

Determinación de la cinética de crecimiento del hongo *Phanerochaete chrysosporium* en residuos lignocelulósicos y determinación de la actividad ligninoperoxidásica

Yadira Villa y Neyda Espín

Laboratorio de Bioprocesos

Departamento de Ciencia de Alimentos y Biotecnología

neyda.espin@epn.edu.ec

Resumen

El objetivo del trabajo fue la determinación de la cinética de crecimiento del hongo *Phanerochaete chrysosporium* en residuos lignocelulósicos por fermentación en medio sólido a escala de laboratorio y la determinación de la actividad ligninoperoxidásica en los extractos. La primera parte del trabajo consistió en la selección de los inóculos (en caja Petri) más adecuados para la producción de enzimas ligninolíticas, para esto se determinó la cinética de crecimiento del hongo en tres medios de cultivo: papa dextrosa agar (PDA); papa dextrosa agar con adición de aserrín (PDA+ASE) y malta glucosa agar con adición de aserrín (MGA+ASE). Los medios que favorecieron el crecimiento del hongo fueron PDA y PDA+ASE, con tiempos de duplicación muy parecidos y casi la mitad del tiempo de duplicación del hongo en MGA+ASE.

Estos dos inóculos fueron empleados para la determinación de la cinética de crecimiento y la producción de enzimas ligninoperoxidásicas por fermentación en medio sólido, en dos sustratos: aserrín y tallos de morera. Simultáneamente, se estudió el efecto de la adición de aserrín en la obtención del inóculo. Los resultados indicaron que los inóculos en PDA+ASE permitían que el hongo tenga un mejor crecimiento en los dos sustratos estudiados, tanto aserrín como tallos de morera. La fase de crecimiento exponencial duró hasta el noveno día de fermentación. En cuanto a la actividad ligninoperoxidásica, se encontró que en los dos sustratos la enzima se producía desde el primer día, y en aserrín la actividad de la enzima fue mayor que en los tallos de morera. De igual manera, el inóculo PDA+ASE favoreció la producción de la enzima.

Palabras claves: enzimas, ligninoperoxidasas, *Phanerochaete chrysosporium*, cinética microbiana.

Abstract

The aim of this project was to determine the growth kinetics of fungi *Phanerochaete chrysosporium* and presence of ligninoperoxidase during a solid fermentation using agroindustrial wastes: sawdust, and morera wood. The first step was to select the best inoculums based on the growth of the fungi. Three media were used: potato dextrose agar (PDA), potato dextrose agar plus sawdust (PDA+ASE), and malt glucose agar plus sawdust (MGA+ASE). Media PDA and PDA+ASE showed the best result for growing *Phanerochaete chrysosporium*, with similar generation time, while MGA+ASE allowed the fungi to growth but with largest times of generation, therefore PDA and PDA+ASE were used for the solid fermentation. For this part of the study, two substrates were used: sawdust and morera wood wastes. Growth kinetics was determined by quantification of nucleic acids. It was found that fungi grows faster when PDA+ASE is used as inoculum in both substrates. The enzyme ligninoperoxidase is produced in both substrates from the first day, but when PDA+ASE is used as inoculum and sawdust is used as substrate the enzyme showed to have more activity.

Keywords: enzymes, ligninoperoxidase, *Phanerochaete chrysosporium*, growth kinetic.

1 Introducción

Los hongos de pudrición blanca, pertenecientes al grupo de los basidomicetos, son los degradadores de lignina más eficientes. El *Phanerochaete chrysosporium* es uno de los hongos que produce grandes cantidades de enzi-

mas lignocelulolíticas que se utilizan principalmente para la bioconversión de la lignocelulosa. Esta enzima puede utilizarse en diversos campos como: la síntesis química, la biodegradación de compuestos tóxicos, el procesa-

miento de pulpa y papel, la alimentación animal, la industria textil; y, en los últimos años ha ganado interés en la industria de polímeros para modificar la lignina y obtener empaques con mayor biodegradabilidad. Por otro lado, los desechos agroindustriales a pesar de ser biodegradables, representan un problema ambiental, cuando son producidos en grandes cantidades. Por esta razón, el aprovechamiento de los residuos agroindustriales en la obtención de productos de interés industrial es un concepto que cada vez gana mayor fuerza, pero, que requiere una amplia investigación para determinar los posibles usos de estos residuos como materias primas.

2 Materiales y Métodos

2.1 Materiales

La cepa de *Phanerochaete chrysosporium* fue donada por el Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigaciones Nucleares de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Montevideo-Uruguay.

Se emplearon dos sustratos: aserrín de maderas tropicales, residuo de la empresa Plywood; y tallos de morera provenientes de la hacienda Zoila Luz, residuo obtenido de la producción de gusano de seda.

La glucosa, extracto de malta, agar y ácido perclórico fueron adquiridos de Merck S.A. El benceno y etanol fueron de JT Baker y el alcohol veratrílico de SIGMA-ALDRICH.

2.2 Caracterización química de los sustratos

Para los dos tipos de sustrato se determinó la cantidad de ceras, resinas y grasas según la norma TAPPI T 6 os-59 [5]. En la muestra libre de ceras, resinas y grasas se determinó celulosa y lignina según normas TAPPI T17m-55 y T13os-54 respectivamente [5].

2.3 Preparación del inóculo

Se prepararon dos inóculos en frascos de 250 mL; uno con PDA y otro con PDA y Aserrín al 10%. (PDA+ASE) Para los dos casos, se emplearon 100 mL de PDA. Se sembró el hongo *Phanerochaete chrysosporium* sobre la superficie del agar y se mantuvo a 30 °C hasta que el micelio cubrió toda el área superficial.

2.4 Preparación de los sustratos

Se trabajó con dos tipos de sustrato: aserrín y tallos de morera. Tanto para el aserrín como para los tallos de morera se siguió el mismo procedimiento. Se colocaron 120 g del residuo lingocelulósico en un frasco de 250 mL y se añadieron 120 g de agua destilada. Los frascos tapados (tapa garra) se esterilizaron a 120 °C durante 20 min en un autoclave (NEW BRUNSWICK, modelo AE15-10).

2.5 Siembra y condiciones de crecimiento

Para todos los casos, la siembra se realizó de la siguiente manera: se cortó asépticamente el micelio y el agar de los frascos en ocho partes iguales. Se tomaron cuatro partes opuestas entre sí y se colocaron en la superficie de los frascos con tapa roscable de 500 mL con el sustrato ya estéril. Por cada frasco de 250 mL se sembraron dos frascos de 500 mL. Se taparon los frascos de 500 mL sin ajustar completamente la tapa, para permitir que ingrese aire al interior del mismo. Los frascos así sembrados, se colocaron en una estufa a 30 °C. Se colocó una bandeja con agua en el interior de la estufa, para mantener la humedad del ambiente.

2.6 Obtención de extractos enzimáticos

Cada día se tomaron al azar dos frascos sembrados, se añadieron 100 mL de una solución tampón de tartrato de sodio 0.1 mol/L y pH 3.0, se agitó por 30 min en un agitador marca NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC. Luego se filtró en un embudo Büchner hasta obtener 100 mL de filtrado; este constituye el extracto enzimático.

2.7 Determinación de la actividad ligninoperoxidásica (LiP)

La determinación de la actividad de la enzima ligninoperoxidasa (LiP) se basó en el método de Ming Tien [7] y Kent Kirk [3] con las siguientes modificaciones: se tomaron 250 μ L del extracto y se añadieron 2 mmol/L de alcohol veratrílico [1], 0.1 mol/L de tampón tartrato de sodio (pH 3), 0.1 % de Tween 80 y se inició la reacción con la adición de 4 mmol/L de H₂O₂, en un volumen total de 8.75 mL. Se incubó la mezcla de reacción a 37 °C, en un baño termostático, con agitación, marca JULABO modelo SW 22. La actividad de la LiP se midió con la reacción de oxidación del alcohol veratrílico a veratraldehído, mediante el incremento de la absorbancia a 330 nm ($\epsilon_{330} = 1.9 \text{ (mmol L}^{-1} \text{ cm)}^{-1}$) [6], durante 1 h en un espectrofotómetro marca THERMO SPECTRONIC modelo Genesys 20. Se utilizaron celdas de volumen reducido de 1 cm de paso, marca FISHER. Como blanco se empleó la mezcla enzimática con la composición detallada anteriormente; pero sin la adición del peróxido de hidrógeno.

Una unidad (U) de actividad ligninoperoxidásica se define como la cantidad de enzima LiP capaz de oxidar 1 μ mol de alcohol veratrílico por minuto, a pH 3 y 30 °C.

2.8 Cinética de crecimiento del hongo *Phanerochaete chrysosporium*

Para todas las pruebas, simultáneamente a la determinación de la actividad enzimática, se tomaron dos frascos (adicionales a los empleados para obtener los extractos) y se determinó la cinética de crecimiento del hongo por determinación de ácidos nucleicos extraídos con ácido

perclórico. Se midió la densidad óptica a 260 nm. Los resultados se expresaron en DO/fps (fracción de peso seco) (Olmos, 1987).

2.9 Pruebas experimentales

Para determinar la cinética de crecimiento y la actividad de la LiP se realizaron las pruebas experimentales que se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Pruebas de Fermentación del *Phanerochaete chrysosporium*

Sustrato	Medio del inóculo	Tiempo de fermentación (días)	Temperatura °C
Aserrín	PDA	10	30
	PDA+ASE	10	30
Tallos de morera	PDA	10	30
	PDA+ASE	10	30

3 Resultados y discusión

3.1 Caracterización química de los sustratos

Los resultados de la caracterización química de los dos sustratos: aserrín de maderas tropicales y tallos de morera se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición química del aserrín y tallos de morera (porcentaje)

Componente	Aserrín (%)	Tallos de morera (%)
Resinas, ceras y grasas	5.0	3.1
Celulosa	57.8	21.3
Lignina	23.7	23.2
Otros	13.5	52.3

Como se puede observar, el porcentaje de celulosa en los tallos de morera es menor que la mitad (21.34 %) del que se encuentra en el aserrín. Sin embargo el contenido de lignina es muy parecido para los dos sustratos (23 % aproximadamente). Los otros componentes son esencialmente cenizas, pentosanas y compuestos solubles. Se puede observar que los tallos de morera tienen un alto porcentaje de estos compuestos.

3.2 Determinación de la actividad Ligninoperoxidásica en los extractos obtenidos de la fermentación en medio sólido a escala de laboratorio

En la Tabla 3, se presentan los resultados de la actividad de la LiP expresados en porcentaje de conversión de alcohol veratrílico en su aldehído, en función del tiempo para cada fermentación del *Phanerochaete chrysosporium*,

en medio sólido: aserrín y en tallos de morera a partir de inóculos obtenidos en PDA y en PDA+ASE.

Se puede observar que existe actividad ligninoperoxidásica desde el primer día de la fermentación, independientemente del tipo de experimento realizado; sin embargo, los valores son diferentes entre sí.

En todos los casos, se observa que la cantidad de enzima va aumentando en los primeros días poco a poco, llega a un pico máximo, se mantiene y luego disminuye. Así, por ejemplo, la conversión de alcohol veratrílico a aldehído, determinado en la fermentación en aserrín a partir de inóculos en PDA+ASE, aumenta de 0.95 % en el primer día, hasta que en el cuarto día de fermentación, se determina el mayor porcentaje de conversión (1.74 %) y luego se mantiene casi constante hasta el décimo día, para después disminuir. Este comportamiento puede deberse a que el metabolito se va degradando con el tiempo, ya que el microorganismo genera la enzima con el objetivo de degradar el sustrato, para poder utilizar la lignina como fuente nutricional. Estos resultados son similares a los encontrados por Moredo *et al* [4], en el que se utiliza desechos lignocelulósicos como aserrín, semillas de uva y cáscaras de cebada, se reporta que hay actividad ligninoperoxidásica a partir del cuarto día de fermentación y es máxima hacia el día undécimo para las fermentaciones en semillas de uva y cáscaras de cebada. Trabajos realizados por Tien y Kirk [7], reportan que la actividad de la LiP aparece entre el tercero y cuarto día después de la inoculación y es máxima en cultivos de seis días de edad.

Tabla 3. Porcentaje de conversión de alcohol veratrílico en aldehído para diferentes fermentaciones en medio sólido con *Phanerochaete chrysosporium*

Día fermentación	Porcentaje de conversión de alcohol veratrílico en aldehído			
	Aserrín		Tallos de morera	
	Inóculo PDA	Inóculo PDA+ASE	Inóculo PDA	Inóculo PDA+ASE
0	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.47	0.95	0.32	0.16
2	0.95	1.58	0.32	0.32
3	1.11	1.58	0.32	0.47
4	1.58	1.74	0.32	0.47
6	1.42	1.58	0.32	0.63
7	1.58	1.74	0.47	0.63
8	1.11	1.42	0.63	0.32
9	0.79	1.58	0.63	0.47
10	0.47	1.89	1.89	0.95

En general, se puede observar que la fermentación en aserrín produce valores más altos de conversión del alcohol en aldehído desde el primer día, esto significa que en este sustrato se esperaría encontrar mayor cantidad de enzima. Por el contrario, en el sustrato tallos de morera con un inóculo a partir de PDA, se obtienen los menores porcentajes de conversión alcohol veratrílico en veratraldehído: 0.32 %. Esta diferencia podría deberse a que el contenido de celulosa en el aserrín es el do-

ble comparado al contenido de celulosa en los tallos de morera. Se conoce que la lignina es descompuesta más fácilmente por el *P. chrysosporium* o, en general por los hongos de pudrición blanca, en presencia de fuentes de energía como los carbohidratos, ya que la lignina en sí, no le provee de la suficiente energía para su crecimiento [3].

Para los dos sustratos, la utilización de inóculo crecido en PDA+ASE produce un mayor porcentaje de conversión de alcohol a aldehído, esto significa que se estaría generando más enzima en el medio cuando el hongo ya está adaptado a crecer en presencia de lignina (efecto de la adición de aserrín al PDA). Esto puede deberse a que la LiP es un metabolito secundario, pues estos hongos generan celulasas como metabolitos primarios para obtener la energía necesaria para su crecimiento, y la lignina es una fuente secundaria de energía [2].

La generación de LiP (medida como porcentaje de conversión de alcohol veratrílico en su aldehído) mediante fermentación en medio sólido con el hongo *P. chrysosporium*, es menor cuando se emplea tallos de morera como sustrato, comparada con la obtenida cuando el sustrato es aserrín. Esto puede deberse, como se dijo anteriormente a la composición del sustrato; los tallos de contienen menor cantidad de celulosa y posiblemente a la presencia de pentosanas. Este comportamiento también podría deberse al tamaño de partícula, ya que los tallos de morera, si bien están molidos, no son un polvo fino como el aserrín, de modo que, el área superficial es menor y por lo tanto hay menos contacto del hongo con el sustrato, lo que limitaría la captación de nutrientes, que podría reflejarse en una menor producción de metabolitos.

3.3 Determinación de la cinética de crecimiento del hongo *P. chrysosporium*, en dos sustratos

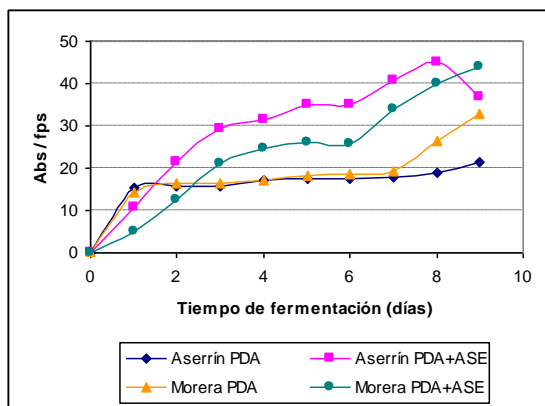


Figura 1. Cinética de crecimiento del *P. chrysosporium* en Aserrín y Tallos de morera con inóculos PDA y PDA+ASE

El incremento de masa celular se determinó a partir de la concentración de ácidos nucleicos medidos por densidad óptica. A partir de estos datos de construyeron las curvas de crecimiento celular en función de tiempo,

que se presentan en la Figura 1.

Se puede observar que existe un mayor crecimiento del hongo *P. chrysosporium* cuando el sustrato es aserrín y el inóculo es PDA+ASE, en segundo lugar está el sustrato de tallos de morera, también con inóculo PDA+ASE. En los dos casos, el hongo crece hasta el noveno día aproximadamente, y a partir de este, se puede decir, que entra en la fase estacionaria, ya que no se pudo apreciar un incremento en la concentración de ácidos nucleicos, lo que indicaría que el hongo dejó de crecer.

El crecimiento es más lento en las fermentaciones a partir de inóculos en PDA, y en este caso no hay una diferencia apreciable entre los sustratos, pues las curvas casi están superpuestas.

Al analizar las curvas, parecería que la adición de aserrín al medio en la obtención del inóculo, produce un mayor crecimiento del hongo en cualquiera de los dos sustratos: aserrín o tallos de morera. La explicación sería la misma por la cual se observa que se produce más enzima, es decir, el hongo se encuentra ya adaptado a un medio que contiene lignina.

Como se observa en ambas curvas de las fermentaciones en aserrín y en tallos de morera con inóculos PDA+ASE, la fase de adaptación no se encuentra definida, hay crecimiento a partir del primer día. En cambio, el crecimiento es más lento en las fermentaciones a partir de inóculos sin ASE. Parecería que el hongo empieza su fase exponencial a partir del octavo día de la fermentación.

Finalmente, una vez expuestos los resultados tanto de la actividad de LiP en los extractos, reflejados en la conversión de alcohol veratrílico en su aldehído, como del crecimiento del hongo, se puede decir, en general, que a mayor crecimiento del hongo, existe una mayor generación de metabolito, respecto de su blanco correspondiente. No obstante, mejores resultados en cuanto a obtención de metabolito se da durante la fermentación cuando el sustrato es aserrín.

4 Conclusiones y recomendaciones

1. El hongo *Phanerochaete chrysosporium* presenta un mejor crecimiento tanto en aserrín como en tallos de morera, cuando el inóculo tiene como medio de cultivo PDA y Aserrín (PDA+ASE). La fase de crecimiento se da hasta el noveno día.
2. Se pudo determinar actividad de la enzima LiP en los extractos obtenidos a partir de sustratos ligninocelulósicos fermentados con *Phanerochaete chrysosporium*.
3. La actividad ligninoperoxidásica en los dos sustratos (aserrín y tallos de morera) y con dos inóculos (PDA y PDA+ASE), se presenta desde el primer día de fermentación, aumenta hasta ser máxima al cuarto día, aproximadamente.

4. El inóculo PDA+ASE produce mejores resultados tanto en el crecimiento del hongo, como en la actividad de la LiP medida como porcentaje de conversión de alcohol veratrílico en su aldehído.
 5. En general, el uso de los tallos de morera, como sustrato para generación de enzima ligninoperoxidásica produce menores resultados que el uso de aserrín como sustrato.
 6. Se recomienda realizar un estudio de generación de enzima ligninoperoxidasa a partir de fermentaciones en medio sólido a mayor escala con el objetivo de obtener extractos más concentrados.
 7. Se recomienda estudiar el efecto del tamaño de partícula del desecho lignocelulósico con la finalidad de mejorar el aprovechamiento de lignina y celulosa al aumentar el área superficial de crecimiento del hongo.
 8. Se recomienda estudiar el efecto de la composición química del sustrato, especialmente de la concentración de celulosa en el crecimiento y generación de enzima con el objetivo de encontrar sustratos óptimos para la obtención de enzima ligninoperoxidásica.
 9. Se recomienda optimizar el método de obtención del extracto enzimático o estudiar otros métodos de extracción para obtener extractos con mayor concentración de enzima.
- by Tryptophan*. Applied and Environmental Microbiology, 63, (7), pp 2543-2548
- [2] Kerem, Z., Friesem, D. y Hadar, Y., 1992. *Lignocellulose Degradation during Solid-State Fermentation: Pleurotus ostreatus vs Phanerochaete chrysosporium*. J Applied and Environmental Microbiology, 58, (4), pp 1121-1127
 - [3] Kirk, T., 1987. *Lignin-degrading enzymes*. Phil Trans. R. Soc. Lond., A 321, Gran Bretaña, pp 461 - 474
 - [4] Moredo, N., Lorenzo, M., Dominguez, A., Moldes, D., Cameselle, C. y Sanromán, A., 2003. *Enhanced ligninolytic enzyme production and degrading capability of Phanerochaete chrysosporium and Trametes versicolor*. World Journal Microbiology and Biotechnology. No. 19, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp 665-669
 - [5] Smook, G., 1990. *Handbook for Pulp and Paper Technologists*. First Edition, TAPPI Press.
 - [6] Tien, M. y Dengbo, M., 1997. *Oxidation of 4-methoxymandelic Acid by lignin peroxidase. Mediation by veratryl alcohol*. The journal Biological Chemistry, USA, 272, (14), pp 8912-8917
 - [7] Tien, M., y Kirk, K., 1983, *Lignin-degrading enzyme from Phanerochaete chrysosporium: Purification, characterization and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 18. pp 2280-2284

Referencias

- [1] Collins, P., Field, J., Teunissen, P. y Dobson, A., 1997. *Stabilization of Lignin Peroxidases in White Rot Fungy*