

Aplicaciones biotecnológicas de los hongos lignocelulolíticos

Laura Levin y Flavia Forchiassin*

Los hongos se caracterizan por su forma de nutrición heterótrofa absorptiva, es decir sólo son capaces de incorporar moléculas pequeñas que utilizarán como fuente de materia y energía para su crecimiento. Al ser capaces de utilizar polímeros, el paso inicial para su nutrición a partir de éstos, es la secreción al medio de enzimas extracelulares que pueden degradarlos a moléculas pequeñas que serán incorporadas y utilizadas nutricionalmente. El hecho de secretar enzimas extracelulares y su particular forma de crecimiento filamentosos, células alargadas de crecimiento apical, hace que sean los organismos mejor adaptados al aprovechamiento del sustrato, ya que además de degradarlo pueden penetrar en él. La producción de enzimas extracelulares les permite a los hongos aprovechar sustratos poliméricos difícilmente degradados por otros organismos, con lo cual se expande su posibilidad de ocupar distintos hábitats. Pero estas enzimas también tienen importancia para el hombre y muchas de ellas son utilizadas en procesos industriales. La facilidad de cultivo de estos organismos y su alta efi-

ciencia de producción los hace particularmente aptos para la obtención de enzimas con fines biotecnológicos. Los hongos son capaces de utilizar una infinidad de sustratos para su nutrición, lo que permite su ubicuidad. En la naturaleza existe una gran abundancia de materiales vegetales y sus residuos, ya sea de plantas herbáceas o leñosas, hojarasca en el suelo, etc. Mientras que los constituyentes celulares son fácilmente aprovechados por diversos organismos las paredes de las células vegetales son de difícil degradación y constituyen los materiales lignocelulósicos. Están formadas por pectina, celulosa, hemicelulosa y lignina y son sustrato para el crecimiento de los hongos lignocelulolíticos.

De los polímeros mencionados pectina, celulosa y hemicelulosa son polisacáridos, mientras que la lignina es un polímero aromático. Las enzimas que degradan polisacáridos ocurren como sistemas con distintas actividades que actúan de modo sinérgico. Generalmente existen endoenzimas que actúan sobre el polímero al azar, exoenzimas que clivan las uniones a partir de un extremo y enzimas con actividad sobre oligosacáridos. La síntesis de estas enzimas es inducida por los sustratos poliméricos y es reprimida por azúcares fácilmente utilizables.

Las ligninasas en cambio no presentan la característica especificidad enzimática

Sustancias pécticas. Son polisacáridos ácidos de alto peso molecular que forman parte de las paredes celulares y laminilla media de los vegetales. La *pectina* es un heteropolisacárido ramificado, cuya cadena principal está formada por ácido galacturónico con uniones β -1,4, asociada a azúcares neutros. Los grupos carboxilo de los residuos de ácido galacturónico pueden estar parcialmente esterificados con metanol y los grupos hidroxilo pueden estar parcialmente acetilados. El ácido péctico es el polímero de ácido galacturónico sin sustituyentes. La protopectina, insoluble en agua, es la sustancia madre de los otros compuestos pécticos, componente del tejido vegetal, que se halla unida químicamente con los otros componentes de la pared: celulosa y hemicelulosa.

Las enzimas pécticas son las primeras que se producen cuando se cultivan los hongos sobre restos vegetales y cumplen un rol importante en la invasión de los tejidos vegetales por fitopatógenos. Las *protopectinasas* atacan protopectina liberando pectina soluble de alto peso molecular. Las *pectinesterasas* desesterifican los grupos

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

metoxilo de la pectina liberando ácido péctico. Las enzimas despolimerizantes, con actividad endo o exo, actúan sobre las uniones β -1,4 del polímero y se clasifican de acuerdo con la preferencia por el sustrato: pectina (*polimetilgalacturonasas*) o ácido poligalacturónico (*poligalacturonasas*) y el mecanismo de acción: hidrolasas (clivan la molécula por un mecanismo de hidrólisis con adición de agua) o liasas (clivan por un mecanismo de transeeliminación).

Hemicelulosas. Las hemicelulosas son polímeros de diversas hexosas y pentosas (principalmente D-xilosa, L-arabinosa, D-manosa, D-glucosa y D-galactosa), solubles en álcalis, que aparecen en las paredes celulares en forma amorfa, asociados a los otros componentes de la pared, a las microfibrillas de celulosa por uniones hidrógeno, y mediante uniones covalentes a la lignina. Son heteropolisacáridos, formados por una cadena de azúcares unidos por enlaces β -1,4 con ramificaciones muy cortas, generalmente de un solo azúcar de longitud. Se nombran según el azúcar mayoritario. Así los xilanos, las hemicelulosas más frecuentes en la madera de angiospermas, están constituidos por una cadena principal de xilosa con uniones β -1,4 y cortas ramificaciones de arabinofuranosa, ácido glucurónico o metilglucurónico, además pueden estar acetilados. Las principales enzimas xilanolíticas son: *endoxilanas* que actúa sobre la cadena de xilano al azar, disminuyendo el grado de polimerización con liberación de: xilooligosacáridos, xilobiosa, xilosa y β -xilosidasa que actúa sobre xilooligosacáridos o sobre xilobiosa, dando como producto xilosa. Es dudosa la existencia de una *exoxilanas*, reflejando probablemente el bajo grado de polimerización de las hemicelulosas. Un sistema xilanolítico completo requiere igualmente de las enzimas que actúan sobre sus ramificaciones.

Celulosa. La celulosa es un homopolímero lineal de glucosa con uniones β -1,4. Estas cadenas siempre están asociadas formando microfibrillas cristalinas, estabilizadas por puentes hidrógeno lo que le confiere gran resistencia. Además están en las paredes celulares asociadas a otros polímeros como hemicelulosas, lignina y sustancias pécticas. El sistema enzimático celulolítico comprende: *endoglucanasas*, actúan al azar sobre el polímero liberando mayormente oligosacáridos, aunque también celobiosa y glucosa, *celobiohidrolasas* (CBH) actúan a partir de los extremos no reductores liberando celobiosa y β -glucosidasas: actúan sobre oligómeros, entre ellos la celobiosa liberada por CBH.

Lignina. Es un polímero aromático complejo de alto peso molecular, amorfo, tridimensional, insoluble en agua, compuesto por unidades fenilpropano, que se sintetiza por polimerización oxidativa de los alcoholes *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico. La polimerización de la lignina se lleva a cabo luego de la deposición de los polisacáridos y se inicia por oxidación enzimática de los precursores a fenoxi radicales (por abstracción de un electrón). Estos radicales libres pueden reaccionar unos con otros en una gran variedad de formas y esto hace que la lignina no tenga una estructura única. La polimerización resulta en una estructura polifenilpropanoide, en la cual las unidades básicas están ligadas entre sí por diferentes uniones C-C y uniones aril-éter. Forma parte de las paredes de las células vegetales formando una matriz amorfa, entremezclada con celulosa y hemicelulosa, con la cual puede tener uniones covalentes. Los únicos hongos capaces de degradarla totalmente son los hongos causantes de pudrición blanca, que al remover la lignina de la madera dejan un residuo de color blanquecino. Son los típicos degradadores de lignina, aunque son capaces de degradar también celulosa

y hemicelulosa. De éstos, *Phanerochate chrysosporium* ha sido el más estudiado. Dada la heterogeneidad de la molécula y su gran tamaño, los sistemas enzimáticos involucrados en la degradación de la lignina deben ser extracelulares y no específicos. La acción de las enzimas resulta en una despolimerización parcial, las roturas ocurren sin estereoespecificidad. Son mecanismos oxidativos que producen radicales libres, que pueden reaccionar entre sí volviendo a polimerizarse. Existe un equilibrio entre polimerización-despolimerización. Se inician reacciones no específicas que después pueden seguir cualquier camino sin subsiguiente control por parte de las enzimas, es lo que se ha llamado "combustión enzimática". Las principales enzimas de este sistema son *lignin-peroxidasa* (LiP), *manganeso-peroxidasa* (MnP) y *lacasa*; no todas las especies poseen todas las enzimas de este sistema. Ocurren distintas combinaciones, sugiriendo que existe más de una estrategia exitosa involucrada en el proceso de biodegradación de lignina. Se han descrito otras actividades enzimáticas que intervienen en el proceso como la *celobiosa-quinona oxidoreductasa* (CBQ), que oxida celobiosa a celobionolactona y reduce quinonas y otros radicales producidos por LiP, MnP o lacasa y protege así de la repolimerización. Existen varias enzimas capaces de producir peróxido de hidrógeno y su síntesis acompaña la síntesis de peroxidases, entre otras se destacan la *glucosa-oxidasa* predominantemente intracelular y la *glioxal-oxidasa*, extracelular.

CONSECUENCIAS

Los materiales lignocelulósicos representan un gran reservorio de materia y energía. La biodegradación fúngica es un proceso clave en el ciclo biogeoquímico del carbono, y esta actividad descomponedora resulta pro-

bablemente el más valioso servicio que brindan estos hongos. Sin embargo, el deterioro de la madera resulta un perjuicio cuando ocurre en recursos forestales o en madera en uso.

APLICACIONES

Bioconversión de materiales lignocelulósicos. Residuos agrícolas pueden ser sacrificados mediante el uso de enzimas fúngicas, es decir degradados a azúcares que pueden utilizarse en posteriores fermentaciones para la producción de combustibles. También se facilita la extracción de otros componentes a partir de los materiales vegetales y se aumenta la digestibilidad para alimento de animales.

Alimentación. Se utilizan pectinasas, xilanasas y celulasas para facilitar la extracción de jugos, aromas, aceites y pigmentos. Son particularmente importantes en la industria del aceite de oliva y de jugos de fruta; en este caso las pectinasas también se utilizan para la clarificación del jugo eliminando la pectina que es espesante. En la industria del vino pectinasas, xilanasas y β -glucosidasas mejoran la maceración y extracción del pigmento, clarificación y filtración. En la industria panadera las xilanasas modifican la harina, mejorando la textura de la masa. Algunos hongos que degradan lignina, como *Pleurotus ostreatus* (gírgolas) y *Lentinus edodes* (shiitake), son hongos comestibles y creciendo sobre madera convierten directamente a la lignocelulosa en delicioso alimento de consumo humano.

Industria textil. La obtención de fibras, importante para lino, cáñamo y yute, es favorecida por la maceración de tejidos, con una mezcla de pectinasas y xilanasas. El biodegrado de jeans de denim con lacasa

reemplaza paulatinamente el stone-washing con ventajas económicas y ambientales. Las celulasas al remover fibrillas superficiales de telas de algodón, se usan para su biopulido dándole mayor brillo y suavidad, y en jabones enzimáticos.

Industria papelera. La demanda de papel aumenta globalmente y la industria celulósico-papelera es emergente como un mercado potencial para la aplicación de enzimas fúngicas. Estas tienen aplicación en diversos pasos del proceso: pulpado, blanqueado, para disminuir el uso de químicos y la contaminación ambiental asociada y en el tratamiento de efluentes (1, 2). La industria papelera es la sexta en la generación de polución ambiental, es evidente la necesidad de nuevas tecnologías que disminuyan la demanda de energía y sean eficientes en la detoxificación de efluentes, con los consiguientes beneficios para el medio ambiente.

El biopulpado de chips de madera, actualmente en etapa experimental, implica el pretratamiento con hongos lignolíticos previo al pulpado mecano-químico. Los microorganismos de interés en el biopulpado son los que atacan selectivamente a la lignina y dejan casi intactos los carbohidratos. Como efecto adicional a la modificación química, se puede observar una mejora en la impregnación de químicos resultante de una estructura de pared celular más abierta. Ambos efectos combinados producen un incremento en la velocidad de reacción lo que se traduce en un tiempo de cocción más corto o la posibilidad de disminuir la dependencia de químicos en el pulpado Kraft, con la consecuente reducción en el impacto ambiental. En el pulpado mecánico se ha demostrado que estos hongos eliminan parte de la lignina, reduciendo el consumo de energía hasta un 30-50%, con considerables mejoras en las

propiedades de resistencia (índices de tracción y de rasgado) de la pulpa (3). Un examen de la calidad de la pulpa y el ahorro de energía combinados con una evaluación económica sugieren que el pretratamiento biológico tiene un futuro viable.

Las pulpas producidas mecanoquímicamente son de color pardo debido al alto contenido de lignina y deben ser blanqueadas, utilizándose para este proceso grandes cantidades de productos clorados. El pretratamiento con ligninasas, en particular la lacasa con mediadores de su actividad reduce notablemente el uso de compuestos clorados. El uso de xilanasas, libera la lignina reduciendo significativamente el uso de compuestos clorados y logrando una pulpa con mejores propiedades de fibras y de retención de agua. La tecnología del preblanqueado con xilanasas ha sido transferida con éxito a escala industrial en pocos años, con ventajas económicas y medioambientales (1, 3).

La industria del papel genera efluentes, tóxicos e intensamente coloreados, con alto contenido de materia orgánica. Presentan alta demanda bioquímica y química de oxígeno (DBQ y DQO), compuestos clorados, sólidos suspendidos, taninos, resinas, etc. Mientras que algunos de los compuestos ocurren naturalmente en la madera, otros xenobióticos se generan durante los procesos industriales (ligninas cloradas, fenoles, dioxinas, furanos). Algunos de ellos son recalcitrantes a la degradación y tienden a persistir en la naturaleza. Estos efluentes son tratados por oxidación biológica en lagunas o sistemas de lecho fluido, reduciendo el DBQ y el DQO pero no el color. Se ha comprobado que el tratamiento de estos efluentes con hongos lignolíticos no sólo produce la decoloración (hasta el 80%) sino también la detoxificación (4).

Degradación de xenobióticos. La baja especificidad y la fuerte capacidad oxidativa de los sistemas fúngicos de degradación de lignina, permite utilizarlos en la degradación de numerosos contaminantes orgánicos, entre ellos: hidrocarburos aromáticos policíclicos, explosivos, tinturas industriales, bifenilos policlorados (PCBs) (5) Han surgido dos estrategias para la degradación. la biotransformación del compuesto por cultivos enteros y el uso de sus enzimas. Aún en este caso los costos de producción son compatibles dado que es posible utilizar residuos agroindustriales para el crecimiento de los hongos e incluso es preferible utilizar los extractos crudos en los que pueden estar presentes otros factores que favorecen la estabilidad de las enzimas o que actúen como mediadores, mejorando su rendimiento. La mayor parte de los estudios han sido realizados con *P. chrysosporium* y *Trametes versicolor*, sin embargo otras especies han demostrado ser potencialmente útiles para biorremediación. En nuestro laboratorio un aislamiento nacional de *Trametes troglu*, excelente productor de lacasa y manganeso peroxidasa, ha sido capaz de degradar casi completamente mezclas de PCBs y de hidrocarburos aromáticos policíclicos (6) así como nitrobenzeno y antraceno (7) y un amplio rango de tinturas industriales (8, 9) *Fomes sclerodermeus* degrada y detoxifica totalmente verde de malaquita en distintos sistemas (10, 11). De un screening de 35 cepas autóctonas se ha seleccionado *Coriolus versicolor* var. *antarcticus* con muy buena capacidad decolorante (12), en estudios posteriores se demostró que cultivos enteros en 1 hora degradan y detoxifican una variedad de colorantes. Hay que tener en cuenta que la industria textil libera al medio grandes cantidades de productos coloreados y en muchos casos tóxicos junto con agua, un recurso que no debiera desperdiciarse, la posibilidad de decoloración

de los efluentes también permitiría el reuso del agua (13)

Biosorción. Las paredes celulares de estos hongos constituidas fundamentalmente por glucanos mananos y quitina tienen gran capacidad de adsorción de metales. Resultan un material prometedor para la biosorción de metales pesados de aguas contaminadas, incluso en este caso no es necesario someter al hongo a estas condiciones de estrés, sino que puede utilizarse biomasa muerta.

Investigación y desarrollo. Algunas de estas enzimas poseen promotores muy fuertes y regulables como la CBH de *Trichoderma reesei*, este hecho además de su capacidad de secreción, la hace un vehículo para la producción de proteínas heterólogas. Para producción de protoplastos se usan pectinasas, xilanasas y celulasas. La CBQ es utilizada en la fabricación de biosensores para detectar celobiosa o lactosa. La lacasa reviste gran interés por su capacidad de transferir 4 electrones a la vez y está siendo utilizada para la modificación de electrodos para ser utilizados como biosensores amperométricos y para microceldas generadoras de electricidad. (14, 15).

PERSPECTIVAS

La mayoría de las investigaciones ligadas a aplicaciones biotecnológicas de hongos de pudrición blanca se realizaron sobre especies del Hemisferio Norte, esto contrasta con la diversidad de hongos ligninolíticos que han sido descritos en el Hemisferio Sur, sobre los cuales son escasos los estudios acerca de los sistemas enzimáticos implicados. Para utilizar a los hongos causantes de pudrición blanca y sus enzimas lignocelulolíticas en distintos procesos biotecnológicos,

es necesario clarificar los mecanismos enzimáticos empleados, determinar como secretan sus enzimas, como operan y bajo que condiciones están activas. El trabajo actual en nuestro laboratorio abarca estas cuestiones, la optimización de procesos de fermentación (sumergidos y en estado sólido) para la obtención de enzimas lignocelulolíticas y el relevamiento de nuevas especies fúngicas, en la búsqueda de organismos más eficientes para utilizarlos en la industria del pape y en la biodegradación de diferentes contaminantes ambientales

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bajpai P (1999) Biotechnol Prog 15:147-157
2. Mai C, Kües U, Millitz H. 2004. Appl Microbiol Biotechnol 63: 477-494.
3. Bajpai P, Prakash Mishra S, Prakash Mishra O, Kumar S, Bajpai PK, Singh S. (2004). Eliotechnol Prog 20:1270-1272.
4. Wesenberg D, Kyriakides I, Agathos SN. (2003). Biotech. Adv 22:161-87
5. Pointing SB. 2001. Appl. Microbiol Biotechnol 57: 20-33
6. Haglund C, Levin L, Forchiassin F, López M, Viale A (2002). Rev. Arg. Microbiol, 34: 157-162.
7. Levin L, Viale A, Forchiassin F. (2002). Int. Biodef. Biodegr., 52: 1-5.
8. Trupkin S, Levin L, Forchiassin F, Viale A (2003). J. Ind. Microbiol. Biotechnol, 30: 682-690.
9. Levin L, Viale A, Forchiassin F. (2005). Process Biochem. 40: 1381-1387.
10. Papinutti L, Forchiassin F. (2004) FEMS Microbiol Lett 231:205-209
11. Papinutti VL, Mouso N, Forchiassin F 2006. Enz. Microbial Tech., en prensa
12. Levin L, Papinutti L, Forchiassin F (2004). Bioresour Technol 94: 169-176
13. Abadulla E, Tzanov T, Costa S, Robra KH, Cavaco A, Gubitz GM (2000). Applied and Environmental Microbiology 66: 3357-3362.
14. Vianello F, Cambria A, Ragusa S, Cambria MT, Zennaro L, Rigo A. 2004. Biosensors and Electronics 20: 315-321
15. Barrière F, Ferry Y, Rochefort d, Leech D (2004). Electrochem Comm 237-241

INDUSTRIA & QUIMICA

ISSN 0368-0819 • Mayo 2006 • N° 352

REVISTA DE LA ASOCIACION QUIMICA ARGENTINA

TECNONUCLEAR S.A.

Primera empresa
Argentina
de medicamentos
para medicina nuclear
que ha certificado sus
instalaciones para
los mercados
latinoamericano
y europeo con
norma GMP
según las
recomendaciones
de la OMS 20004

