander P. (1994) The cellobiase-oxidizing enzyme CBQ and CBO as reacted to lignin and cellulose degradation - a review. *FEMS Microbiol. Rev.*; 13: 297-312.

Archibal FS. (1992) Lignin peroxidase activity is not important in biological bleaching and delignification of unbleached Kraft pulp by *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.*; 58: 3101-3109.

Asgher M, Shah SAH, Ali M, Legge RL. (2006) Decolorization of some reactive textile dyes by white rot fungi isolated in Pakistan. *World J. of Microbiol. Biotechnol.*; 22: 89-93.

Azcón-Bieto J, Talón M. (2001) *Fundamentos de fisiología vegetal*. Mc Graw-Hill / Interamericana. Madrid. España.

Baldrian P. (2003) Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme Microbiol. Technol.*; 32: 78-91.

Baldrian P. (2006) Fungal laccases-ocurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev.*; 30: 215-242.

Baldrian P., Gabriel J. (2002) Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiol. Lett.*; 1: 69-74.

Baldrian P, Gabriel J, Nereud F. (1996) Effect of cadmium on the ligninolytic activity of *Stereum hirsutum* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Folia Microbiol.*, 41: 363-367.

Barrow JR y Aaltonen RE. (2001) Evaluation of the internal colonization of *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. roots by dark septate fungi and the influence of host physiological activity. *Mycorrhiza*; 11: 199-205.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*; 72: 248-254.

Betts WB. (1991) *Biodegradation: Natural and Synthetic Materials*. Springer-Verlag, London.

Bollag JM and Leonowicz A. (1984) Comparative studies of extracellular fungal laccases. *Appl. Environ. Microbiol.*; 48: 849-854.

Bourbonnais R and Paice MG. (1990) Oxidation of nonphenolic substrates – an expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett.*; 267: 99-102.

- Call HP and Mücke I. (1997) History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym<sup>®</sup>-process). *J. Biotechnol.*; 53: 163-202.
- Camarero S, Ibarra D, Martínez MJ, Martínez AT. (2005) Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Appl. Environ. Microbiol.*; 71: 1775-1784.
- Chung KT, Stevens SE, Cerniglia CE. (1992) The reduction of azo dye by intestinal microflora. *Crit. Rev. Microbiol.*; 18: 175-190.
- Claus H. (2003) Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Arch. Microbiol.*; 179:145-150.
- Collins PJ and Dobson ADW. (1997) Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.*; 63: 3444-3450.
- Coulibaly L, Gourene G, Agathos SN. (2003). Utilization of fungi for biotreatment of raw wastewaters. *Afr. J. Biotechnol.*; 2: 620-630.
- Cowling EB y Kirk TK. (1976) Properties of cellulose and lignocellulosic materials as substrates for enzymatic conversion processes. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*; 6: 95-123.
- Cui F y Dolphin D. (1990) The role of manganese in model systems related to lignin biodegradation. *Holzforschung*; 44: 279-283.
- D'Annibale A, Ricci M, Leonardi V, Quarantino D, Mincione E, Petruccioli M. (2005) Degradation of Aromatic Hydrocarbons by White-Rot Fungi in a Historically Contaminated soil. *Biotechnol. Bioeng.*; 90: 723-731.
- da Silva MB, Marques AF, Nosanchuk JD, Casadevall A, Travassos LR, Tabora CP. (2006) Melanin in the dimorphic fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*: effects on phagocytosis, intracellular resistance and drug susceptibility. *Microbes Infect.*; 8: 197-205.
- del Río JC, Gutiérrez A, Martínez AT. (2004) Identifying acetylated lignin units in non-wood fibers using pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*; 18: 1181-1185.
- Dekker RF, Barbosa AM. (2001) The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria* sp. *Enzyme Microbiol. Technol.*; 28: 81-88.
- Dekker RF, Barbosa AM, Sargent K. (2002) The effect of lignin-related compounds on the growth and production of laccases by the ascomycete, *Botryosphaeria* sp. *Enzyme Microbiol Technol.*; 30: 374-380.



Eggert C, Temp U, Dean JF, Eriksson KE. (1996) A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Lett.*; 391: 144:148.

Eichlerová I, Homolka L, Nerud F. (2006) Evaluation of synthetic dye decolorization capacity in *Ischnoderma resinotum*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*; 33: 759–766.

Elliott ML y Henson JM (2001) Effect of osmotic stress on growth of *Gaeumannomyces graminis* strains differing in hyphal pigmentation. *Mycologia*; 93:617-625.

Eriksson KEL, Blanchette RA, Ander P. (1990) Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Springer, Berlin.

Erkurt EA, U"nyayar A, Kumbur H. (2007) Decolorization of synthetic dyes by white rot fungi, involving laccase enzyme in the process. *Process Biochemistry*; 42: 1429–1435.

Fabbrini M, Galli C, Gentili P. (2002) Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*; 16: 231-240.

Fenice M, Sermanni GG, Federici F, D'Annibale A. (2003) Sumerged and soil-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater- based media. *J. Biotechnol.*; 100: 77-85.

Galhaup C, Wagner H, Histerstoisser B, Haltrich D. (2002) Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme Microbiol. Technol.*; 30: 529-536.

Gianfreda L, Bollag J-M. (2002) Isolated enzymes for the transformation and detoxification of organic pollutants. In Burns RG, Dick R, editors. *Enzymes in the environment: activity, ecology and applications*. New York: Marcel Dekker, pag 491-538.

Gianfreda L, Rao MA. (2004) Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. *Enzyme Microbiol. Technol.*; 35: 339-354.

Gill PK, Arora DS. (2003) Effect of culture conditions on manganse peroxidase production and activity by some white rot fungi. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*; 30: 28-33.

Glenn JK, Morgan MA, Mayfield MB, Kuwahara M, Gold MH. (1983) An extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*; 114: 1077-1083.

Glenn JK y Gold MH. (1985) Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Biochem Biophys.*; 242: 329-341.

Gnanamani A, Jayaprakashvel M, Arulmani M, Sadulla S. (2006) Effect of inducers and culturing processes on laccase synthesis in *Phanerochaete chrysosporium* NCIM 1197 and the constitutive expresion of laccase isozymes. *Enzyme Microbiol. Technol.*; 3: 1017-1021.

Godio RP, Mercuri OA, Forchiassin F. (2000) Efecto de las condiciones de cultivo de *Stereum hirsutum*. *Rev. Arg. Microbiol.*; 32: 1-8.

Gold MH, Wariishi H, Valli K. (1989) Extracellular peroxidases involved in lignin degradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. In J.R. Whitaker and P.E. Sonnet (eds) *Biocatalysis in Agricultural Biotechnology*, Vol. ACS Symp. Ser. No. 389, The American Chemical Society, Washington, DC. 128-140.

Gómez BL y Nosanchuk JD. (2003) *Melanin and fungi*. *Curr. Opin. Infect. Dis.*; 16: 91-96.

Goring DAI (1989) The lignin paradigm. In: Glasser WG, Sarkanen S (eds) *New polymeric materials from lignin*. ACS Symposium Series, nro 397. American Chemical Society Washington DC. pp 2-10

Guillén F, Martínez AT, Martínez MJ, Evans CS. (1994) Hydrogen peroxide-producing system of *Pleurotus eryngii* involving the extracellular enzyme aryl-alcohol oxidase. *App. Microbiol. Biotechnol.*; 41: 465-470.

Hatakka A. (1994) Lignin-modifying enzymes from select white-rot fungi production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 13: 125-135.

Hatakka A. (2001) Biodegradation of lignin. In M. Hofrichter and A Steinbüchel(eds) *Lignin, Humic Substances and Coal*, Vol 1, Wiley-VCH, Weinheim, Germany. 129-180.

Higuchi T. (1990) Lignin biochemistry and biodegradation. *Wood Sci. Technol.*; 24: 23-63.

Higuchi T. (2004) Microbial degradation of lignin: Role of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase. *Proc. Jpn. Acad.*; Ser.B 80: 204-214.

Hofrichter M. (2002) Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme Microb. Technol.*; 30: 454-466.

Hofrichter M, Vares T, Kalsi M, Galkin S, Scheibner K, Fritsche W, Hatakka A. (1999) Production of manganese peroxidase and organic acids and mineralization of <sup>14</sup>C-labelled lignin (<sup>14</sup>C-DHP) during solid-state fermentation of wheat straw with the white-rot fungus *Nematoloma frowardii*. *Appl. Environ. Microbiol.*; 65: 1864-1870.

- Hou H, Zhou J, Wang J, Du Cuihong, Yan B. (2004) Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Process. Biochem.*; 39: 1415-1419.
- Ikehata K, Buchanan ID, Smith DW. (2004) Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. *J. Environ. Eng. Sci.*; 3: 1-19.
- Ivanova AE, Aslanidi KB, Karpenko YV, Belozerskaya TA. (2005) The effect of hydrogen peroxide on the growth of microscopic mycelial fungi isolated from habitats with different levels of radioactive contamination. *Microbiology*; 74: 655–663.
- Jacobson ES, Hove E, Emery HS. (1995) Antioxidant function of melanin in black fungi. *Infection and Immunity*; 63: 4944-4945.
- Jennings DH. (1995) *The physiology of fungal nutrition*. Cambridge University Press. 622 p. Cambridge. British Library.
- Jia C, Kang R, Zhang Y, Cong W. (2007) Degradation and decolorization of monosodium glutamate wastewater with *Coriolus versicolor*. *Biodegradation*; 18: 551-557.
- Kamitsuji H, Honda Y, Watanabe T, Kuwahara M. (2004) Production and induction of manganese peroxidase isozymes in a white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*; 65: 287-294.
- Kanunfre CC, Zancan GT. (1998) Physiology of exolaccase production by *Thelephora terrestris*. *FEMS Microbiol. Lett.*; 161: 151-156.
- Kasinath A, Novotny C, Svobodova K, Patel KC, Sasek V. (2003) Decolorization of synthetic dyes by *Irpex lacteus* in liquid culture and packed-bed bioreactor. *Enzyme Microb. Technol.*; 32: 167-173.
- Kersten PJ. (1990) Glyoxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.*; 166:269-274.
- Kirk TK, Farrell RL. (1987) Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignin. *Ann. Rev. Microbiol.*; 41: 465-505.
- Klein J, Fakoussa R, Hölker U, Hofrichter M, Schmiers H, Sinder C, Steinbüchel A. (2001) *Biotechnology of Coal*. In H.-J. Rehm (ed) *Special Processes*, Vol. 10, Wiley-VCH, Weinheim, Germany. 153-189.
- Kishi K, Wariishi H, Marquez L, Dunford HB, Gold MH. (1994) Mechanism of manganese peroxidase compound II reduction. Effect of organic chelators and pH. *Biochem.*; 33: 8694-8701.

Koenigs JW. (1974) Production of hydrogen peroxide by wood-rotting fungi in wood and its correlation with weight loss, depolymerization, and pH changes. *Arch. Microbiol.*; 99: 129-145.

Kuwahara M, Glenn JK, Morgan MA, Gold MH. (1984) Separation and characterization of 2 extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.*; 169: 247-250.

Levin L, Forchiassin F, Ramos AM. (2002) Copper induction of lignin-modifying enzymes in the white-rot fungus *Trametes trogii*. *Mycologia*; 94: 377-383.

Lo SC, Ho YS, Buswell JA. (2001) 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*; 93: 413-421.

López C, Moreira MT, Feijoo G, Lema JM. (2004). Dye decolorization by manganese peroxidase in an enzymatic membrane bioreactor. *Biotechnol. Prog.*; 20: 74-81.

Maeda Y, Kajiwara S, Ohtaguchi K. (2001) Manganese peroxidase gene of perennial mushroom *Elvingia applanata*: cloning and evaluation of its relationship with lignin degradation. *Biotechnol. Letters*; 23: 130-109.

Mäkelä M, Galkin S, Hatakka A, Lundell T. (2002) Production of organic acids and oxalate decarboxylase in lignin-degrading white-rot fungi. *Enzyme Microb. Technol.*; 30: 542-549.

Martínez AT, Speranza M, Ruiz-Dueñas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillén F, Martínez MJ, Gutiérrez A, del Río JC. (2005) Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of fungal attack of lignin. *Int. Microbiol.*; 8: 195-204.

Maas R, Chaudhari S. (2005) Adsorption and biological decolorization of azo dye reactive red 2 in semicontinuous anaerobic reactors. *Process. Biochem.*; 40: 699-705.

Mayer AM, Staples RC. (2002) Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochem.*; 60: 551-565.

Méjanelle L, López JF, Gunde-Cimerman N, Grimalt JO. (2001) Ergosterol biosynthesis in novel melanized fungi from hypersaline environments. *J. Lipid Research*; 42: 352-359.

Mester T, Field JA. (1998) Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera* species strain BOS55 in the absence of manganese. *J. Biol. Chem.*; 273:15412-15417.

Meulenbergh R, Rijnaarts HHM, Doddema HJ, Field JA. (1997) Partially oxidized polycyclic aromatic hydrocarbons show an increased bioavailability and biodegradability. *FEMS Microbiol. Lett.*; 152: 45-49.

Michaels GB, Lewis DL. (1985) Sorption and toxicity of azo and triphenylmethane dyes to aquatic microbial populations. *Environ. Toxicol. Chem.*; 4: 45-50.

Moilanen AM, Lundell T, Vares T, Hatakka A. (1996) Manganese and malonate are individual regulators for the production of lignin and manganese peroxidase isozymes and the degradation of lignin by *Phlebia radiata*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*; 45: 792-799.

Mori T, Kondo R. (2002) Oxidation of dibenzo-*p*-dioxin, dibenzofuran, biphenyl, and diphenyl ether by white-rot fungus *Phlebia lindtneri*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*; 60: 200-205.

Mouso N, Diorio L, Forchiassin F. (2007) Acción de *Stereum hirsutum* (Wild) Pers. en la degradación de colorantes. *Revista Iberoamericana de Micología*; 24; en prensa.

Murugesan K, Nam IH, Kim YM, Chang YS. (2007) Decolorization of reactive dyes by a thermostable laccase produced by *Ganoderma lucidum* in solid state culture. *Enzyme Microb. Technol.*; 40: 1662-1672.

Niku-Paavola, ML, Raaska L, Itavaara M. (1990) Detection of white-rot fungi by non-toxic stain. *Mycol. Res.*; 94: 27-31.

Novotny C, Svobodova K, Erbanova P, Cajthaml T, Kasinath A, Lang E, Sasek V. (2004) Lignolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. *Soil Biology & Biochemistry*; 36: 1454-1551.

Pala A, Toket E. (2002) Color removal from Kraft bleach plant effluent by *Trichoderma* sp. *Tappi*; 74: 165-169.

Palma C., Moreira M.T., Feijoo G., Lema J.M. (1997) "Enhanced catalytic properties of MnP by exogenous addition of manganese and hydrogen peroxide". *Biotechnology Letters.*; 19 (3): 263-267.

Papinutti VL, Forchiassin F. (2003) Optimization of manganese peroxidase and laccase production in the South American fungus *Fomes sclerodermeus* (Lév.) Cke. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*; 30: 536-541.

Papinutti VL, Forchiassin F. (2004) Modification of malachite green by *Fomes sclerodermeus* and reduction of toxicity to *Phanerochaete chrysosporium* FEMS *Microbiol. Lett.*; 231: 205-209.

Papinutti VL, Forchiassin F. (2007) Lignocellulolytic enzymes from *Fomes sclerodermeus* growing in solid-state fermentation. *J. Food Engineering*. 1: 54-59.

Papinutti VL, Martínez MJ. (2006) Production and characterization of laccase and manganese peroxidase from the ligninolytic fungus *Fomes sclerodermeus*. J. Chem. Technol. Biotechnol.; 81: 1064-1070.

Plassard CS, Mousain DG, Salsac LE (1982) Estimation of mycelial growth of basidiomycetes by means of chitin determination. Phytochemistry; 21: 345-348.

Pointing SB. (2001) Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. Appl. Microbiol. Biotechnol.; 57: 137-152.

Pozdnyakova NN, Rodakiewicz-Nowak J, Turkovskaya O. (2004) Catalytic Properties of Yellow Laccase from *Pleurotus ostreatus* D1. J. Mol. Catal. B; 30: 19-24.

Preston R.D. (1974) The Physical Biology of Plant Cell Walls. Chapman & Hall, London.

Reid ID. (1995) Biodegradation of lignin. Can. J. Bot.; 73: S1011-S1018.

Robinson t, McMullan G, Marchant R, Nigam P. (2001) Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. Bioresour. Technol.; 77: 247-255.

Rodríguez Couto S, Toca-Herrera JL. (2007) Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. Biotechnol. Advances; 25: 558-569.

Ruiz-Dueñas FJ, Camarero S, Perez-Boada M, Martínez MJ, Martínez AT. (2001) A new versatile peroxidase from *Pleurotus*. Biochem. Soc. Trans.; 29: 116-122.

Sakai T, Sakamoto T, Hallaert J y Vandamme EJ. (1993) Pectin, pectinase and protopectinase. Production, properties and applications. Advances in Applied Microbiology; 39: 213-294.

Saparrat MC, Guillén F, Arambarri AM, Martínez AT, Martínez MJ. (2002) Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white rot basidiomycete *Coriolopsis rigida*. Appl. Environ. Microbiol.; 68: 1534-1540.

Sarkanen KV, Hergert HL. (1971) Clasification and distribution, in lignins: Occurrence, Formation, Structure and reactions. Sarkanen, KV, Ludwig, CH eds., Wiley-Interscience, New York.

Scheel T, Höfer M, Ludwing S, Hölker U. (2000) Differential expression of manganese peroxidase and laccase in white-rot fungi in the presence of manganese or armatic compounds. Appl. Microbiol. Biotechnol.; 54: 689-691.

Shin M, Nguyen T, Ramsay J. (2002) Evaluation of support materials for surface immobilization and decoloration of amaranth by *Trametes versicolor*. Appl. Microbiol. Biotechnol.; 60: 218-223.

Shuttleworth KL, Postie L, Bollag JM. (1986) Production of induced laccase by the fungus *Rhizoctonia praticola*. Can. J. Microbiol.; 32: 867–870.

**Singhal V, Rathore VS. (2001). Effects of Zn<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> on growth, lignin degradation and ligninolytic enzymes in Phanerochaete chrysosporium. World J. Microbiol. Biotechnol.; 17: 235-240.**

Soden DM, Dobson ADW. (2001) Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. Microbiol.; 147: 1755-1763.

Svobodová K. (2005) The implications of ligninolytic enzymes in the decolorization of synthetic dyes by the white-rot fungus *Irpex lacteus*. PhD Thesis, Charles University, Prague, Czech Republic.

Taiz L, Zeiger E. (2002) Plant Physiology. Third Edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts.

Terrón MC, González T, Carbajo JM, Yagüe S, Arana-Cuenca A, Téllez A, Dobson ADW, González AE. (2004) Structural close-related aromatic compounds have different effects on laccase activity and on lcc gene expression in the ligninolytic fungus *Trametes* sp. I-62. Fungal Gen. Biol.; 41: 954-962.

Tien M. (1987) Properties of ligninase from *Phanerochaete chrysosporium* and their possible applications. CRC Crit. Rev. Microbiol.; 15: 141-168.

Tien M, Kirk TK. (1983) Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. Science; 221: 661-662.

*Tien M, Kirk TK, Bull C, Fee JA. (1986) Steady-state and transient-state kinetic studies on the oxidation of 3,4-dimethoxybenzyl alcohol catalyzed by the ligninase of Phanerochaete chrysosporium Burds J. Biol. Chem.; 261: 1687-1693.*

Thurston CF. (1994) The structure and function of fungal laccases. Microbiology; 141: 19-26.

Turk M, Méjanelle L, Šentjurc M, Grimalt JO, Gunde-Cimerman N, Plemenita A. (2004) Salt-induced changes in lipid composition and membrane fluidity of halophilic yeast-like melanized fungi. Extremophiles; 8: 53-61.

Ünyayar A, Mazmanci MA, Atcag H, Erkurt EA, Coral G. (2005) A Drimaren Blue X3LR dye decolorizing enzyme from *Funalia trogii*: one step isolation and identification. Enzyme Microb. Biotechnol.; 36: 10-16.

Verma P y Madamwar D. (2005) Decolorization of azo dyes using Basidiomycete strain PV 002. *World J. Microbiol. Biotechnol.*; 21: 481–485.

Viniegra-González G, Favela-Torres E. (2006) Why solid-state fermentation seems to be resistant to catabolite repression. *Food Technol. Biotechnol.*; 44: 397-406.

Wesenberg D, Kyriakides I, Agathos SN. (2003) White-root fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnol. Advances*; 22: 161-187.

Yaropolov AI, Skorobogat'ko OV, Vartanov SS, Varfolomeyev SD. (1994) Laccase: properties, catalytic mechanisms, and applicability. *Appl. Biochem. Biotechnol.*; 49: 257-280.

Zabel RA y JJ Morrel (1992) *Wood Microbiology. Decay and its Prevention.* Academic Press, San Diego, California.

Zhang SJ, Yang M, Yang QX, Zhang Y, Xin BP, Pan F. (2003) Biosorption of reactive dyes by mycelium pellets of isolates of *Penicillium oxalicum*. *Biotechnol. Lett.*; 25: 1479-1488.