

**DEGRADACIÓN DE CELULOSA Y LIGNINA EN CULTIVO LÍQUIDO DE *CERIPORIA BRESADOLAE* (BDOT. ET GALZ.) BOND. & SING. (APHYLLOPHORALES: BASIDIOMYCOTINA)**

**M. C. Martínez-González\* & M. Honrubia\***

Recibido: mayo 1984

**SUMMARY**

The degradation of cellulose and lignin in a liquid culture by *Ceriporia bresadolae* (Bdot. & Galz.) Bond. & Sing. (Aphyllophorales: **Basidiomycotina**)

The cellulose and lignin degradation potential of *Ceriporia bresadolae*, a fungus causing brown rot in *Pinus halepensis*, has been measured as a percentage of weight loss of commercial cellulose and lignin.

It has been found that the degradation of cellulose is dependent on the previous treatment of the substratum with chemical reagents. Besides, the presence of a carbohydrates such glucose, added exogenously, is necessary.

**RESUMEN**

Se han obtenido valores de degradación de celulosa y lignina, dados en porcentaje de pérdida de peso, para *Ceriporia bresadolae*, causante de podredumbre parda en madera de *Pinus halepensis*.

Para la degradación de celulosa es imprescindible hacer pretratamiento con una solución digestora. Es necesario, posteriormente, la presencia de un carbohidrato, como glucosa, añadido de forma exógena.

**INTRODUCCIÓN**

Los hongos causantes de podredumbre parda en madera despolimerizan rápidamente celulosa (COWLING, 1961). Este efecto es similar a la hidrólisis ácida de la celulosa. NILSSON (1974a) apunta la necesidad de presencia de lignina para que la celulosa pueda ser degradada.

Según HIGHLEY (1977, 1978) es necesaria la presencia de una fuente exógena de carbono para que se produzca la degradación de celulosa en *Poria placenta*. KOENIGS (1972 b, 1974 b) aporta datos sobre la importancia de un pretratamiento de la celulosa con soluciones digestoras, para que ocurra su degradación en cultivo líquido.

El objetivo de este trabajo es comprobar estos hechos con un hongo responsable de podredumbre parda: *Ceriporia bresadolae*, que de-

sempeña un importante papel en la descomposición de madera poco degradada de *Pinus halepensis*, en el S.E. peninsular ibérico. El presente estudio supone un extracto de la Memoria de Licenciatura de uno de los autores (M. C. M-G.).

**MATERIAL Y MÉTODOS**

Se ha utilizado material fresco de *Ceriporia bresadolae* (Bdot. et Galz.) Bond. & Sing., recolectado sobre ramas muertas, descortezadas, poco descompuestas de *Pinus halepensis* Miller. Localidad: El Buitre. XH 9523. Moratalla (Murcia). Leg. M. C. Martínez González, 1411 1182, 313183, 2713183, y 12/4/83. Además, como materiales: celulosa (papel de filtro), lignina sintetizada por el método de IOTTECH. Solución digestora (KOENIGS, 1974b): 0'44 mmol.  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + 0'3\%$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

\* Departamento de Botánica. Facultad de Biología. Universidad de Murcia. Murcia.

Solución basal de HIGHLEY (1973): 2'0 g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; 2'0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0'5 g Mg SO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O; 0'1 g Ca Cl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O; 1'0 mg tiamina; 0'036 mg Mn Cl<sub>2</sub> · 4 H<sub>2</sub>O; 0'31 mg Zn SO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O; 0'039 mg Cu SO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O; 0'018 mg (NH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> Mo<sub>7</sub> O<sub>24</sub> · 4 H<sub>2</sub>O; 0'015 mg Fe SO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O.

Extracto de malta 4%; agar 1'5%.

### CULTIVO DE *CERIPORIA BRESADOLAE* EN MEDIO CON CELULOSA

El cultivo de *Ceriporia bresadolae* se realiza a partir de esporada obtenida en cámara húmeda, con la que se han preparado cultivos en agar-malta que son conservados a 4° C.

En matraces Erlenmeyer (250 ml) se depositan 25 ml de disolución basal de Highley y celulosa, previamente tratada con solución digestora (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe; KOENIGS, 1974b). Disgregada la celulosa por este pretratamiento, se le añade 1% de glucosa, de forma exógena, antes de ser incorporada a la solución basal de Highley.

En este medio se inocula 1 ml de suspensión de micelio, previamente lavado y precultivado en solución basal, con 1% de extracto de malta durante 7 días. Igualmente se hace el cultivo en matraces que contienen glucosa.

Se deja crecer y se realizan medidas de pérdida de peso a las 2, 4, 6 y 8 semanas, como indicadores de la acción degradadora del hongo.

### INCUBACIÓN EN MEDIO CON LIGNINA

Se prepara una suspensión de lignina, obtenida al añadir lignina a dimetilformamida (KIRK, 1975), en una proporción 20/30 mg/ml. A continuación se añade asépticamente parte de esta solución de lignina a agua destilada estéril y se obtiene una fina suspensión. Con este procedimiento no se han encontrado problemas de contaminación. Seguidamente se realiza la incubación en matraces Erlenmeyer de 50 ml, que contienen 2 ml de medio basal esterilizado y 3 ml de la suspensión de lignina.

Preparado así el medio, se incuba con 2ml de suspensión micelial previamente lavada y homogenizada, precultivada en medio basal y 10 g/l de glucosa. Se mantiene a temperatura ambiente durante ocho semanas y se hacen medidas de pérdida de peso en los tiempos indicados en el apartado anterior.

El medio basal utilizado se prepara a partir del ya mencionado de HIGHLEY (1973), al que se le incorpora asparragina y 0'1% de glucosa.

Ha sido imposible estudiar la degradación con lignina KLASON debido al elevado índice de acidez que presenta, por el que se inhibe el crecimiento de *Ceriporia bresadolae*.

Se ha utilizado lignina sintetizada por el método IOTECH, comprobando la pérdida de peso que se produce, en medidas realizadas a 2, 4, 6 y 8 semanas.

## RESULTADOS

### DEGRADACIÓN DE CELULOSA

Aunque los porcentajes de pérdida de peso que se obtienen para *Ceriporia bresadolae* no son elevados, indican que tal degradación existe.

La tabla 1 corresponde a los valores calculados para intervalos comprendidos entre 2 y 8 semanas. Sólo en los caldos de cultivo que contienen glucosa como sustrato adicional se produce pérdida de peso.

### DEGRADACIÓN DE LIGNINA

Los resultados del estudio de pérdida de peso en lignina se dan en la tabla 2. Se observa un claro incremento de los porcentajes de pérdida de peso en el transcurso de las 8 semanas, que es mayor que el comprobado en el caso de la celulosa; es imprescindible la presencia de glucosa y asparragina.

TABLA 1. Pérdida de peso (en %) de celulosa en medio inoculado con *Ceriporia bresadolae*.

SUSTRATO	SEMANAS			
	2	4	6	8
Celulosa + dis. basal	0	0	0	0
Celulosa + dis. basal + glucosa	1%	1%	2%	3'5%

TABLA 2. Pérdida de peso (en %) de lignina en suspensión inoculada con *C. bresadolae*.

SUSTRATO	SEMANAS			
	2	4	6	8
Lignina	1%	2'5%	4'5%	6%

## DISCUSIÓN

### DEGRADACIÓN DE CELULOSA

La actividad celulolítica de numerosos hongos ha sido estudiada por NILSSON (1973, 1974a, 1974b), COWLING (1961) demuestra que algunos hongos que crecen en madera degradan la celulosa formando pequeñas cavidades en la pared secundaria de la célula. Sin embargo, en cultivos puros de celulosa, sólidos o líquidos, no ocurre esto. Ello hace suponer la necesidad de que estén presentes otros componentes como hemicelulosas, carbohidratos o ligninas para que la descomposición tenga lugar.

Según HIGHLEY (1973, 1975, 1977) es también necesaria la presencia de una fuente anexa de carbono para que se produzca la degradación. Posteriormente, HIGHLEY (1978) demuestra que la despolimerización, así como la pérdida de peso en cultivos de *Poria placenta* es incrementada por la adición de carbohidratos como glucosa, añadidos exógenamente. No ocurre igual con *Poria monticola*, que en cultivo no aumenta su actividad celulolítica al serle suministrada esta fuente de carbono.

En nuestro caso se ha comprobado que en cultivos de *C. bresadolae* existe una pérdida de peso al añadir glucosa al medio, no produciéndose esta pérdida en su ausencia.

YOKOTA (1955) estudia, igualmente, la pérdida de peso en papel de filtro, en cultivo líquido. Concluye que el porcentaje de pérdida de peso es mayor en hongos que producen podredumbre blanca, que en los responsables de podredumbre parda. SCHAEFER (1957), también con papel de filtro, indica que de las cinco especies estudiadas sólo *Merilius domesticus* causa degradación en este sustrato. Éste es el caso de *C. bresadolae*, que es capaz de degradar celulosa suministrada en forma de papel de filtro.

La podredumbre parda produce un compuesto que penetra en la estructura de la celulosa y rompe los enlaces glicosídicos. Para que esto ocurra se necesita una sustancia más pequeña que cualquier celulosa conocida. Con ninguna celulosa aislada se ha podido reproducir el efecto de la podredumbre parda en celulosa. Dicha podredumbre puede emplear un mecanismo alternativo de ruptura de celulosa.

KOENIGS (1972b, 1974b) describe que la podredumbre parda está relacionada con la producción de  $H_2O_2$  en cultivo de madera. Pone en evidencia que un sistema  $H_2O_2/Fe$  puede ser empleado por hongos que presenten este tipo de podredumbre, para despolimerizar celulosa. Demuestra que el grado de despolimerización por  $H_2O_2/Fe$  en pino y abeto es similar al producido por hidrólisis ácida y por podredumbre parda.

Varias pruebas de degradación de celulosa por hongos causantes de esta podredumbre indican que la degradación es oxidativa (BOXWELL, 1938; BRAY & ANDREWS, 1924).

En cualquier caso, la comparación de los resultados de la celulosa tratada con  $H_2O_2/Fe$  y la celulosa atacada por estos hongos aún no ha sido totalmente interpretada. La reacción de  $H_2O_2/Fe$  y el pH durante el tratamiento afecta a la cantidad de oxidación intramolecular y a la naturaleza de los grupos que han resultado oxidados (IVANOV, *et al.*, 1953). De esta manera, se muestra que los hongos causantes de podredumbre parda emplean un mecanismo oxidativo para romper la celulosa.

Se han identificado los productos de la reacción para conocer el mecanismo de ataque de la podredumbre parda. Sin embargo, esto no es fácil de demostrar, dado que los estados más tardíos de la oxidación llegan a ser tan numerosos que la identificación de los productos de la reacción primaria es casi imposible (NIKITIN, 1962).

En nuestro caso puede afirmarse que *Ceriporia bresadolae* sólo degrada celulosa previamente tratada con  $H_2O_2/Fe$ . En ensayos realizados sin tratamiento previo no se produce pérdida de peso. Estos resultados están en la línea de las experiencias realizadas, hasta ahora, por numerosos autores.

### DEGRADACIÓN DE LIGNINA

Durante treinta años se ha estudiado la biosíntesis y estructura de este complejo polímero aromático (KIRK, 1975; IGUCHI, 1971; SARKANEN & LUDWIG, 1971; FREUDENBERG, 1968). A pesar de las numerosas investigaciones de estos últimos años, el proceso de descomposición no está definido (ANDER & ERIKSON, 1978). En cuanto a los cambios producidos por el hongo, puede decirse que la podredumbre blanca descompone la madera y convierte la lignina eventualmente en  $CO_2$  y  $H_2O$ . El proceso de podredumbre blanca se interrumpe en algún momento y quedan lignina y celulosa inalteradas (KIRK, 1975). Sin embargo, las zonas a las que han tenido acceso los enzimas quedan muy modificadas (KIRK & ADLER, 1979).

Cuando se han podido aislar algunas de las ligninas modificadas, libres de contaminantes, se ha comparado con la lignina intacta, lo que da idea de los cambios producidos (CRAWFORD, 1978; CRAWFORD, *et al.*, 1979).

En general, los hongos que producen podredumbre parda tienen mayor preferencia por los carbohidratos que componen la madera que por los componentes de la lignina (BRAY & ANDREWS, 1924; KIRK & HIGHLEY, 1973). KIRK

& ADLER (1979) demuestran que los residuos de lignina procedentes de madera descompuesta por hongos de podredumbre parda están más demetilados que los que proceden de la misma madera sin atacar.

Abundan más los estudios sobre degradación de celulosa que sobre degradación de lignina. Probablemente esto es debido a la mayor dificultad que presenta el conocimiento de los polímeros de lignina, que impiden una mayor comprensión de los fenómenos que tienen lugar en el ataque fúngico.

En el caso de *C. bresadolae* se ha comprobado que no muestra unas preferencias claras entre sustratos como celulosa y lignina, ya que sobre ambas es capaz de producir pérdida de peso, aunque ello es más evidente sobre lignina. Aún son pocos los estudios que existen de degradación de lignina por hongos, pero ya se han encontrado varias especies capaces de realizarla, entre ellos *C. bresadolae*.

#### AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Francisco Sabater, del Departamento de Biología de la Universidad de Murcia, que puso a nuestra disposición tanto laboratorio como material de trabajo del que nosotros carecíamos. También al Dr. M. Rubio, del Departamento de Química Técnica de la Universidad de Murcia, que nos proporcionó lignina sintetizada por el método IOTECH.

#### BIBLIOGRAFÍA

- ANDER, P. & ERIKSON, K. E. 1978. Lignin degradation by fungi and bacteria. *Prog. Ind. Microbiol.*, 14: 1-58.
- BOSWELL, J. G. 1938. The biochemistry of dry-rot in wood. III. Investigation of the products of the decay of fine wood rotted by *Merilius lacrymans*. *Biochem. J.*, 32: 218-229.
- BRAY, H. W. & ANDREWS, T. M. 1924. Chemical changes of groundwood during decay. *Ind. Eng. Chem.*, 16: 137-139.
- COWLING, E. B. 1961. Comparative biochemistry of the decay of sweetgum by white-rot and brown-rot fungi. *U. S. Dep. Agric., For. Serv. Tech. Bull.*, 1258: 15-62.
- CRAWFORD, D. L. 1978. Lignocellulose decomposition by selected *Streptomyces* strains. *Appl. environ. Microbiol.*, 35: 1,041-1,045.
- CRAWFORD, R. L., ROBINSON, L. E. & CHEH, A. M. 1979. *Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry and Applications*. CRC. West Palm Beach.
- FREUDENBERG, L. 1968. *Constitution and Biosynthesis of lignin*. Freudenberg, K. & Neish A. C., eds. New York.
- HIGHELEY, T. L. 1973. Influence of carbon source on cellulose activity of white-rot and brown-rot fungi. *Wood and Fiber*, 5(11): 50-58.
- 1975. Can wood-rot fungi degrade cellulose without other wood constituents? *For. Prod. J.*, 25 (7): 25-36.
- 1977. Requirements for cellulose degradation by a brown-rot fungus. *Material u. organism.*, 12: 24-32.
- 1978. Degradation of cellulose by culture filtrates of *Poria placenta*. *Material u. organism.*, 12: 162-174.
- HIGUCHI, T. 1971. Lignin biodegradation: chemistry and applications. *Adv. Enzymol.*, 34: 207-293.
- IVANOV, V. I., KAVENZNEVA, E. D. & KUZNETSOVA, Z. I. 1953. Chemical changes produced in the cellulose macromolecule by oxidizing agents. Chemical changes in cellulose by oxidation with hydrogen peroxide. *Div. Chem. Sci. Acad. USSR. Bull.*, 2: 341-350.
- KIRK, T. K. 1971. Effects of microorganisms on lignin. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 9: 185-210.
- 1975. Lignin-Degrading Enzyme System. *Biotechnol. & Bioeng. Simp.*, 5: 139-150.
- KIRK, T. K. & ADLER, E. 1969. Lignin: structure and reactions. *Acta Chem. Scand.*, 23: 705-708.
- KIRK, T. K., CONNORS, W. J., BLEAM, R. A., HACKETT, W. F. & ZEIKUS, J. G. 1975. Preparation and Microbial descomposition of synthetic <sup>14</sup>C lignins. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 72(7): 2,515-2,519.
- KOENIGS, J. W. 1972a. Effects of hydrogen peroxide on cellulose and its subceptibility of cellulose. *Material u organism*, 7: 133-147.
- 1972b. Production of extracellular hydrogen peroxide and peroxidase by wood-rotting fungi. *Phytopath.*, 62: 100-110.
- 1974a. Hydrogen peroxide and iron: A proposed system for decomposition of wood by brown-rot basidiomycetes. *Wood and Fiber* 6 (1): 66-79.
- 1974b. Production of hydrogen peroxide by wood-decaying fungi in wood and correlation with weight loss, depolymeritation and pH changes. *Arch. Mikrobiol.*, 99: 129-145.
- NIKITIN, N. I. 1962. *The chemistry of cellulose and wood*. Daniel Davey. New York.
- NILSSON, T. 1973. Studies on wood degradation and cellulolytic activity of microfungi. *Stud. for. Suec.*, 104: 59-67.
- 1974a. The degradation of cellulose and the production of cellulase, xylanase, mannannase and amylase by wood-attaching microfungi. *Stud. for. Suec.*, 114: 61-74.
- 1974b. Microscopic studies on the degradation of callophane and various cellulosic fibres by wood attaching microfungi. *Stud. for. Suec.*, 117: 21-28.
- SARKANEN, H. Y. & LUDWIG, C. A. 1971. *Lignins occurrence, formation, structure and reactions*. Wiley-Interscience. New York.
- SCHAEFFER, D. C. 1961. Über Bildung und Wirkung eines zelluloses Paltenden Fermentes and Schimmelpilzen. *Ber. Schweiz. bot. Ges.*, 67: 217-270.