

Mario Carlos Nazareno Saparrat¹, María Jesús Martínez²
Ángel Tomás Martínez², Angélica Margarita Arambarri¹

¹Instituto de Botánica Spegazzini, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, 53 no. 477, 1900-La Plata, Argentina.

²Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Velázquez no. 144, 28006-Madrid, España.

Degradation of β -sitosterol by lignivorous basidiomycetes in liquid culture and their relation with the extracellular ligninolytic enzyme production

Abstract: The degradation of β -sitosterol, a model compound of *Eucalyptus globulus* wood extractives and the "pitch" deposits from paper mills, by different lignivorous basidiomycetes in liquid culture and the ligninolytic enzyme activity related, was analyzed. While *Bjerkandera adusta* and *Corioloopsis rigida* transformed all β -sitosterol (200 μ M) supplemented to culture after 5 days of incubation, *Phlebia radiata*, *Pleurotus pulmonarius* and *Poria subvermispota* transformed it in percentages lower than 50 % after same time interval. Except *C. rigida*, the strains used showed extracellular ligninolytic enzyme activity in liquid cultures supplemented with β -sitosterol.

Key words: basidiomycetes, β -sitosterol, ligninolytic enzymes, biotechnology potential, biotransformation.

Resumen: Se analizó la degradación de β -sitosterol, un compuesto modelo de los extractivos de la madera de *Eucalyptus globulus* y los depósitos de "pitch" de industrias papeleras, por diferentes basidiomycetes lignívoros en cultivo líquido y la actividad enzimática ligninolítica asociada. Mientras que *Bjerkandera adusta* y *Corioloopsis rigida* transformaron todo el β -sitosterol (200 μ M) suplementado al cultivo después de 5 días de incubación, *Phlebia radiata*, *Pleurotus pulmonarius* y *Poria subvermispota* sólo lo transformaron en porcentajes menores al 50 % después del mismo intervalo de tiempo. Excepto *C. rigida*, las cepas analizadas manifestaron actividad enzimática ligninolítica extracelular en los cultivos líquidos suplementados con β -sitosterol.

Palabras clave: basidiomycetes, β -sitosterol, enzimas ligninolíticas, potencial biotecnológico, biotransformación.

Received 2 February 2004; accepted 1 October 2004.

Recibido 2 febrero 2004; aceptado 1 octubre 2004.

Introducción

Los extraíbles de la madera incluyen un amplio espectro de compuestos lipofílicos, entre otros, ácidos grasos, compuestos esteroides, glicéridos, polifenoles y resinas [7,18]. Estos compuestos causan diferentes problemas operacionales y pérdidas en la producción de pulpa para papel, relacionados con la coloración de las pulpas, la toxicidad de los efluentes y la acumulación de estos

compuestos lipofílicos en las pastas y maquinarias de las industrias papeleras (depósitos denominados genéricamente "pitch"), lo cual conduce a la obtención de productos de baja calidad [13]. La madera de *Eucalyptus globulus* Labill. es extensivamente utilizada como materia prima para la obtención de pulpa para papel - pasta kraft - en diferentes países de Iberoamérica [10]. La caracterización de los extractivos de la madera de *E. globulus* y los depósitos de pitch asociados a procesos industriales libres de Cl_2 que utilizan este tipo de madera, ha revelado al β -sitosterol libre y

Autor para correspondencia: Mario Saparrat
masaparrat@yahoo.com.ar

esterificado, como el principal componente responsable de estos depósitos [5]. La búsqueda de tecnologías de bajo costo y poco contaminantes para la obtención de pulpa para papel, basadas en la utilización de organismos, constituye un tópico de actual análisis [10]. Diferentes reportes revelan la potencialidad biotecnológica de los basidiomycetes lignívoros en la delignificación y remoción de extraíbles de la madera [10,18]. Sin embargo, no existe información sobre la capacidad de este grupo fúngico para transformar β -sitosterol en cultivo líquido, los mecanismos involucrados en su degradación y su relación con el sistema enzimático implicado en la degradación de lignina. En este trabajo se analizó la habilidad de diferentes basidiomycetes lignívoros, *Bjerkandera adusta*, *Corioloopsis rigida*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus pulmonarius* y *Poria subvermispora*, para degradar β -sitosterol en cultivos líquidos, y su relación con la producción de enzimas ligninolíticas extracelulares.

Materiales y métodos

Cepas fúngicas

Se utilizaron los siguientes basidiomycetes lignívoros: *B. adusta* CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Holanda) 230.93, *C. rigida* LPSC (colección de cultivos del Instituto Spegazzini, Argentina) 232, *P. radiata* CBS 184.83, *P. pulmonarius* CBS 507.85 y *P. subvermispora* CBS 347.63. Estas cepas se mantuvieron a 4 °C en estrías de un medio agarizado con 2 % (p/v) de extracto de malta suplementado con extracto de levadura (0.4 %).

Cultivo líquido y métodos analíticos

Las cepas fúngicas se cultivaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad conteniendo 100 ml de medio Czapek Dox modificado suplementado con 0.5 % de peptona [17] (medio basal) y se incubaron bajo agitación (150 rpm) a 28±,5 °C. Los cultivos se realizaron por triplicado. Se utilizó como

inóculo, una suspensión miceliar obtenida según el método de Saparrat *et al.* [21]. Posteriormente, se adicionó a los cultivos de 4 días β -sitosterol (200 μ M, Sigma), en presencia de Tween 80 y acetona (concentración final 0.05% y 1%, respectivamente), reincubándose durante 5 días adicionales de cultivo. Se realizaron controles con cultivos de 4 días de incubación, esterilizados 121 °C/15 min y suplementados con β -sitosterol. Se tomaron muestras (5 ml de cultivo) periódicamente de cada muestra, las cuáles se extrajeron con cloroformo (3x), se evaporaron en corriente de N₂ y después de solubilizar en metanol se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando una columna de fase reversa (Spherisorb S50/DS2 de Hichrom), a 40 °C, metanol como fase móvil a un flujo 1 ml/min y una longitud de onda de detección de 209 nm. Se cuantificó el β -sitosterol a través del área de su respectivo pico; su tiempo de retención y la relación entre área-concentración se determinó empleando una serie de soluciones estándar de β -sitosterol analizadas bajo las mismas condiciones de trabajo. Se confirmó la transformación fúngica del β -sitosterol, analizando los extractos clorofórmicos por cromatografía gaseosa-espectrometría de masas (GC-MS) [18]. Las determinaciones se realizaron por triplicado. Paralelamente, siguiendo la metodología de Saparrat *et al.* [21], se valoraron actividades enzimáticas ligninolíticas extracelulares (aril-alcohol oxidasa, AAO; lacasa; lignina peroxidasa, LiP; manganeso peroxidasa, MnP; y peroxidasa independiente de manganeso, PIM) en los diferentes cultivos sobre medio basal con β -sitosterol y cultivos control (sin β -sitosterol). Se determinó la concentración de los azúcares reductores del medio de cultivo según el método de Somogyi & Nelson [23].

Resultados y discusión

Los cultivos de las diferentes cepas analizadas sobre medio basal después de 4 días de incubación revelaron niveles de

azúcares reductores menores a 10 mM. Los sistemas ligninolíticos fúngicos, incluyen oxidorreductasas extracelulares, como lacasas y peroxidasas ligninolíticas, oxidasas productoras de peróxido de hidrógeno, metabolitos de bajo peso molecular y especies activas de oxígeno [22]. Este sistema enzimático revela su expresión en asociación con el metabolismo secundario [3,19,24]. La suplementación de β -sitosterol en estos cultivos se realizó con la finalidad de analizar la capacidad de diferentes basidiomycetes lignívoros para degradar β -sitosterol y su relación con la producción de enzimas ligninolíticas extracelulares.

Todos los cultivos fúngicos analizados transformaron β -sitosterol, revelando su máxima velocidad de transformación durante las primeras 24 h después de suplementado el esteroil (Fig. 1). Similares cinéticas de transformación de los extraíbles lipofílicos de la madera de *E. globulus*, incluyendo β -sitosterol libre y esterificado, se observaron en estas cepas bajo condiciones de fermentación en estado sólido [18,19]. No obstante, las diferentes cepas analizadas revelaron diferentes porcentajes de desaparición de β -sitosterol bajo cultivo líquido. *B. adusta* y *C. rigida* transformaron todo el β -sitosterol (200 μ M) después de 5 días de suplementado. *P. radiata*, *P. pulmonarius* y *P. subvermispora* sólo transformaron el β -sitosterol en porcentajes menores al 50% después de 5 días de suplementado al cultivo. Tratamientos control con micelio estéril suplementado con β -sitosterol, no mostraron transformación de β -sitosterol bajo las condiciones empleadas en este trabajo. El análisis GC-MS de los extractos clorofórmicos de cultivos suplementados con β -sitosterol a diferentes tiempos, confirmó la capacidad fúngica de transformación de este esteroil bajo condiciones de cultivo líquido (datos nos mostrados). Paralelamente a la desaparición del β -sitosterol en estos cultivos después de 5 días de suplementado, se detectaron algunos esteroides aún no identificados. Estos pueden ser intermediarios en el proceso de transformación del β -sitosterol, dado que no

fueron detectados en cultivos fúngicos no suplementados con β -sitosterol ni en los cultivos control (con micelio estéril y suplementado con β -sitosterol). Similarmente, Marsheck *et al.* [16] reportaron la producción de diferentes compuestos esteroides durante la degradación de esteroides, incluyendo β -sitosterol, por cultivos bacterianos (*Mycobacterium sp.*).

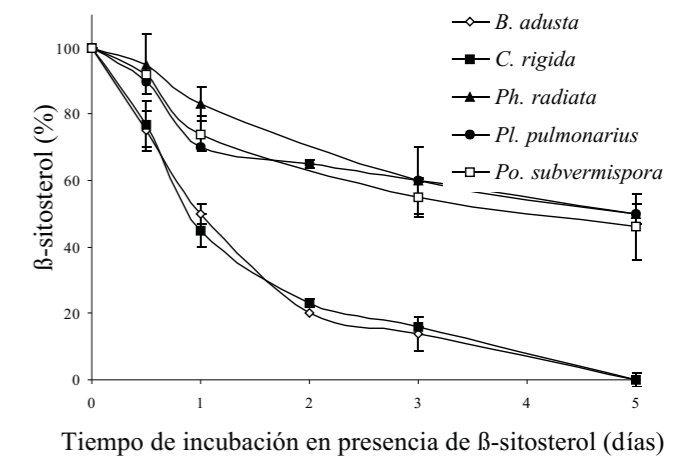


Figura 1. Degradación de β -sitosterol por diferentes *Basidiomycetes* lignívoros en cultivos líquidos. Los datos son el promedio de 3 repeticiones; la barra indica la desviación standard.

Los niveles de diferentes actividades enzimáticas ligninolíticas y AAO se valoraron durante la cinética de transformación de β -sitosterol. Se detectaron actividades extracelulares de AAO, lacasa y MnP en los cultivos líquidos de diferentes hongos analizados previo y posteriormente a la suplementación de β -sitosterol (Fig. 2). No obstante, la suplementación de este esteroil en los cultivos no provocó diferencias en el tipo y niveles de actividades enzimáticas detectadas con respecto a cultivos sin β -sitosterol (datos no mostrados). Excepto en los cultivos de *C. rigida*, la actividad lacasa extracelular libre se observó en todos los cultivos analizados, con niveles máximos en los cultivos de *P. subvermispora* (60 mU/ml). Sólo se detectó actividad AAO en los sobrenadantes extracelulares de *P. pulmonarius* con niveles máximos de 1 U/ml después 7 días de cultivo. Por otro lado, *B. adusta* y *P. pulmonarius* revelaron también actividad MnP extracelular. Estas especies fúngicas están

caracterizadas por sus peroxidases ligninolíticas con capacidad para oxidar Mn^{+2} , sustratos fenólicos y no fenólicos, no requiriendo el Mn^{+2} para cerrar su ciclo catalítico [4,9,11]. Con relación al perfil de las actividades enzimáticas en los cultivos suplementados con β -sitosterol, se observaron incrementos en los niveles de actividad lacasa y MnP extracelular en asociación con la transformación del estero. Trabajos previos [2, 6,15] reportaron la participación de las lacasas y peroxidases fúngicas en la oxidación de diferentes compuestos esteroides y en la transformación de extractivos lipofílicos de la madera. La detección de actividad lacasa y peroxidasa extracelular como componente enzimático ligninolítico en asociación a cultivos degradadores de β -sitosterol, sustenta la posible participación de estas enzimas en la transformación y degradación de este estero. No obstante, se observó la transformación de β -sitosterol en cultivos de *C. rigida*, los cuales no revelaron actividad ligninolítica extracelular libre. Trabajos previos muestran la producción de bajos niveles de actividad lacasa extracelular en cultivos de *C. rigida* sobre medio Czapek Dox modificado suplementado con peptona bajo agitación [20]. Asimismo, diferentes estudios reportan la inmovilización de las enzimas ligninolíticas en la vaina de polisacáridos asociada a la pared fúngica y la consecuente ausencia de actividad enzimática en los sobrenadantes de cultivos líquidos [1,8,24]. Las lacasas y peroxidases extracelulares revelan actividad catalítica sobre un amplio rango de compuestos, incluyendo unidades de lignina, químicos aromáticos simples y xenobióticos recalcitrantes [12,14,20,25]. La naturaleza oxidativa e inespecífica de estas enzimas determina la capacidad de sus hongos productores para despolimerizar, transformar y degradar lignina y otros compuestos recalcitrantes. La capacidad de *C. rigida* para alcanzar similares cinéticas de transformación de β -sitosterol en ausencia de actividad enzimática ligninolítica libre sugiere la existencia de otros componentes fúngicos involucrados en el proceso y/o la posible inmovilización de estas enzimas en su vaina de

polisacáridos. La capacidad de producción de lacasas con baja especificidad de sustrato por *C. rigida* y la existencia y proposición de diferentes mecanismos mediadores y estrategias ligninolíticas (mediante las cuales los hongos generan agentes mediadores de bajo peso molecular con alta acción oxidativa), podría determinar la transformación de β -sitosterol en los cultivos líquidos de *C. rigida* analizados en este trabajo.

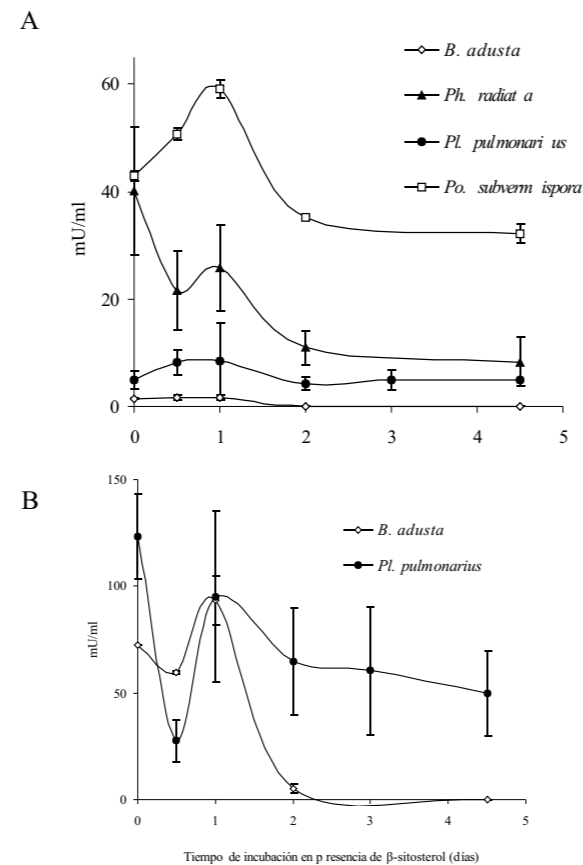


Figura 2. Actividades extracelulares libres de lacasa (A) y MnP (B) en cultivos líquidos de diferentes *Basidiomycetes* lignívoros. Los datos son el promedio de 3 repeticiones; la barra indica la desviación standard.

La capacidad de los diferentes basidiomycetes analizados para transformar el β -sitosterol en cultivo líquido, sugiere un potencial biotecnológico de estas cepas en el control de los depósitos de pitch de las industrias papeleras así como en la remoción de extraíbles de la madera de *E. globulus*.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Dra. Marta N. Cabello (CIC, Instituto Spagazzini, Fac. Cs. Naturales y Museo UNLP) y al Dr. Ricardo J. Pollero (CIC, INIBIOLP, Fac. Cs. Médicas, UNLP) por sus valiosas sugerencias y por la lectura crítica del manuscrito. Mario C. N. Saparrat es becario de postgrado de CONICET. Angélica M. Arambarri es investigador de CONICET. Este trabajo se realizó en el marco del proyecto europeo "New environmentally-sound methods for pitch control in different paper pulp manufacturing processes "QLK5-99-1357" y con fondos de CONICET, Argentina.

Literatura citada

- Bell, A.A., M. H. Wheeler, 1986. Biosynthesis and functions of fungal melanins. Annual Review of Phytopathology 24: 411-451.
- Buchert, J., A. Mustranta, H. Kontkanen, S. Karlsson, M. Tenkanen, B. Holmbom, 2001. Enzymatic control of wood extractives. Proceedings of the 11th International Symposium on Wood and Pulp Chemistry 3: 375-378.
- Buswell, J.A., 1991. Fungal degradation of lignin. In: Arora, D.K., B. Rai, K.G. Mukerji, GR. Knudsen (eds.), Handbook of Applied Mycology, Vol. 1: Soil and Plants. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 425-480.
- Camarero, S., S. Sarkar, F.J. Ruiz-Dueñas, M.J. Martínez, A.T. Martínez, 1999. Description of a versatile peroxidase involved in natural degradation of lignin that has both Mn-peroxidase and lignin-peroxidase substrate binding sites. Journal of Biological Chemistry 274: 10324-10330.
- del Río, J.C., A. Gutiérrez, F.J. González-Vila, 1999. Analysis of impurities occurring in a totally-chlorine free-bleached kraft pulp. Journal of Chromatography A 830: 227-232.
- del Río, J.C., A. Gutiérrez, M.J. Martínez, A.T. Martínez, 2002. Identification of a novel series of alkylitaconic acids in wood cultures of *Ceriporiopsis subvermispora* by gas chromatography/mass spectrometry. Rapid Communication on Mass Spectrometry 16: 62-68.
- del Río, J.C., J. Romero, A. Gutiérrez, 2000. Analysis of pitch deposits produced in Kraft pulp mills using a totally chlorine free bleaching sequence. Journal of Chromatography A 874: 235-245.
- Evans, C.S., 1991. Enzymes of lignin degradation. In: Betts, W.B. (ed.), Biodegradation: Natural and Synthetic Materials. Springer-Verlag, Berlin, pp. 175-184.
- Gold, M.H., H.L. Youngs, M.D. Gelpke, 2000. Manganese peroxidase. Metal Ions in Biological Systems 37: 559-586.
- Gutiérrez, A., J.C. del Río, M.J. Martínez, A.T. Martínez, 1999. Fungal degradation of lipophilic extractives in *Eucalyptus globulus* wood. Applied and Environmental Microbiology 65: 1367-1371.
- Heinfling, A., F.J. Ruiz-Dueñas, M.J. Martínez, M. Bergbauer, U. Szewzyk, A.T. Martínez, 1998. A study on reducing substrates of manganese-oxidizing peroxidases from *Pleurotus eryngii* and *Bjerkandera adusta*. FEBS Letters 428: 141-146.
- Heinzkill, M., K. Messner, 1997. The ligninolytic system of fungi. In: Anke, T. (ed.), Fungal Biotechnology, Cap. 8. Chapman & Hall, Weinheim, pp. 213-227.
- Hillis, W.E., M. Sumimoto, 1989. Effect of extractives on pulping. In: Rowe, J.W. (ed.), Natural Products of Woody Plants II. Springer-Verlag, Berlin, pp. 880-920.
- Johannes, C., A. Majcherczyk, 2000. Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. Applied and Environmental Microbiology 66: 524-528.
- Lugaro, G., G. Carrea, P. Cremonesi, M.M. Casellato, E. Antonini, 1973. The oxidation of steroid hormones by fungal laccase in emulsion of water and organic solvents. Archives of Biochemistry and Biophysics 159: 1-6.
- Marsheck, W.J., S. Kraychy, R.D. Muir, 1972. Microbial degradation of sterols. Applied Microbiology 23: 72-77.
- Martínez, M.J., F.J. Ruiz-Dueñas, F. Guillén, A.T. Martínez, 1996. Purification and catalytic properties of two manganese-peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. European Journal of Biochemistry 237: 424-432.
- Martínez, M.J., J.M. Barrasa, A. Gutiérrez, J.C. del Río, A.T. Martínez, 1999. Fungal screening for biological removal of extractives from *Eucalyptus globulus* wood. Canadian Journal of Botany 77: 1513-1522.
- Saparrat, M.C.N., 2000. Estudio de la producción de lacasas fúngicas extracelulares en diferentes cepas autóctonas. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Argentina, La Plata.
- Saparrat, M.C.N., F. Guillén, A.M. Arambarri, A.T. Martínez, M.J. Martínez, 2002. Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white-rot basidiomycete *Corioliopsis rigida*. Applied and Environmental Microbiology 68: 1534-1540.
- Saparrat, M.C.N., M.J. Martínez, M.N. Cabello, A.M. Arambarri, 2002. Screening for ligninolytic enzymes in autochthonous fungal strains from Argentina isolated from different substrata. Revista Iberoamericana de Micología 19: 181-185.
- Schoemaker, H.E., 1990. On the chemistry of lignin degradation. Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas 109: 255-272.
- Somogyi, M., 1945. A new reagent for determination of sugars. Journal of Biological Chemistry 160: 61-73.
- Szklarz, G.D., R.K. Antibus, R.L. Sinsabaugh, A.E. Linkins, 1989. Production of phenol oxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. Mycologia 81: 234-240.
- Wong, Y., J. Yu, 1999. Laccase-catalysed decolorization of synthetic dyes. Water Research 33: 3512-3520.