

## Aislamiento, selección y caracterización de hongos ligninolíticos chilenos

Isolation, selection and characterization of Chilean  
ligninolytic fungi

HERMAN SILVA, AGUSTIN LANDA y EDUARDO AGOSIN

Laboratorio de Biotecnología, Instituto de Nutrición y Tecnología  
de los Alimentos, Universidad de Chile,  
Casilla 138-11, Santiago, Chile.

Several wood degrading fungi were isolated from decayed trees found in the evergreen rain forests of Southern Chile. Thereafter, their ligninolytic system, *i.e.* ligninase, laccase and veratryl alcohol production in liquid cultures, was investigated.

All the strains studied produced veratryl alcohol as a secondary metabolite. Several white-rot fungi, and specially strains 158 and 441, were able to produce significant amounts of ligninase and laccase under agitated conditions and in an atmosphere of air. These two fungi, in particular, were able to depolymerize a high molecular weight fraction of Kraft lignin at similar rates than those observed for *Phanerochaete chrysosporium*. On the contrary, other strains where ligninase was not detected, resulted in the polymerization of lignin upon incubation.

En la naturaleza, la lignina es degradada principalmente por hongos basidiomicetes de pudrición blanca, entre los cuales el más estudiado ha sido *Phanerochaete chrysosporium*. El sistema ligninolítico de estos microorganismos se desarrolla a partir del momento en que el hongo se encuentra en metabolismo secundario (Kirk y Fenn, 1982). En efecto, la lignina es degradada solamente una vez terminado el crecimiento primario, momento que coincide con la carencia en el medio de cultivo de un macronutriente, en particular nitrógeno o carbono (Keyser y col., 1978).

Durante la fase estacionaria de crecimiento, *Phanerochaete chrysosporium* secreta varias enzimas extracelulares que están involucradas en la degradación de la lignina (Kirk y Farrell, 1986; Leisola y Fiechter, 1985). Entre éstas, la peroxidasa de lignina o ligninasa es una enzima clave en la primera etapa de degradación del polímero aromático (Glenn y Gold, 1983; Tien y Kirk, 1983). Se trata de una hemoproteína extracelular, dependiente de  $H_2O_2$  que se caracteriza por su alto potencial redox (Farrell y col., 1989), lo cual le permite, contrariamente al resto de las peroxidasas conocidas hasta hoy, abstraer un electrón directamente desde el anillo aromático, produciendo

radicales catiónicos que se propagan a través del polímero, oxidándolo (Kersten y col., 1985; Hammel y col., 1985; 1986). Desgraciadamente, la producción de este tipo de enzima por *P. chrysosporium* sólo es posible bajo condiciones de cultivo muy particulares (agitación limitada, atmósfera saturada en oxígeno, etc.).

Un segundo tipo de peroxidasa, la Mn-peroxidasa, fue posteriormente identificada en el medio de cultivo de *P. chrysosporium* (Kuwahara y Gold, 1984; Huynh y Crawford, 1985). La función principal de este tipo de enzima es la oxidación de  $Mn^{2+}$  a  $Mn^{3+}$ . Sin embargo, el rol específico de esta enzima en la degradación de la lignina aún no ha sido aclarado. En efecto,  $Mn^{3+}$  oxida compuestos fenólicos, pero su potencial redox no es suficientemente elevado para oxidar compuestos no fenólicos como alcohol veratrílico o mediar la ruptura de enlaces  $C\alpha-C\beta$  presentes en la lignina. Por último, cabe señalar que las Mn-peroxidasas son capaces de producir  $H_2O_2$  a partir de varios reductantes como glutatión, usando  $O_2$  como oxidante (Paszczynski y col., 1986).

La mayoría de los hongos de pudrición blanca también producen durante esta fase del crecimiento fenol oxidasas extracelula-

res, y en particular lacasa (p-difenol: oxígeno óxido-reductasa), enzima que ha sido durante largo tiempo relacionada con la oxidación de la lignina, al menos en aquellos hongos que degradan la madera (Ander y Eriksson, 1976). Se trata de una glicoproteína que contiene cobre en su sitio activo y que cataliza la oxidación de o- y p-difenoles mediante la abstracción de un electrón y de un protón desde un hidroxilo fenólico, generando radicales fenoxi. Sin embargo, Ishihara y Miyazaki (1972) demostraron que la enzima purificada no era capaz de degradar significativamente lignina extraída de madera ultramolida, poniendo en duda la función de esta enzima en la ligninólisis. Más aún, varios estudios recientes han mostrado que la oxidación de lignina y compuestos modelo de lignina por esta enzima tiene como consecuencia principal la polimerización de éstos (Kirk y Shimada, 1985).

Otros compuestos, tales como  $\beta$ -glucanos, alcohol veratrílico, etc., son sintetizados conjuntamente con las enzimas ligninolíticas por *P. chrysosporium*. Entre éstos, el alcohol veratrílico (alcohol 3,4-dimetoxibencílico) ha sido muy estudiado (Lundquist y Kirk, 1978; Shimada y col., 1981; Fenn y Kirk, 1981). Sin embargo, la función de este compuesto aromático en la degradación de la lignina por *P. chrysosporium* aún no ha sido totalmente elucidada (Leisola y col., 1984). Estudios recientes han mostrado que el efecto del alcohol veratrílico sobre la actividad ligninasa en *P. chrysosporium* no se relaciona con un mecanismo alostérico, sino que su función recaería en promover la transcripción de los genes que codifican para esta actividad (Faison y col., 1986). Otros autores (Harvey y col., 1986) han atribuido a este compuesto un rol de propagador en la etapa de degradación de la lignina. De esta forma, el alcohol veratrílico permitiría la oxidación de la lignina a cierta distancia del sitio activo de la enzima. Por último, se ha propuesto recientemente que el alcohol veratrílico protegería ciertas isoenzimas de la ligninasa contra la inactivación por el  $H_2O_2$  generado en cultivos de *P. chrysosporium* (Tonon y Odier, 1988).

Muy pocos estudios han sido realizados sobre el sistema ligninolítico presente en

otras especies de hongos basidiomicetes de pudrición blanca, y hasta hoy sólo han sido evaluadas especies ligninolíticas provenientes del hemisferio Norte (Hattaka y col., 1989). Esto contrasta con la diversidad de hongos ligninolíticos que han sido descritos en el hemisferio Sur, y en particular en los bosques siempreverdes del sur de Chile (Lazo, 1983; 1984), así como con la existencia de fenómenos únicos de deslignificación selectiva (González y col., 1982; Zadrzil y col., 1982; Dill y Kraepelin, 1986; Agosin y col., 1990), sobre los cuales no existe ninguna información acerca de los sistemas enzimáticos implicados.

El primer objetivo de este trabajo fue evaluar la producción de ligninasa, fenoloxidasas y alcohol veratrílico por varias cepas de hongos basidiomicetes de pudrición blanca aisladas de troncos en descomposición de los bosques siempreverdes del sur de Chile. En segundo lugar, para aquellas cepas más promisorias, se siguió la cinética de degradación de una fracción de lignina extraída de alto peso molecular. La función potencial de varios componentes del sistema ligninolítico es discutida a la luz de los resultados obtenidos.

## MATERIALES Y METODOS

### *Preparación de lignina Kraft*

Se preparó una fracción de lignina de alto peso molecular (P.M. > 3000) a partir del licor negro (donación de Celulosa Arauco). Este último resulta de la extracción alcalina de la lignina presente en la madera durante el proceso Kraft de obtención de celulosa. Para esto se utilizó el método descrito por Lundquist y Kirk (1980).

### *Aislamiento y selección de los hongos*

Se utilizaron cepas nativas aisladas de maderas en descomposición encontradas en bosques siempreverdes de la X región y en la isla grande de Chiloé. Estas cepas se aislaron en el laboratorio a partir de micelio ubicado detrás del cuerpo fructífero del hongo, el cual fue sembrado en placas de agar-malta (2%) con penicilina (0,6 mg/ml) y estreptomycin (1,0 mg/ml). Como control positivo se utilizó la cepa *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 (ATCC 24725) gentilmente donada por el Dr. T.K. Kirk, Forest Products Laboratory, USDA, Madison, USA.

Las cepas fueron numeradas cronológicamente al momento de su descubrimiento, y varias de ellas están siendo clasificadas taxonómicamente.

La caracterización de las cepas se realizó de dos formas: un primer criterio fue la observación microscópica, ya que los hongos basidiomicetes se distinguen por presentar septas e interconexiones entre células sobre dichas septas denominadas fibras (Griffin, 1981), las cuales se observan fácilmente al microscopio y constituyen un criterio inequívoco de selección. En segundo lugar, se evaluó la presencia de polifenoloxidasas a través del método de Bavendamm (1928). Este método consiste en inocular el hongo a estudiar sobre agar-malta, el cual contiene, además, un 1% de ácido tánico. La capacidad de formar un halo de color café sobre la superficie de la placa Petri da una indicación de la actividad polifenoloxidásica. Este criterio es utilizado para diferenciar entre los basidiomicetes llamados de pudrición blanca y aquellos de pudrición parda, no ligninolíticos.

Por último, con el objeto de asegurar una mayor selección, se procedió a medir su velocidad de crecimiento, para lo cual se depositó un trozo de micelio en el centro de la placa (sin antibióticos) y se fue midiendo diariamente el diámetro del halo de propagación. De la pendiente de la curva de crecimiento se obtuvo la tasa de crecimiento (mm/día) a la temperatura de trabajo y se seleccionaron las 30 cepas con mayor velocidad de crecimiento.

#### *Medios de cultivo*

Cada cepa se hizo crecer en matraces de 250 ml con 125 ml de medio en el caso de cultivos agitados, y matraces de 125 ml con 10 ml de medio para cultivos estáticos. En ambos casos se utilizaron medios limitados en nitrógeno o en carbono, siendo para ambos la fuente de nitrógeno tartrato de amonio, y la fuente de carbono, glucosa. El medio limitado en nitrógeno (HGLN) contenía tartrato de amonio 2,2 mM y glucosa 1%; en cambio, el medio limitado en carbono (LGHN) contenía tartrato de amonio 7,2 mM y glucosa 0,2% (Kirk y col., 1986; Leisola y col., 1985). Como medio mineral, se utilizó el medio descrito por Kirk y col., (1986).

#### *Métodos de cultivo*

Los medios se inocularon de dos formas diferentes: en el caso de cepas esporogénicas se inocularon  $2 \times 10^6$  esporas por ml de medio de cultivo. Para las cepas asporogénicas se inoculó un equivalente a 0,0813 mg de proteína micelar, lo que corresponde al contenido proteico de  $2 \times 10^6$  esporas de *P. chrysosporium* (Agosin y Odier, 1985). Posteriormente, los cultivos se pusieron a incubar a 30°, 200 rpm (en el caso de cultivo agitado) y bajo atmósfera de aire (21% de oxígeno). En el momento de la entrada a la fase estacionaria se les adicionó alcohol veratrílico (0,4 mM). Los cultivos líquidos no agitados de *P. chrysosporium* se incubaron a 37° y bajo atmósfera de oxígeno

desde la inoculación (cada tres días se burbujeó oxígeno). La iniciación de la fase estacionaria fue visualizada directamente en el cultivo por decoloración del cromógeno azul de remazol R, adicionado al 0,02% (Glenn y col., 1983).

La producción de alcohol veratrílico por las cepas nativas fue estudiada en este mismo medio pero sin adicionar alcohol veratrílico.

Por último, el estudio de la evolución del peso molecular de la lignina se llevó a cabo en un medio similar, salvo que éste contenía además lignina Kraft al 0,25%, la cual se adicionó desde una solución concentrada (1,25%, pH 5,0) a cada cultivo que se encontraba en metabolismo secundario. Cada 12 horas durante 7 días se tomaron alícuotas (1 ml) del medio de cultivo para ser analizadas por cromatografía de exclusión molecular.

Todos los cultivos se realizaron a lo menos en triplicado.

#### *Determinación de actividades enzimáticas*

a) *Ligninasa*: la determinación de la actividad ligninasa está basada en la oxidación del alcohol veratrílico a veratraldehído (Tien y Kirk, 1983). Esta se realizó a partir del tercer día de crecimiento directamente sobre una alícuota del medio de cultivo. Una unidad de actividad enzimática se define como la oxidación de 1,0 mmol de alcohol veratrílico a veratraldehído en un minuto a 37°, pH 3,0 y en presencia de 0,4 mM de  $H_2O_2$ .

b) *Lacasa*: la determinación de la actividad lacasa (p-difenol: oxígeno óxido-reductasa se basa en la deshidrogenación de la siringaldacina (Sigma), la cual fue determinada espectrofotométricamente a 525 nm (Harkin y Obst, 1973). Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que es capaz de provocar un aumento de la absorbancia de 0,001 por minuto.

#### *Análisis químicos*

La detección de alcohol veratrílico se realizó de la siguiente forma: 200  $\mu$ l de medio de cultivo se extrajeron con igual volumen de éter previa acidificación con 10  $\mu$ l de HCl 3N. Se sembraron 50  $\mu$ l de la solución etérea en placas de silicagel (Merck, silicagel 60F-254) de 4 x 4 cm, utilizándose cloroformo/acetona 9:1 (v/v) como fase móvil. Para confirmar que las bandas correspondían a los compuestos a determinar se utilizaron dos fases móviles diferentes: alcohol isopropílico/amoníaco/agua (8:1:1) y diclorometano/metanol (19:1). Las manchas en la placa se observaron en forma directa con una lámpara UV a 254 nm y se confrontaron con los Rf de estándares conocidos. Las bandas identificadas por TLC fueron raspadas de la placa, resuspendidas en metanol y sus espectrogramas fueron comparados con los de los estándares disponibles. Por último, dichos raspados se analizaron en un cromatógrafo Waters, equipado con una columna LiChrospher (Merck) de 25 cm, rellena con

C-18 (10  $\mu$ m). Las separaciones se hicieron con una fase metanol/H<sub>2</sub>O 60:40 (v/v) y con un flujo de 0,8 ml/min. La detección se realizó a 280 nm. Los picos fueron identificados por comparación con los tiempos de retención de estándares y coelución de éstos con la muestra problema.

Los cambios en el grado de polimerización de la lignina Kraft resultantes de la acción de los hongos ligninolíticos fueron determinados mediante separación de la lignina por peso molecular en una columna de exclusión molecular de Sephadex G-50 (100 x 1,0 cm), usando como fase móvil la solución acuosa NaOH-LiCl 0,1 N. Fracciones de 1,0 ml/tubo fueron colectadas a un flujo de 15 ml/hora. Dicha columna se calibró con alcohol veratrílico (PM:168), ácido fólico (PM:441) y proteínas como citocromo c (PM:12384).

## RESULTADOS

### Aislamiento de cepas nativas

Alrededor de 80 hongos fueron aislados de troncos en descomposición. Todos pertenecían a la subdivisión Basidiomicetes, según se determinó microscópicamente por la presencia de septas y fíbulas. Así como también por la presencia, medidas por el test de Bavendamm, de fenol oxidasas extracelulares, que a pesar de no ser específico para los hongos basidiomicetes sirve para diferenciar entre hongos de pudrición blanca y parda. Si el test es positivo, el hongo no es de pudrición parda, ya que éstos no producen tales enzimas; esta regla deja de tener validez en el caso contrario, ya que hay hongos de pudrición blanca que producen can-

tidades poco detectables de dichas enzimas, como por ejemplo *Phanerochaete chrysosporium*, aunque la mayoría de ellos produce fenol oxidasas extracelulares. En este caso la mayoría de las cepas aisladas dio resultados positivos para el test de Bavendamm. Entre éstos, se encontraron algunos de amplia distribución en el mundo como *Ganoderma applanatum*, *Coriolus versicolor*, etc., así como otros que son propios de estas latitudes, como por ejemplo *Gleosoma vitelinum*, *Phlebia chrysocrea* y una variedad de *Pycnoporus cinnabarinus* (Burgos, J., comunicación personal). De estas 80 cepas, las 30 que mostraron mayor velocidad de crecimiento en medio agar-malta (2%) fueron evaluadas para la producción de ligninasa.

### Determinación de ligninasa en cepas nativas

La determinación de actividad ligninasa se efectuó a partir del tercer día de crecimiento, tiempo en el cual la mayoría de las cepas se encontraban en metabolismo secundario, lo que se comprobó por la descoloración del reactivo cromogénico azul de remazol R (Glenn y col., 1983).

La Tabla I muestra las máximas actividades de ligninasa obtenidas al quinto día de cultivo, con las cepas más promisorias en los medios HGLN y LGHN, en condiciones de agitación y en cultivos estáticos. La cepa

TABLA I  
Máxima actividad de lignina-peroxidasa (U/ml) alcanzada por las cepas nativas aisladas

Medio	Cepas											
	157	310	8	158	441	20	268	184	178	14	58	P. c.
* HGLN	1,5	1,7	1,3	1,2	0,6	0,3	—	1,3	2,4	—	—	75,0
#HGLN	—	nd	0,8	1,6	—	1,9	1,6	2,0	0,4	0,1	—	5,0
* LGHN	2,2	1,8	—	5,0	7,6	—	—	—	0,2	—	—	—
#LGHN	—	nd	0,1	10,0	—	—	—	—	—	—	—	—

\* : medio agitado (200 rpm), 30° y 21% O<sub>2</sub>.

# : medio estático en condiciones similares a\*

P. c. : *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767. Condiciones de cultivo: 120 rpm, 39° 100% O<sub>2</sub> a partir del tercer día

nd : no determinado

— : no detectado (0,0 U/ml)

desviación estándar < 0,5%

441 mostró la mayor actividad en medio LGHN agitado, obteniéndose el máximo de actividad al quinto día de crecimiento. La actividad disminuye notoriamente al sexto día (6,2 U/l), hasta alcanzar un valor cercano a cero al décimo día. Ocurre lo mismo para la mayoría de las cepas ensayadas. Bajo condiciones de agitación y aire, la cepa de referencia, *P. chrysosporium*, no muestra ninguna actividad, aunque bajo condiciones optimizadas para ella, se obtienen 75 U/l de actividad ligninasa. Es importante mencionar que en el caso de una atmósfera de 100% de oxígeno no se detectó actividad enzimática en las cepas nativas estudiadas (resultados no mostrados).

#### Determinación de lacasa en cepas nativas

Se analizaron nueve cepas nativas, encontrándose que la cepa 268 presentaba la mayor actividad enzimática en medio LGHN agitado, seguida por la cepa 441 (Tabla II). El máximo de actividad lacasa se obtuvo luego de diez días de incubación para todas las cepas estudiadas.

Por otra parte, al igual que en el caso anterior, las cepas nativas produjeron una mayor actividad en medio agitado y bajo atmósfera de aire. La mayoría de las cepas con actividad ligninasa mostraron, también, actividad lacasa. Como era de esperar, *Phanerochaete chrysosporium* posee bajo estas condiciones actividades lacasa y ligninasa nulas, ya que ligninasa no se produce bajo las condiciones ensayadas y no se ha descrito presencia de lacasa en dicha cepa (Kirk y Farrell, 1987).

#### Producción de alcohol veratrílico

La mayoría de las cepas nativas aisladas produjeron alcohol veratrílico durante la fase estacionaria de crecimiento (Fig. 1B). La Figura 1A muestra, a modo de ejemplo, la aparición en el tiempo de alcohol veratrílico y veratraldehído durante el crecimiento de la cepa 441. Sólo a partir del tercer día se evidenció la presencia de alcohol veratrílico y de veratraldehído. En el caso de la cepa 441 se observó, además, la aparición de ácido verátrico. En cambio, para otras cepas como la 310 (Fig. 1C), sólo se detectó veratraldehído en el medio de cultivo.

La identidad de los compuestos secretados fue confirmada por cromatografía en capa fina al utilizar diferentes fases móviles, obteniéndose Rf iguales entre las muestras y los estándares (alcohol, ácido y aldehído). Otro criterio de confirmación lo constituyó la similitud entre los espectrogramas de las muestras raspadas desde la placa TLC y los estándares. Por último, la coelución de las muestras y sus respectivos estándares por HPLC ratificó estos resultados (resultados no mostrados).

#### Cinética de degradación de la lignina Kraft

Durante las primeras horas de incubación después de haber agregado el sustrato, para varias cepas se observó una adsorción activa, pero parcial, de la fracción de lignina unida al micelio, que variaba entre un 10 y un 30% en función de la cepa estudiada. Los perfiles de elución de la lignina, incubada

TABLA II

Máxima actividad de lacasa (U/ml) alcanzada por las cepas nativas aisladas

Medio	Cepas									
	184	14	58	8	20	268	441	158	178	P. c.
* HGLN	162	150	200	30	198	249	162	15	40	—
#HGLN	10	200	320	15	447	507	nd	50	—	—
* LGHN	—	300	320	3	—	663	348	—	—	—
#LGHN	252	400	420	—	—	15	nd	195	—	nd

Condiciones de cultivo: idem Tabla I.

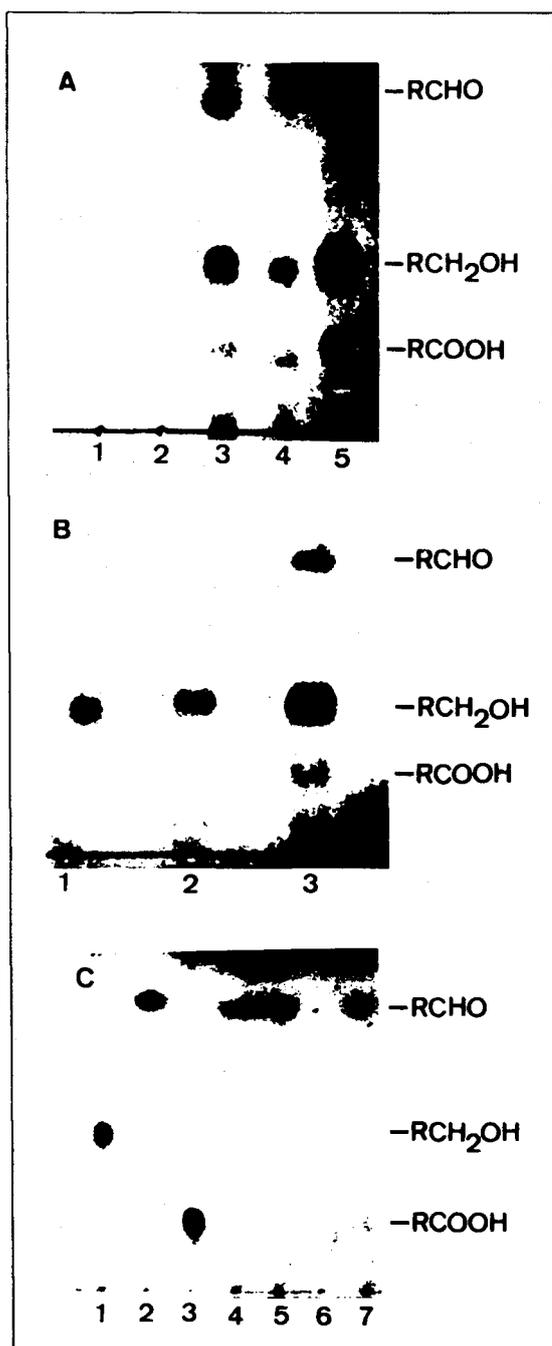


Fig. 1: Separación por cromatografía en capa fina (Merck, silicagel 60F-254; fase móvil: cloroformo/acetona 9:1) e identificación de compuestos aromáticos presentes en sobrenadantes de medios de cultivo de cepas ligninolíticas.

- A: producción de alcohol, aldehído y ácido verátrico por la cepa 441 (1: medio HGLN; 2: medio LGHN; 3: estándares; 4: 3<sup>er</sup> día; 5: 5<sup>o</sup> día).
- B: producción de alcohol veratrílico (1: cepa 14; 2: cepa 58; 3: estándares).
- C: producción de veratraldehído (estándares, 1: alcohol, RCH<sub>2</sub>OH, 2: aldehído, RCHO, 3: ácido, RCOOH; 4: cepa 310; 5: cepa 8; 6: cepa 5; 7: cepa 178).

por tiempos crecientes con varias cepas ligninolíticas, mostraron modificaciones de dos tipos diferentes en comparación al control (Figuras 2 y 3). En el caso de las cepas 14 y 58, se observó en los primeros estadios de la incubación una polimerización de la lignina Kraft, aunque el pico de mayor peso molecular fue parcialmente metabolizado en el transcurso del tiempo (Figura 2).

Por el contrario, otras cepas tales como la 158, 441 y *P. chrysosporium* despolimerizaron rápidamente la lignina (Fig. 3). En efecto, en este caso se observó la presencia de tres picos. El primero corresponde al de la lignina no tratada, el segundo a un PM  $\approx$  500 D y el último (PM = 168 D) corresponde a compuestos de peso molecular similar al alcohol veratrílico, usado como estándar. El primer y tercer pico disminuyen en el tiempo, resultado de la despolimerización y/o consumo de éstos; concomitantemente, el pico de PM  $\approx$  500 tiende a aumentar.

#### DISCUSION

La determinación de actividad ligninasa mediante los ensayos espectrofotométricos y cromatográficos permitieron evidenciar la presencia de ligninasas en varias de las cepas ensayadas, constituyéndose las cepas 158 y 441 en las más interesantes en cuanto a la producción de enzimas. Resulta importante resaltar que para *Phanerochaete chrysosporium* las condiciones necesarias para la producción de enzimas ligninolíticas requieren de un medio estático y de una atmósfera de 100% de O<sub>2</sub> (Jager y col., 1985; Leisola y Fiechter, 1985), aunque recientemente se ha alcanzado un buen nivel en la producción enzimática bajo condiciones levemente agitadas (120 rpm) (Faison y Kirk, 1985). No así en las cepas nativas, donde la mayor actividad ligninasa se alcanzó en un medio agitado (200 rpm) y bajo atmósfera de aire (21% O<sub>2</sub>). Sin embargo, los niveles alcanzados son bajos, en parte por el hecho que las condiciones empleadas en la caracterización de dichos hongos (medios de cultivo, inductores, etc.) corresponden a condiciones optimizadas para *P. chrysosporium*, las cuales no son necesariamente las óptimas para la producción de enzimas ligninolíticas para las cepas nativas aisladas.

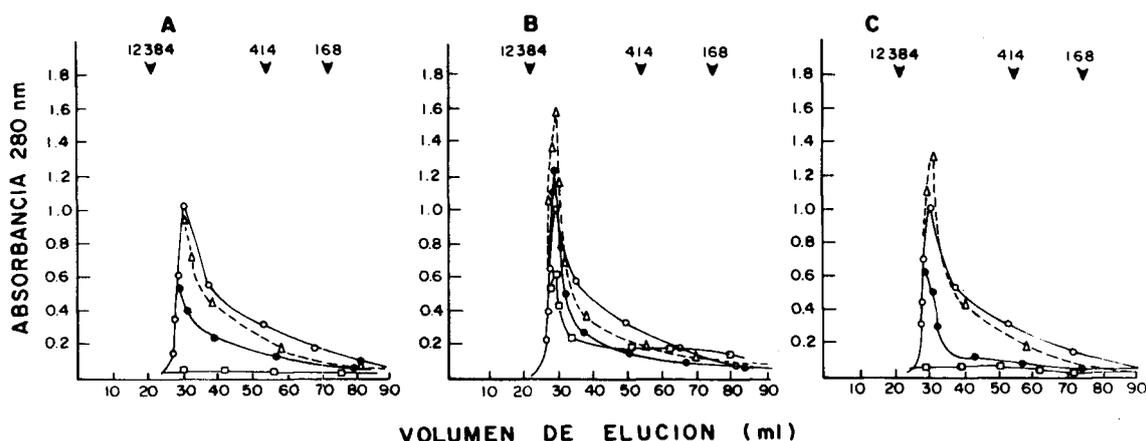


Fig. 2: Perfiles de elución en Sephadex G-50 de lignina Kraft antes (o) después de 24 ( $\Delta$ ), 72 ( $\square$ ) y 144 ( $\square$ ) horas de incubación con las cepas 8 (A), 14 (B) y 58 (C). Fase móvil: NaOH/LiCl 0,1 N (1 : 1).

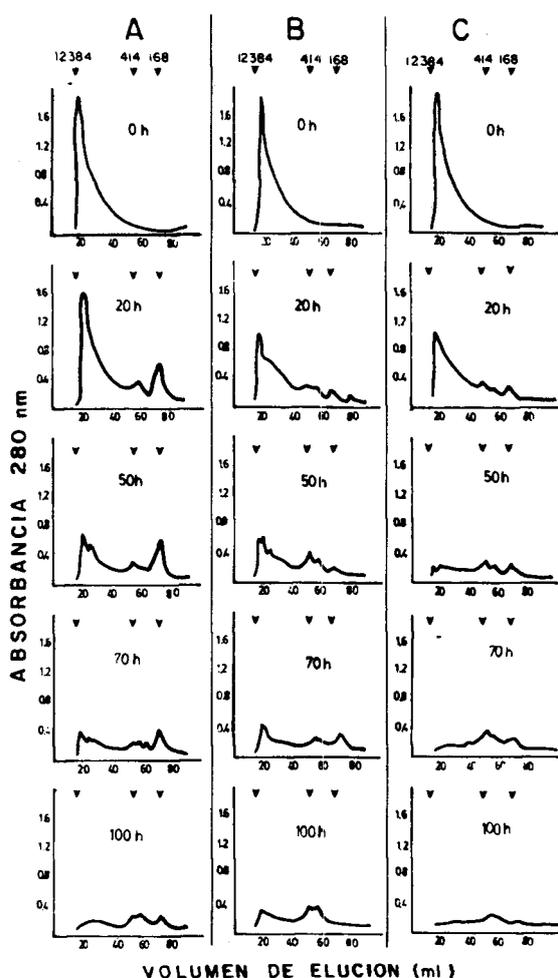


Fig. 3: Perfiles de elución en Sephadex G-50 de lignina Kraft antes y después de 20, 50, 70 y 100 horas de incubación con las cepas 158 (A), 441 (B) y *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 (C) Fase móvil: NaOH/LiCl 0,1 N (1 : 1).

El alcohol veratrílico es un metabolito secundario secretado por *P. chrysosporium* al cual se le han atribuido varias funciones diferentes con respecto a su participación en el sistema ligninolítico de este hongo (Faison y col., 1986; Harvey y col., 1986; Tonon y Odier, 1988). La detección de alcohol veratrílico sintetizado *de novo* en la mayoría de las cepas recolectadas constituyó un hallazgo importante, pues hasta ahora esta característica estaba confinada sólo a un par de hongos intensamente estudiados en otros centros de investigación, *Phanerochaete chrysosporium* y *Coriolus versicolor*. Este hecho sugiere la existencia de un mecanismo común para esta clase de hongos ligninolíticos. A pesar que la mayoría de las cepas aisladas produjo alcohol veratrílico en metabolismo secundario junto con ligninasa, hubo algunas en las cuales sólo se detectó alcohol veratrílico pero no ligninasa (cepas 20, 14 y 58); en cambio, en otras, se detectó ligninasa pero no el alcohol (cepas 8, 178 y 310), aunque para estas últimas se detectó aldehído. Este último hecho sugiere que dichas cepas tendrían una actividad lignina peroxidasa elevada, lo que explicaría que no se haya podido evidenciar el sustrato (en este caso el alcohol). Sin embargo, también es posible que la actividad aril alcohol oxidasa sea la responsable de esta acción (Bourbonnais y Paice, 1988; Guillen, F. 1989, comunicación personal). Este podría ser el caso de la cepa 310, por ejemplo, para la cual al segun-

do día después de entrar a metabolismo secundario se observó la presencia de aldehído verátrico, exclusivamente (producto de la oxidación del alcohol verátrico por la ligninasa). Más aún, la secreción limitada de este metabolito podría explicar en parte el hecho que la actividad ligninasa disminuya en forma tan pronunciada luego de alcanzar su actividad máxima. En efecto, Tonon y Odier (1988) mostraron que este compuesto protege de la desnaturación de algunas de las isoenzimas de lignina peroxidasa secretadas por el hongo *P. chrysosporium*.

Los resultados de degradación de la fracción purificada de alto peso molecular de lignina Kraft muestran diferencias significativas en función de la capacidad que tienen las cepas estudiadas de producir o no ligninasas, junto a lacasa. En efecto, la mayor parte de los hongos seleccionados producen lacasa, pero sólo algunas cepas son capaces de secretar al medio lignina peroxidasa. Estas últimas son las únicas capaces de despolimerizar significativamente la lignina. Por el contrario, aquellas cepas que sólo poseen actividad lacasa, producen la polimerización de la lignina. Considerando que la incubación de lignina en presencia de una fracción purificada de ligninasa también conduce a un aumento en el peso molecular del polímero aromático (Haemmerli y col., 1986), como consecuencia de la generación y posterior acoplamiento de grupos fenólicos resultantes de la oxidación peroxidásica (Harvey y col., 1985, 1986; Kersten y col., 1985; Schoemaker y col., 1985), postulamos que la lacasa tiene un rol de "destoxicación enzimática", oxidando los grupos fenólicos presentes en el polímero de lignina, así como aquellos producidos durante la acción de la ligninasa. Esto permitiría por una parte evitar la acción polimerizante de la ligninasa por abstracción de los grupos fenólicos generados, y por otra parte mantener una acción prolongada de esta peroxidasa en el tiempo, ya que estos compuestos fenólicos son tóxicos para la enzima (Harvey y col., 1989; Schoemaker, 1990).

#### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos en forma especial a la CONAF X Región, Chile, por su asistencia desinteresada y permanente en el

terreno durante la recolección de muestras. Este trabajo fue financiado por los siguientes proyectos: Fondo de Desarrollo Universidad de Chile (Biodegradación y Aprovechamiento de Recursos LignoCelulósicos), Fondo de Ciencia y Tecnología (FONDECYT 0812/86) y PNUD CHI/87/021.

#### REFERENCIAS

- AGOSIN, E.; MONTIES, B. & ODIER, E. (1985) Structural changes in wheat straw component during decay by lignin-degrading white-rot fungi in relation to improvement of digestibility for ruminants. *J. Sci. Food Agric.* 36: 925-935.
- AGOSIN, E.; BLANCHETTE, R.; SILVA, H.; LAPIERRE, C.; CEASE, K.; IBACH, R.; ABAD, A. & MUGA, P. (1990) Characterization of Palo Podrido: A Natural Process of Delignification in Wood. *Appl. Env. Microbiol.* 56: 65-74.
- ANDER, P. & ERIKSSON, K.E. (1976) The importance of phenoloxidase activity in lignin degradation by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Arch. Microbiol.* 109: 1-8.
- BAVENDAMM, W. (1928) Über das Vorkommen und für Nachweis von Oxydasen bei holzerstörenden Pilzen. *Z. Pflanzenkrankh.* 38: 257-276.
- BOURBONNAIS, R. & PAICE, M.G. (1988) Veratryl alcohol oxidases from the lignin degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. *Biochem. J.* 255: 445-450.
- DILL, I. & KRAEPELIN, G. (1986) Palo Podrido: Model for extensive delignification of wood by *Ganoderma applanatum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 1305-1312.
- FAISON, B.D. & KIRK, T.K. (1985) Factors involved in the regulation of a ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Env. Microbiol.* 49: 299-304.
- FAISON, B.D.; KIRK, T.K. & FARRELL, R.L. (1986) Role of veratryl alcohol in regulating ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 251-254.
- FARRELL, R.L.; MURTAGH, K.E.; TIEN, M.; MOZUCH, M.D. & KIRK, T.K. (1989) Physical and enzymatic properties of lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microb. Technol.* 11: 322-328.
- FENN, P. & KIRK, T.K. (1981) Relationship of nitrogen to the onset and suppression of ligninolytic activity and secondary metabolism in *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* 130: 59-65.
- GLENN, J.K.; MORGAN, M.A.; MAYFIELD, M.B.; KUWAHARA, M. & GOLD, M.H. (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. Commun.* 114: 1077-1083.
- GLENN, J.K. & GOLD, M.H. (1983) Decolorization of several polymeric dyes by the lignin degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1741-1747.
- GONZALEZ, A.; GRINBERGS, J. & GRIVA, E. (1986) Biological transformation of wood into feed for cattle-"Palo Podrido". *Zentralbl. Mikrobiol.* 141: 181-186.
- GRIFFIN, D.H. (1981). In: *Fungal Physiology* (Wiley).
- HAEMMERLI, S.D.; LEISOLA, M.S.A. & FIECHTER, A. (1986) Polymerization of lignins by ligninases from *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS. Microbiol. Lett.* 35: 33-36.

- HAMMEL, K.E.; TIEN, M.; KALYANARAMAN, B. & KIRK, T.K. (1985) Mechanism of oxidative C-C cleavage of a lignin model dimer by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase: stoichiometry and involvement of free radicals. *J. Biol. Chem.* 260: 8348-8353.
- HAMMEL, K.E.; KALYANARAMAN, B. & KIRK, T.K. (1986) Substrate free radicals are intermediates in ligninase catalysis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 83: 3708-3712.
- HARKIN, J.M. & OBST, J.R. (1973) Syringaldazine, an effective reagent for detecting laccase and peroxidase in fungi. *Experientia.* 29: 381-387.
- HARVEY, P.J.; SCHOEMAKER, H.E.; BOWEN, R.M. & PALMER, J.M. (1985) Single-electron transfer processes and the reaction mechanism of enzymic degradation of lignin. *FEBS Letters.* 183: 13-18.
- HARVEY, P.J.; SCHOEMAKER, H.E. & PALMER, J.M. (1986) Veratryl alcohol as a mediator and the role of radical cations in lignin biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters.* 195: 242-246.
- HARVEY, P.J.; DODSON, A.P.J.; GOBLE, M.L.; OBANDA, A.M. & PALMER, J.M. (1989) The Influence of Phenolics on the Enzymatic Degradation of Lignin. In: *Fourth International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry*, Raleigh, North Carolina, pp. 107.
- HATAKKA, A.; LUNDELL, T.; MOHAMMADI, O. & TERVILA-WILO, A.L.M. (1989) Activities of lignin-degrading enzymes of the white-rot fungus *Phlebia radiata*: lignin model compound studies. In: *Fourth International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry*, Raleigh, North Carolina, pp. 108-109.
- HUYNH, V.-B. & CRAWFORD, R.L. (1985) Novel extracellular enzymes (ligninases) of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Env. Microbiol.* 50: 1274-1278.
- ISHIHARA, T. & MIYAZAKI, M. (1972) Oxidation of Milled wood lignin by fungal laccase. *Mokuzai Gakkaishi.* 18: 415-419.
- JAGER, A.; CROAN, S. & KIRK, T.K. (1985) Production of ligninases and degradation of lignin in agitated submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Env. Microbiol.* 50: 1274-1278.
- KERSTEN, P.J.; TIEN, M.; KALYANARAMAN, B. & KIRK, T.K. (1985) The ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* generates cation radicals from methoxybenzenes. *J. Biol. Chem.* 260: 2609-2612.
- KEYSER, P.; KIRK, T.K. & ZEIKUS, J.G. (1978) Ligninolytic enzyme system of *Phanerochaete chrysosporium* synthesized in absence of lignin in response to nitrogen starvation. *J. Bacteriol.* 135: 790-797.
- KIRK, T.K. & FENN, P. (1982) Formation and action of the ligninolytic system in basidiomycetes. In: *Decomposer Basidiomycetes*, British Mycological Society Symposium IV, (Franland, A.; Hedges, L. and Swift, B., eds.), pp. 67-90. Cambridge University Press, Cambridge.
- KIRK, T.K. & SHIMADA, M. (1985) Lignin Biodegradation: The microorganisms involved and the physiology and biochemistry of degradation by white-rot fungi. In: *Biosynthesis and Biodegradation of wood components* (Higuchi, T., ed.), pp. 579-605, Academic Press, San Diego.
- KIRK, T.K.; TIEN, M.; CROAN, S.; MURTAGH, K.E. & FARRELL, R.L. (1986) Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microb. Technol.* 8: 27-32.
- KIRK, T.K. & FARRELL, R.L. (1987) Enzymatic Combustion: The Microbial Degradation of Lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* 41: 465-505.
- KUWAHARA, M.; GLEN, J.K.; MORGAN, M.A. & GOLD, M.H. (1984) Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters.* 169: 247-250.
- LAZO, W. (1983) Introducción al estudio de los hongos superiores II. *Boletín Micológico.* 1: 77-119.
- LAZO, W. (1984) Introducción al estudio de los hongos superiores III. *Boletín Micológico.* 2: 27-66.
- LEISOLA, M.; DUANE, C.; ULMER, D.; WALDNER, R. & FIECHTER, A. (1984) Role of veratryl alcohol in lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biotechnol.* 1: 331-339.
- LEISOLA, M.S.A. & FIECHTER, A. (1985). Ligninase production in agitated conditions by *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 29: 33-36.
- LUNDQUIST, K.; KIRK, T.K. (1978) De novo synthesis and decomposition of veratryl alcohol by a lignin-degrading basidiomycete. *Phytochemistry* 17: 1676.
- LUNDQUIST, K. & KIRK, T.K. (1980) Fractionation-purification of an industrial Kraft lignin. *Tappi J.* 63: 80-82.
- PASZCZYNSKI, A; HUYNH, V.-B. & CRAWFORD, R. (1986) Comparison of Ligninase-I and Peroxidase-M2 from the White-Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* 244: 750-765.
- SHIMADA, M.; NAKATSUBO, F.; KIRK, T.K. & HIGUCHI, T. (1981) Biosynthesis of the secondary metabolite veratryl alcohol in relation to lignin degradation in *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* 129: 321-324.
- SCHOEMAKER, H.E.; HARVEY, P.J.; BOWEN, R.M. & PALMER, J.M. (1985) On the mechanism of enzymatic lignin breakdown. *FEBS Letters.* 183: 7-12.
- SCHOEMAKER, H.E. (1990). In *Biotechnology for Pulp and Paper Manufacturing* (Kirk, T.K. & Chang, H.-M. Eds.) en prensa.
- TIEN, M. & KIRK, T.K. (1983) Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Science.* 221: 661-663.
- TONON, F. & ODIER, E. (1988) Influence of veratryl alcohol and hydrogen peroxide on ligninase activity and ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 466-472.
- ZADRAZIL, F.; GRINBERGS, J. & GONZALEZ, A. (1982). "Palo Podrido" - Decomposed wood used as feed. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 15: 167-171.