PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

ACCION BACTERIANA SOBRE LIGNOCELULOSA Y COMPUESTOS MODELO DE LIGNINA.

Daniela Seelenfreund Hirsch.

Tesis para optar al grado de DOCTOR EN CIENCIAS BIOLOGICAS con mención en BIOLOGIA CELULAR

Director de Tesis: Dr. Rafael Vicuña E.

Marzo 1989

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR

ACCION BACTERIANA SOBRE LIGNOCELULOSA Y COMPUESTOS MODELO DE LIGNINA.

Daniela Seelenfreund Hirsch.

Tesis para optar al grado de DOCTOR EN CIENCIAS BIOLOGICAS con mención en BIOLOGIA CELULAR

Director de Tesis: Dr. Rafael Vicuña E.

Marzo 1989

NAMES OF TAXABLE PARTY.

A Arturo y Pablo A mis padres y Andrea

AGRADECIMIENTOS.

- Agradezco a Rafael Vicuña por haberme guiado en esta tesis y por haber tenido más visión que yo en los momentos en que nada resultaba. Admiro su incansable entusiasmo, su vitalidad y su rectitud y comprensión como ser humano.
- En forma muy especial quiero agradecer a Carmen Rüttimann, Bernardo Gonzàlez, Manuela Goycoolea, Alejandro Merino, Amalia Sapag, Ivàn Olave, Marisol Almeida, Patricio Hinrichsen y Loreto Salas por haber compartido tantos gratos momentos. Todos ellos, cada uno a su manera, han hecho que durante estos años el Box 1 sea un rincòn de armonia, de amistad y de apoyo en los momentos dificiles.
- Deseo agradecer también a todos mis compañeros y amigos del laboratorio, a los que están y a los muchos que se han ido, su amistad y los gratos momentos compartidos.
- A Carmen quiero expresarle que su amistad, su colaboración y apoyo fueron para mi muy importantes, tanto en el plano personal como para el desarrollo de la tesis.
- Agradezco a la Dra. Catherine Lapierre su generosa ayuda en los anàlisis de tioacidòlisis.
- Agradezco al Dr. Eduardo Agosin su apoyo, sus sugerencias y la posibilidad de utilizar su laboratorio en diversas ocasiones.
- A Maria Inès quiero agradeceer su amistad y tambièn su colaboración en el desarrollo del trabajo experimental.
- Agradezco a la Dra. Francisca Lòpez su colaboración y esfuerzo en algunas etapas de esta tesis.
- Agradezco al Dr. Tato Radic su entusiasmo y el haber puesto todo su laboratorio a mi disposición.
- Agradezco a Mike Mozuch su interès y buena voluntad en el anàlisis de muestras.
- A Inès Calderòn agradezco su colaboración en la identificación de las cepas y su permanente buena voluntad e interès.

- Agradezco al Dr. Kent Kirk sus sugerencias y por haber dado acceso a las facilidades de su laboratorio.
- A los Drs. Octavio Monasterio y Guillermo Gonzàlez agradezco su entusiasmo en tratar de dilucidar la estructura de un compuesto esquivo.
- Agradezco al Dr. Juan Carlos Vega por permitirme utilizar su laboratorio para montar ahl la tècnica de tipacidòlisis.
- Agradezco al Dr. Leandro Herrera su apoyo y su colaboración en los análisis de contenido de nitrogeno realizados en su laboratorio.
- Agradezco a la Dra. Gloria Montenegro la colaboración prestada en la preparación de muestras para microscopía electrônica de barrido.
- Agradezco a Becky su eficiente ayuda durante toda mi permanencia en el laboratorio.
- Deseo agradecer la colaboración de Enrique Valdebenito y Gabriel Muñoz en el quehacer diario del laboratorio.
- Al Dr. Manuel Ruiz, Vera Napoleone y Verònica Bagliatti agradezco el apoyo prestado en los anàlisis de carbohidratos.
- A Pancho Solis y Pedro Cortès agradezco la confección de las figuras y el material fotográfico, respectivamente.
- Agradezco el permanente interès de Forestal Fedro de Valdivia, filial de Celulosa Arauco y Constitución en el trabajo realizado por nuestro grupo. Esta iniciativa ha sido una oportunidad poco común en nuestro medio, que nos ha permitido desarrollar nuestro trabajo con nuevos incentivos y mejores medios.
- Agradezco a la Vicerrectoría Acadêmica de esta Universidad por haberme apoyado con una beca de mantención durante practicamente toda mi permanencia en el Programa de Doctorado.
- A Fresia, mi suegra, quiero expresarle mi inmensa gratitud. Su dedicación y cariño a Pablo permitieron que yo pudiera trabajar tranquila.

- A mis padres y a mi hermana Andrea quiero agradecer que en todo momento estaban ahi (aunque no siempre fisicamente) para darme su apoyo y estimulo.
- A Arturo quiero agradecer su constante apoyo moral y cariño. Creo que puse a prueba su paciencia muchas veces. Arturo me ayudò a perseverar con el ejemplo de su propio empuje y sentido positivo de las cosas.
- Finalmente quiero agradecer a las muchas personas que no he nombrado y que de algún modo me han dado su amistad y aprecio. Muchas gracias.

INDICE GENERAL.

		Pàgina
INDIC	E DE I	FIGURASv
INDIC	E DE .	TABLASvii
ABREV	IATUR	ASvii
		······································
SUMMAI	RY	
INTRO	DUCCI	DN
Es	tructi	ura y sintesis de lignina
Bi	odegra	adación de lignina4
MATER	IALES	Y METODOS16
I. MA	TERIA	LES
1.	Mater	rial biològico
	1.1.	Cepas microbianas16
	1.2.	Proteinas16
	1.3.	Sustratos biològicos
	1.4.	Medios de cultivo
2.	React	tivos
	2.1.	Reactivos generales
		Compuestos aromáticos18
	2.3.	Reactivos utilizados en anàlisis químico18
		2.3.1. Reactivos utilizados en el anàlisis
		de carbohidratos18
		2.3.2. Reactivos utilizados en tipacidòlisis19
	2.4.	Material usado en experimentos genéticos19
3.		rial cromatográfico19
4.	Misce	elàneos19
II. ME	ETODOS	5,,
1.	Mane	jo de microorganismos
		Bacterias no filamentosas20
		1.1.1. Aislamiento y cultivo de cepas20
		1.1.2. Mantenciòn de cepas
		1.1.3. Identificación de cepas
	1.2.	Bacterias filamentosas21
		1.2.1. Cultivo de Streptomyces viridosporus T7A.21
		1.2.2. Mantenciòn de la cepa
		1.2.3. Preparación de inòculos22
		Basidiomicetes23
		1.3.1. Cultivo de Ganoderma applanatum23

		1.3.2. Mantenciòn de la cepa24
		1.3.3. Preparación de inóculos de 6. applanatum.24
2.	Prepa	araciòn de sustratos25
	2.1.	Sustratos preparados por sintesis quimica25
	2.2.	Sustratos preparados por extracción
		y purificación28
		2.2.1. Lignocelulosa de paja de trigo28
		2.2.2. Fraccionamiento de lignina kraft28
	2.3.	Sustratos preparados biológicamente29
		2.3.1. Obtención de APPL en medio liquido29
		2.3.2. Cuantificación de APPL en
		medio liquido
		2.3.3. Obtención de APPL en medio sòlido30
		2.3.4. Cosecha de APPL31
		2.3.5. Esterilización de APPL31
3.		isis de productos metabòlicos de bajo
	peso	molecular32
	3.1.	
	3.2.	Cromatografia en capa fina (TLC)32
	3.3.	
		presiòn (HPLC)33
		Resonancia magnètica nuclear (NMR)
	3.5.	Espectrometria de masas (MS)
	3.6.	Espectros infra-rojo (IR)30
4.	Anali	isis quimico de productos metabòlicos
		lto peso molecular36
	4.1.	Determinación de hidratos de carbono en
		muestras de APPL
		4.1.1. Preparación de muestras y calibración36
		4.1.2. Preparación de acetatos de alditoles37
	0 5	4.1.3. Analisis por cromatografía gaseosa39
	4.2.	Tioacidòlisis
	4.2.	Tioacidòlisis
	4.2.	Tioacidòlisis
		Tioacidòlisis
		Tioacidòlisis
	4.3.	Tioacidòlisis

٥.	Anali	isis cromatográfico y espectroscópico de
	produ	uctos metabòlicos de alto peso molecular43
		Filtraciòn en gel43
	5.2.	Cromatografia liquida de alta presiòn
		de APFL43
	5.3.	Cromatografia liquida de alta presión
		de la fracción soluble en èter de
		lignina kraft44
	5.4.	Anàlisis espectrofotomètrico de APPL45
	5.5.	Espectros de fluorescencia de APPL46
	5.6.	Resonancia magnètica nuclear de APPL46
	5.7.	Espectros infra-rojos de FIE
6.	Měto	dos de manipulación genètica47
	6.1.	Detección de plasmidios47
	6.2.	Electroforesis de DNA48
		6.2.1. Geles de agarosa48
		6.2.2. Visualización de DNA48
	6.3.	Eliminación de plasmidios (curación)49
	6.4.	Conjugación celular49
7.	Medio	ciòn de actividades enzimàticas extracelulares50
	7.1.	Ensayo de ligninasa50
	7.2.	Medición de lacasa + peroxidasa
		en sobrenadantes de <i>G. applanatum</i>
8.	Micro	oscopła electronica51
	8.1.	Microscopia electrònica de barrido51
	8.2.	Microscopla electrònica de transmisiòn52
RESUL	rados.	
1.	Canad	cterización metabólica de S. viridosporus T7A54
	1.1.	Metabolización de monómeros modelo
		de lignina54
	1.2.	Un caso especial : el àcido protocatecuico58
	1.3.	Utilización de compuestos dimèricos
		modelo de lignina64
		1.3.1. Compuestos del tipo 6-1
		1.3.2. Compuestos de estructura 6-0-466
		1.3.3. Compuestos bifenilos
		1.3.4. α-fenilcinàmico
	1.4.	Utilizaci ò n de lignina kraft
		1.4.1. Efecto de FSE y FIE sobre el crecimiento
		de S. viridosporus T7A en extracto
		de levadura70
		1.4.2. Anàlisis mediante HPLC de la FSE antes

	y despuès de incubar con S.
	viridosporus T7A73
1	Efecto sobre Azul de Remazol
1.6.	Producción de APPL79
	1.6.1. Producción en medio líquido
	1.6.2. Producción en medio sólido82
	1.6.2.1. Caracterización
	fisica de APPL82
	1.6.2.2. Anàlisis quimico
	de los APPL85
2. Aislamie	ento y caracterización de cepas bacterianas
que (metabolizan compuestos modelo de lignina de
bajo	peso molecular96
2.1.	Aislamiento y caracterización metabólica96
2 = 2 =	Bůsqueda de plasmidios degradativos99
	2.2.1. Ensayos de curación100
	2.2.2. Ensayos de conjugación102
3. Aisl	amiento y caracterización de cepas que
crec	en en APPL105
3.1.	Identificación, morfología y caracterización
	de tres cultivos seleccionados107
	3.1.1. Acción de los cultivos seleccionados
	sobre compuestos modelo de lignina111
	3.1.2. Acción de los cultivos seleccionados
	sobre hidratos de carbono113
3.2.	Acciòn de bacterias sobre APPL118
	3.2.1. Anàlisis mediante mètodos
	fisico-quimicos118
	3.2.2. Anàlisis quimico121
	3.2.2.1. Acciòn bacteriana sobre
	el componente glucidico de los APPL121
	3.2.2.2. Acciòn bacteriana sobre
	el componente aromàtico de los APPL124
4. Efec	to de hongos sobre APPL126
4.1.	Efecto de Ganoderma applanatum sobre APPL127
4.2.	Efecto de peroxidasa de lignina de
	P. chrysosporium sobre APPL128
DISCUSION.	
REFERENCIAS	BIBLIOGRAFICAS158

Indice de Figuras.

			pågina
Figura	1:	Esquema estructural de la lignina	3
Figura	2:	Estructuras moleculares de compuestos	
		modelo de lignina utilizados	26
Figura	3:	Oxidación de alcohol p-anisico y	
		p-anisaldehido a àcido anisico	. 56
Figura	4:	Producción de APPL a partir de	
		lignocelulosa de trigo por acción de	
		S. viridosporus T7A, en presencia de	
		diversos compuestos aromáticos	57
Figura	5:	Oxidación de alcohol veratrilico a	
		àcido veràtrico	59
Figura	6:	Acción de S. viridosporus T7A	
		sobre los àcidos protocatecuico y gentísico.	60
Figura	7:	Perfil de elución de HPLC de muestras	
		de cultivos de S. viridosporus T7A	
		suplementados con àcido protocatecuico	62
Figura	8:	Reducción de compuestos de estructura	
		diariletano por S. viridosporus T7A	
			65
Figura	9:	Perfil de elución de HPLC de muestras	
		tomadas de cultivos de S. viridosporus	
		T7A suplementados con VGGE	68
Figura	10:	Efecto de fracciones purificadas de	
		lignina kraft sobre el crecimiento de	
			72
Figura		Perfil de elución de HPLC de	
		sub-fracciones de la fracción soluble	
		en èter de lignina kraft despuès de	
		incubar en presencia de esporas y micelios	
		de S. viridosporus T7A	75
Figura	12:	Efecto de S. viridosporus T7A	
		sobre Azul de Remazol	
Figura			
		est of	
		incubada con S. viridosporus T7A	
Figura	14:	Producción de APPL en medio líquido	81

Figura	15:	Cromatografia liquida a travès de
		una columna Sephadex G-50 del polimero
		soluble (APPL) generado por acción de
		S. viridosporus T7A sobre lignocelulosa
		de trigo83
Figura	16:	Cromatografia liquida de alta presión
		a travès de una columna Shodex Ion Pak
		804/S del polimero soluble (APPL) generado
		al incubar S. viridosporus T7A sobre
		lignocelulosa de trigo durante 2-6 semanas86
Figura	17:	Anàlisis de carbohidratos en el curso
. 190. 0	-/-	temporal de formación de APPL por acción
		de S. viridosporas T7A sobre
		lignocelulosa de trigo
Figura	18.	Efecto de filtración e incubación
1 I gar a	10.	sobre la composición glucídica de APPL89
Figura	10.	Efecto de la filtración a través de
rigara	1/1	membranas de 45 μ de diàmetro sobre el
		peso molecular de los APPL90
Figure	20-	Perfiles de cromatografla gaseosa de
rigura	20:	muestras de APPL sometidas a tioacidòlisis92
Fi	21.	
rigura	21:	Evidencia de la presencia de àcido
		ferülico en muestras de APPL mediante
		cromatografia de gases acoplada a
		espectrometria de masas95
Figura	22:	Electroforesis en gel de agarosa al
	-1	0,8 % de plasmidios de diferentes cepas101
Figura	23:	Microscopla electrônica de cepas
		bacterianas que crecen en APPL
Figura	24:	Curvas de crecimiento en APPL de
		cultivos seleccionados110
Figura	25:	Espectros de fluorescencia de
		sobrenadantes de cultivos en APPL116
Figura	26:	Variación del contenido de hidratos
		de carbono de APPL por efecto de
		incubación con cepas bacterianas123
Figura	27:	Descoloración de Azul de Remazol en
		cultivos de 6. applanatum conteniendo
		arginina como fuente de nitrôgeno,
		y medición de actividades enzimàticas
		extracelulares129

Indice de Tablas.

			página
Tabla	Nº 1.	Valores de Rf encontrados para los	
		compuestos modelo de lignina ensayados	. 34
Tabla	Nº 2.	Anàlisis por tipacidòlisis de	
		residuos aromàticos de lignocelulosa	
		de trigo y APPL	93
Tabla	Nº 3.	Anàlisis por tioacidòlisis de	
		residuos aromàticos de diversas	
		especies vegetales	93
Tabla	Nº 4.	Versatilidad metabólica de	
		cepas aisladas en compuestos	
		modelo de lignina	98
Tabla	Nº 5.	Resumen de ensayos de eliminación	
		de plasmidios (curación)	.103
Tabla	Nº 6.	Resumen de ensayos de conjugación	
		realizados con cepas aisladas	
		en compuestos aromáticos simples	104
Tabla	Nº 7.	Identificación de cepas seleccionadas	108
Tabla	Nº8.	Crecimiento en compuestos modelo de	
		lignina de cepas seleccionadas en APPL	.112
Tabla	Nº 9.	Crecimiento en hidratos de carbono de	
		cepas seleccionadas en APPL	.114
Tabla	Nº 10.	Metabolización de hemicelulosas	
		por cultivos seleccionados	.117
Tabla	Nº 11.	Anàlisis por tioacidòlisis	
		de la fracción aromática de los APPL	
		incubados con cepas bacterianas	
		seleccionadas	. 125

Abreviaturas.

APPL : polimero hidrosoluble rico en lignina

D : Daltons

FIE : Fracción de lignina kraft insoluble en éter FSE : Fracción de lignina kraft soluble en éter

G : Residuos guaiacilicos de la lignina

GC-MS : Cromatografia gaseosa y espectrometria de masas

GGGE : Guaiacilglicerol-#-quaiacileter

H : Residuos p-hidroxibenzoilos de la lignina

HMDA : Hidroximetildesoxianisolna

HMRDA: Hidroximetildesoxianisolna reducida
HPLC: Cromatografia liquida de alta presión

I.R. : Infrarrojo

M.S. : Espectrometria de masas

NMR : Resonancia Magnètica Nuclear

S : Residuos siringilos de la lignina

TE : Tris-HC1, EDTA

TEA : Trizma-base, EDTA, acetato de sodio

TLC : Cromatografia en placa fina

UV : Ultravioleta

VGGE : Veratrilglicerol-f-guaiacilèter

RESUMEN.

En este trabajo se estudiò la acción de una bacteria filamentosa y de diversas cepas bacterianas Gram negativas sobre lignocelulosa y compuestos modelo de lignina, con el fin de contribuir al conocimiento del papel de los procariotes en la biodegradación de lignina.

bacteria filamentosa escogida como modelo fue Streptomyces viridosporus T7A. que pertenece al orden de Actinomycetes. Este microorganismo resulta atractivo, puesto ataca lignocelulosas solubilizando un polimero rico en lignina, el que a su vez puede ser utilizado como sustrato de otros microorganismos. El mecanismo de liberación de lignina soluble bacteria es desconocido. Como una aproximación entendimiento de dicho mecanismo, se hizo una caracterización metabòlica de esta especie con respecto a su capacidad de modificar o degradar compuestos modelo de lignina monomèricos. dimèricos y preparaciones de lignina kraft de alto molecular. Se observò que S. viridosporus T7A oxida diversos aromàticos simples al àcido correspondiente. comprobò ademàs que la bacteria no es capaz de romper los enlaces caracteristicos de lignina ensayados (f-1, f-0-4 y bifenilo), en cambio si reduce cetoles de estructura tipo f-1 (diariletanos) a acción sobre fracciones purificadas la forma diòlica. Su lignina kraft es bastante limitada. Los resultados sugieren que S. viridosporus T7A no posee enzimas ligninoliticas y que la formación del producto polimèrico soluble en aqua y rico en lignina denominado APPL, podria deberse a la presencia de polisacaridasas, lo cual coincide con resultados autores.

Anàlisis de los APPL liberados revelaron que estos se forman en el transcurso de ocho dias, que contienen cerca de un 20 % de carbohidratos y que poseen un menor contenido de residuos de glucosa que la lignocelulosa de la cual se originan. Asimismo, se detectaron cambios en la porción aromàtica de los APPL, encontrandose un aumento en la razón de residuos siringilos a guaiacilos con respecto al sustrato inicial.

Se aislaron cepas bacterianas no filamentosas capaces de utilizar compuestos aromàticos simples como única fuente de carbono y energía. Todas ellas pertenecían a la familia de las *Pseudomonas*. Estudios genèticos de estas cepas indicaron que alrededor del 20 % de ellas contenía plasmidios. Se realizaron múltiples ensayos de eliminación de plasmidio (curación) y conjugaciones, sin demostrarse si dichos elementos extracromosomales están o no involucrados en la metabolización de los compuestos aromàticos estudiados. Por otra parte, se estableció que las cepas aisladas se desarrollaron escasamente en APPL cuando èstos eran la única fuente de carbono disponible en los cultivos.

Se procedió entonces a aislar nuevas cepas bacterianas no filamentosas en cultivos de enriquecimiento utilizando APPL como única fuente de carbono y energía. Se seleccionaron para un mayor estudio los tres cultivos que alcanzaron la mayor densidad óptica de crecimiento. Estos se identificaron a nivel de gênero, encontrândose que uno de ellos correspondía a un consorcio de dos cepas. Utilizando métodos físico-químicos y espectroscópicos, no fue posible detectar cambios en el sustrato al têrmino de la incubación. Sin embargo, análisis químicos de APPL incubados con bacterias indicaron que algunas de èstas crecen a expensas de la porción glucídica de los APPL, en cambio otras lo hacen modificando la porción aromática del sustrato. Ninguna de las

cepas estudiadas introdujo simultàneamente cambios significativos en ambos componentes de los APPL. Los cultivos se caracterizaron también con respecto a su capacidad para metabolizar compuestos aromàticos simples, modelos diméricos de lignina, monosacáridos, celulosas y hemicelulosas. Se encontró que la versatilidad de las cepas para metabolizar estos diversos compuestos posee un valor indicativo, aunque no absoluto, de la acción de cada una de ellas sobre los APPL.

Se estudiò tambièn el efecto del basidiomicete Ganoderma applanatum sobre los APPL. A pesar de que este hongo es un componente fundamental del sistema ligninolítico selectivo conocido como "palo podrido", no se detectò modificación de los APPL mediante las tècnicas empleadas. Asimismo, utilizando preparaciones purificadas de peroxidasa de lignina del hongo ligninolítico Phanerochaete chrysosporium, no se encontrò alteración de los APPL en las condiciones ensayadas.

the contract of the contract o

protectly resident but the continue of the continue value of anything has

SUMMARY,

Research was carried out to study the effect of a filamentous bacterium and several non-filamentous bacterial strains on wheat lignocellulose and lignin model compounds, in order to contribute to our understanding of the role played by procaryotes in lignin breakdown.

The filamentous bacterium chosen for this work, Streptomyces viridosporus T7A, belongs to the Actinomycetes group. This microorganism is convenient for our purposes due to its ability to attack lignocellulose releasing a soluble lignin-rich polymer, which in turn can be tested as a substrate for other microorganisms. The mechanism used by this bacterium to solubilize lignin is presently unknown. In order to gain insight into this mechanism, the capacity of this species to metabolize single ring aromatic compounds, lignin dimers and kraft lignin was analyzed. S. viridosporus T7A was able to oxidize several aromatic alcohols to the corresponding carboxylic acids. It not cleave dimeric lignin models containing characteristic lignin linkages, such as f-1, f-0-4 or biphenyl structures. However, diarylethane compounds with one or two carbonylic groups were reduced to their diolic form. The effect on purified kraft lighin fractions was rather limited. These results suggest that S. viridosporus T7A does not possess ligninolytic enzymes and that APPLs (for Acid Precipitable Polymeric Lignin), may be produced by the action of polysaccharidases, as reported by other authors.

Chemical analysis of the aromatic components of APPLs revealed that when compared to lignocellulose, they contain less guaiacyl residues and therefore an increased ratio of syringyl to guaiacyl units. APPLs contain about 20 % carbohydrate and have a lower glucose content than the wheat lignocellulose from which

they arise. The solubilization process is essentially completed within eight days.

Non-filamentous bacteria were isolated on enrichment cultures containing simple aromatic compounds as the sole carbon and energy source. All strains were found to belong to the *Pseudomonas* group. Genetic studies revealed that approximately 20 % of them contained extrachromosomal DNA. The involvement of these plasmids in the metabolization of the aromatic compounds could neither be proved nor disproved by multiple conjugation and curing experiments. Independent assays using the same strains showed that these bacteria grew poorly in cultures containing APPLs as sole carbon and energy source.

In order to study the bacterial degradation of APPLs, new strains were isolated on the latter. The three cultures which orew best in this medium were classified at the genus level used for further studies. One of these was a consortium of two strains. Spectrophotometric analysis of APPLs after growth of the different strains did not detect any change in the substrate to bacterial action. However, chemical analysis showed that isolates grew at the expense of the sugar moieties of the APPLs, while others attacked its aromatic components. None of the strains introduced significant changes into both components of the substrate. Cultures were also characterized with respect to their ability to grow on simple aromatic compounds, dimeric lignin models, monosaccharides, celluloses and hemicelluloses. The general conclusion was that the metabolic versatility of the different strains regarding these compounds correlated quite well, although not absolutely, with their specific action on APPLs.

The effect of the basidiomycete Ganoderma applanatum on APPLs was also studied. In spite of being one of the main

components of the selective ligninolytic system called "palo podrido", this fungus produced no detectable change in the APPLs with the techniques employed. Also, purified preparations of lignin peroxidase from the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* did not alter APPLs under the conditions used in this work.

The same transfer of the same

manufactor of girls did continue may be lost also beautiful. They had

The Control of the Co

Anneal of the Court of the South States of the South States and the South States of the Stat

Control principles for the principle of an experience of

ministration of common a Tradition, 1962, as importants in all

....

DEPOSITOR OF STREETING OF PERSONS

REPORTED THE REPORT OF THE PERSON OF THE PROPERTY PARTY OF THE PERSON OF

and the control of th

more than the same of the same

THE RESIDENCE OF THE CONTRACT OF THE PARTY O

competition, how you as all mattered to the second of the

INTRODUCCION

La totalidad de los seres vivientes se encuentran interrelacionados a través de múltiples equilibrios dinâmicos, siendo el ciclo del carbono uno de los más importantes. Más del 90 % del carbono terrestre se encuentra depositado en tres polímeros que están presentes en todos los vegetales superiores: la celulosa, la hemicelulosa y la lignina (Janshekar y Fiechter, 1983). Entre éstos, la celulosa es el más abundante (40 %), constituyendo la lignina alrededor de un 25 % del total (Janshekar y Fiechter, 1983). Si se considera además que la lignina representa un 40 % de la energía solar almacenada en plantas y que es el polímero aromático más abundante de la naturaleza (Janshekar y Fiechter, 1983), su importancia en el ciclo del carbono resulta evidente.

Estructura y sintesis de lignina.

El contenido, la composición y la estructura de la lignina difieren según la especie, el tejido y edad del vegetal. Sin embargo, a todos ellos la lignina les proporciona rigidez y participa además en el sistema de resistencia frente a agresiones bióticas y abióticas del medio. Por ejemplo, la lignificación es una respuesta fisiológica frecuente frente a lesiones e infecciones por patógenos (Collendavelloo y cols., 1983). Adicionalmente, debido a su carácter impermeable, evita la pérdida de agua de los tejidos.

La sintesis de la lignina ocurre en la pared celular a partir de los alcoholes p-hidroxicinamilico, coniferilico y sinapilico, los que en el polimero nativo dan origen a los

residuos p-hidroxifenilo, guaiacilo y siringilo, respectivamente. El alcohol cinamilico se forma por desaminación de la fenilalanina, reacción catalizada por la fenilalanina amonio liasa (PAL) (Higuchi, 1985). En pastos existe también una liasa específica para tirosina (TAL), la que contribuye a la formación de alcohol p-hidroxicinamilico (Higuchi, 1985; Crawford, 1981). La abundancia relativa de los residuos presentes en la lignina nativa varía según la especie del vegetal. Así, la madera de gimnospermas es rica en guaiacilo, en tanto que las maderas de angiospermas contienen principalmente guaiacilos y siringilos (Higuchi, 1985). A su vez, la lignocelulosa de pastos contiene los tres tipos de residuos (Higuchi, 1985).

La polimerización de los alcoholes aromáticos precursores es catalizada inicialmente por peroxidasas vía radicales libres, los que reaccionan entre si al azar formando diversos enlaces C-C y C-O-C que son resistentes a la hidrólisis. De este modo se forman quinonas, las que se estabilizan por uniones èteres a hemicelulosas o mediante adición nucleofílica de agua, ambos a nivel de carbono alfa * (Kirk, 1984). Polimerizaciones sucesivas dan origen a una macromolècula estereoirregular, no lineal e insoluble en agua.

En la Figura 1 se muestra una estructura modelo del polímero de lignina, la que contiene los enlaces encontrados con mayor frecuencia entre los diferentes residuos. La unión más común es la denominada arilglicerol- θ -aril êter (por ejemplo, θ -1

^{*} Los carbonos de la cadena alifàtica propanoide se denominan α , β y γ , siendo el primero el que està directamente unido al anillo.

Figura 1: Esquema estructural de la lignina. Tomado de Higuchi, 1985.

case the boyons ambition to adopt overlanding on animal payment con-

residuos 1-2 y 6-7), que representa alrededor del 50 % del total de enlaces en la molècula. Otras uniones importantes son la (estructura 1,2-diarilpropano, residuos 18-19 y 27-28) y el bifenilo (residuos 9-10 y 12-17). También se observan estructuras ciclicas tipo pinoresinol (residuos 7-8) y fenilcumarano (residuos 4-5 y 21-22) (Higuchi, 1985). En lignocelulosas de pastos existen además enlaces éster entre grupos hidroxilos y àcidos aromàticos, en especial, àcido cumárico y ferúlico (Kirk, 1984).

Biodegradación de lignina.

A diferencia de otros productos naturales, la lignina es muy refractaria al ataque microbiano. Sin embargo, en ciertas condiciones ambientales de temperatura y humedad, su degradación puede ocurrir en forma relativamente acelerada. Este es un proceso oxidativo en el cual los hongos desempeñan un rol protagónico, aunque existe creciente evidencia de la participación adicional de actinomicetes y bacterias no filamentosas (Kirk y Farrell, 1987; Vicuña, 1988).

Los hongos ligninolíticos más estudiados son los llamados de pudrición blanca, por ser los más eficientes en degradar la lignina a CO2 y H2O. Estos microorganismos consumen en forma simultánea los polisacáridos de la madera, aunque diversas especies de hongos exhiben grados variables de selectividad con respecto al polímero que atacan más rápidamente. La lignina no es utilizada como fuente de carbono por los hongos, siendo siempre degradada por cometabolización. La mayor parte de los trabajos se han centrado en el basidiomicete *Phanerochaete chrysosporium*. Se ha demostrado que su actividad ligninolítica es una manifestación del metabolismo secundario, el que se inicia en

condiciones de carencia de nitrògeno, carbono, fòsforo o azufre (Jeffries y cols., 1981; Leisola y cols., 1985). La ligninolisis requiere oxigenación adecuada y es modulada por alcohol veratrilico, un metabolito secundario del hongo (Lundquist y Kirk, 1978; Shimada y cols., 1981).

A fines de 1983 se marcò un hito en este campo con el descubrimiento de la ligninasa de P. chrysosporium (Tien y Kirk, 1983; Glenn y Gold, 1983). Esta enzima es una hem-glicoproteina que pesa 40-42.000 D y que actúa como peroxidasa dependiente de H202 (Tien y Kirk, 1984; Glenn y Gold, 1983). Se han descrito diversas isoenzimas de la ligninasa (Kirk y cols., 1986; Leisola y cols., 1987; Tien, 1987) e incluso se ha logrado cristalizar una de ellas (Troller y cols., 1988). Se han secuenciado algunos de sus genes (Tien y Tu, 1987; Smith y cols., 1988), los que expresan de acuerdo a las condiciones del cultivo (Farrell cols., 1988). Sin embargo, ellas no difieren en especificidad, ya que se ha comprobado con sustratos sencillos que catalizan una serie de reacciones que incluyen ruptura de enlaces C_{α} - C_{β} F-0-4, desmetoxilaciones, hidroxilación de olefinas, intradiol y de anillos aromàticos (Kirk, 1987; Kirk y Farrell. 1987). Esta carencia de especificidad, muy adecuada para degradar una macromolècula compleja como es la lignina, se debe a que las ligninasas actúan por un mecanismo que involucra la formación transiente de radicales libres (Kersten y cols., 1985; Hammel y cols., 1986), los que se reordenan siguiendo patrones que dictados por la estructura del sustrato. A pesar de los significativos avances de estos últimos años, el sistema ligninolitico del hongo no ha podido ser reconstituido in vitro. ya que paradójicamente la ligninasa purificada polimeriza la lignina (Haemmerli y cols., 1986). Por este motivo, resulta

urgente resolver el papel que otras enzimas de este microorganismo juegan en el proceso. Entre ellas, cabe mencionar a peroxidasas dependientes de manganeso (Kuwahara y cols., 1984), de las cuales tambièn hay isoenzimas (Paszczyńsky y cols., 1986), enzimas que generan el H₂O₂ (Kelley y Reddy, 1986; Kersten y Kirk, 1987; Nishada y Eriksson, 1987), etc.

El papel de los procariotes en la biodegradación de la lignina permanece aún poco claro. A pesar que se supone que en ambientes naturales este proceso ocurre con la participación de hongos y bacterias (Kaplan, 1980; Benner y cols., 1986), los estudios realizados a esta fecha con microflora mixta son relativamente escasos (Pellinen y cols., 1984; Jokela y cols., 1985; Jokela y cols., 1987). Existe acuerdo en que los hongos son los responsables de la despolimerización inicial de la lignina, lo que no implica que ellos mismos completen su mineralización cuantitativa. Existen además diversas modificaciones químicas, como oxidaciones de cadenas laterales y desmetilaciones, que bien pueden responder a la acción bacteriana. Más aún, la degradación de la lignina en medios acuáticos es causada principalmente por bacterias (Benner y cols., 1986).

Incubaciones de lignina radioactiva con bacterias no filamentosas han mostrado que los porcentajes de mineralización son bajos con respecto a los valores observados con hongos (Vicuña, 1988; Kirk y Farrell, 1987). Sin embargo, los resultados varian según la localización de la marca y la cepa estudiada. Por ejemplo, al cabo de 20 días de incubación, Bacillus megaterium degradó un 0,3 % de la marca localizada en el anillo de una preparación de DHP (polímero sintètico de monômeros de lignina, con gran semejanza estructural a la molecula nativa) y un 12 % de

la marca localizada en la cadena alifàtica de lignina de abeto (Robinson y Crawford, 1978).

Por otra parte, cepas de *Pseudomonas* que metabolizan diversos compuestos aromàticos simples, liberaron entre un 0,8 y 2,5 % de radiactividad de DHPs marcados en los grupos metoxilo luego de 15 dlas de incubación (Haider y cols., 1978).

Se ha encontrado también una cepa de Xanthomonas que luego de ser incubada durante 20 días en presencia de DHPs marcados en la cadena alifàtica, en el anillo o en los grupos metoxilo, libera alrededor de un 30 % de la radiactividad en forma de 14002 (Kern, 1984). En un trabajo posterior se demostrò que la actividad degradativa de dicha cepa es dependiente del peso molecular del sustrato, ya que la bacteria sòlo degradaba los oligòmeros de peso molecular menor de 1000 D. Por este motivo, los autores sugirieron que la mineralización observada inicialmente correspondía al metabolismo de fragmentos pequeños liberados abiòticamente al medio de cultivo durante la incubación (Kern y Kirk, 1987).

Hasta la fecha no hay evidencias que sugieran la existencia de enzimas ligninolíticas extracelulares en bacterias no filamentosas. Además, a diferencia de los hongos, las bacterias no filamentosas carecen de hifas que les facilitan el acceso a los sustratos, aunque se ha comunicado la existencia de bacterias que erosionan la madera produciendo cavidades que son visibles por microscopía electrônica de barrido (Nilsson y Singh, 1983; Nilsson y Daniel, 1983; Daniel y cols., 1987). En todo caso, la capacidad de las bacterias no filamentosas de descomponer oligômeros de lignina està firmemente establecida, de modo que su participación en el ciclo del carbono puede ser significativa.

Buenos candidatos de bacterias ligninolíticas son las Pseudomonas. Esta familia se distingue por su capacidad para metabolizar variados compuestos aromáticos, tanto naturales como xenobiôticos (Gibson y Subramanian, 1984; Reineke, 1984). Se han estudiado las vias catabólicas de diferentes tipos de compuestos aromàticos (Bayly y Barbour, 1984) y en algunos casos confeccionado los mapas gênicos correspondientes. En general, se ha encontrado que los genes que codifican para enzimas de una misma via se encuentran agrupados y son activados coordinadamente (Haas, 1983; Furukawa y Miyazaki, 1986). También se ha descrito frecuentemente en *Pseudomonas* la codificación de vias degradativas por DNA extracromosomal, como es el caso de los plasmidios TOL, SAL y NAH, que codifican la degradación de tolueno, salicilato y naftaleno, respectivamente (Yen y Gunsalus, 1982; Williams y Worsey, 1976; Chakrabarty, 1972). Salkinoja-Salonen y cols. han postulado la existencia de plasmidios catabòlicos responsables de la degradación de diversos àcidos benzoicos y fenilpropanoicos (Salkinoja-Salonen y cols., 1979). La evidencia mostrada por estos autores es escasa y està basada en la inestabilidad metabòlica observada en las cepas estudiadas. Recientemente, durante la realización de este trabajo, la hipòtesis de plasmidios catabòlicos de residuos de lignina fue confirmada por otros investigadores para los àcidos cinàmico (Andreoni y Bestetti, 1986) y ferùlico (Andreoni y Bestetti, 1988).

Un grupo de procariotes que està siendo ampliamente estudiado en el campo de la biodegradación de lignocelulosas es el de los *Actinomycetes*. Estas bacterias se caracterizan por desarrollar hifas en alguno de sus estados fisiológicos

(Goodfellow y Williams, 1983). Su amplia distribución en diversos suelos neutros y alcalinos, así como el gran número de diferentes especies encontradas, son indices de la importancia de estos microorganismos en el reciclaje de nutrientes (McCarthy, 1987). Se ha encontrado que algunas especies de esta familia, en especial aquellas que pertenecen al gènero de los Streptomycetes, aparecen con frecuencia en medios donde ocurre la descomposición de residuos vegetales (Goodfellow y Williams, 1983). Otros actinomicetes, como aquellos pertenecientes al gênero de las Thermomonosporas, participan junto a diversos hongos y bacterias en procesos de compostación (McCarthy, 1987). Las bacterias filamentosas estarian involucradas en la formación de humus, que es muy rico en compuestos aromàticos, aunque esta hipòtesis no se ha comprobado fehacientemente (McCarthy y cols., 1986; McCarthy, 1987). A pesar de estos antecedentes, se ignora cuál contribución específica de los actinomicetes a la mineralización de la lignina presente en la madera y lignocelulosas en general.

Al igual que en investigaciones con hongos y bacterias no filamentosas, se ha estudiado la acción de diversas especies de actinomicetes sobre ligninas y lignocelulosas radiactivas. Empleando esta metodología, se demostró que en 15 días cepas de Nocardia degradan a '*CO2 entre un 9,5-14,1, 6,4-9,5 y 4,0-7,6 % de una preparación de DHPs marcada en los grupos metoxilo, la cadena alifàtica y el anillo aromàtico, respectivamente (Trojanowski y cols., 1977; Haider y cols., 1978). Otros investigadores seleccionaron seis cepas de Streptomyces capaces de mineralizar entre un 2,8 y un 13,0 % de lignina de coniferas en 43 días (Phelan y cols., 1979). Utilizando una preparación de lignocelulosa de arce marcada con '*C en las cadenas alifàticas de la lignina, se demostró una

mineralización de la marca de un 2,0-3,5 % después de incubaciones por 43 días con tres cepas de *Streptomyces* (Crawford, 1978). La cantidad de radiactividad recuperada como 14CO2 a partir de la misma preparación de lignocelulosa marcada en la porción glucidica varió entre un 20 y un 40 % (Crawford, 1978). Otros autores investigaron también la acción de *Thermomonospora*, *Actinomadura*, *Streptomyces* y *Micromonosporas* sobre lignocelulosa de maíz radioactiva, encontrando también porcentajes bajos de mineralización (McCarthy y Broda, 1984).

Experimentos con lignocelulosas marcadas han demostrado ademàs que la actividad principal de los actinomicetes no consiste en mineralizar la lignina presente en ellas, sino màs bien en solubilizarla en el medio de cultivo (McCarthy, 1987). El porcentaje de marca liberada del sustrato puede alcanzar hasta un 30-40 % (McCarthy y Broda, 1984). Farte de este material soluble corresponde a compuestos aromàticos simples, pero una fracción significativa consiste en polímeros polifenólicos de alto peso molecular. Estos últimos son resistentes al ataque por los mismos Actinomycetes, ya que cuando son agregados a cultivos frescos, sòlo un 2,0-2,5 % adicional se degrada a CO2 (McCarthy y Broda, 1984).

Los polimeros solubles mejor estudiados son aquellos producidos por Streptomyces viridosporus T7A (Crawford y cols., 1983) y Thermomonospora mesophila (McCarthy y cols., 1986). Debido a su característica de precipitar en medio àcido, Crawford los denominò APPL (por Acid Precipitable Polymeric Lignin), tèrmino que se utilizarà en el transcurso de este trabajo. Los APPL estàn formados principalmente por un componente aromàtico proveniente de la lignina, pero contienen también entre un 10 y un 20 % de carbohidratos y alrededor de un 4 % de-

nitrògeno orgànico (Crawford y cols., 1983; McCarthy y cols., 1986). *T. mesophila* y *S. badius* producen APPL en cultivos liquidos, mientras que *S. viridosporus* T7A los libera tanto en medio liquido como sòlido (Borgmeyer y Crawford, 1985; McCarthy y cols., 1986).

Anàlisis químicos de APPL generados por *S. viridosporus* T7A y *S. badius* sobre lignocelulosa de maiz indican que contienen una composición de residuos aromàticos diferentes (Borgmeyer y Crawford, 1985). Más aún, el polímero soluble liberado está enriquecido en grupos hidroxilo fenòlicos y ácidos carboxílicos con respecto a la lignocelulosa de la cual proviene (Crawford y cols., 1983).

Las características de los APPL dependen de la especie que los genera, de las condiciones de cultivo y de la metodología empleada en su recuperación. Por ejemplo, el contenido de grupos fenòlicos de los APPL liberados por *S. badius* es bajo debido a la existencia en esta cepa de una fenol oxidasa extracelular (Borgmeyer y cols., 1985). Con respecto a condiciones de cultivo, la solubilización de lignocelulosa es más efectiva a pH alcalino (Pometto y Crawford, 1986). Por último, se ha descrito que los APPL recuperados mediante precipitación con àcido poseen un peso molecular mayor (> 20.000 D) que aquellos recuperados mediante diàlisis y posterior liofilización (alrededor de 10.000 D) (Crawford y cols., 1983).

Con respecto al mecanismo de solubilización de la lignocelulosa, inicialmente, el grupo de Crawford había propuesto la participación de una f-eterasa (Crawford y cols., 1983a), aunque experimentos recientes han puesto en duda esa posibilidad (Deobald y Crawford, 1987). Posteriormente, se han aislado mutantes de S. viridosporus T7A por tratamiento con luz

ultravioleta o de fusión de protoplastos, los que han permitido obtener algunos antecedentes al respecto (Pettey y Crawford, 1984). Información aún preliminar indica que las celulasas - y no las xilanasas - estarían involucradas en la liberación de APPL, ya que las bacterias sobreproductoras muestran niveles aumentados de endoglucanasas (Deobald y Crawford, 1987). Sin embargo, en el caso de cepas silvestres de 1. mesophila, S. cyaneus y Actinomadura no se ha encontrado correlación entre niveles de celulasas y la producción de APPL (McCarthy y cols., 1986; Mason y cols., 1988). En S. cyaneus se encontrò que la solubilización de la lignocelulosa estaria a cargo de una sola proteina de peso molecular igual a 20,000 D (Mason y cols., 1988). Trabajos recientes demuestran que las mutantes de S. viridosporus T7A tambièn exhiben mayores cantidades de peroxidasas y esterasas extracelulares (Ramachandra y cols., 1987). La existencia de esta peroxidasa extracelular, que es inducible por lignocelulosa, representa el hallazgo reciente màs promisorio en este campo, puesto que podría guardar cierta semejanza con las peroxidasas de hongos. Queda aŭn por ver si esta enzima es capaz de romper enlaces caracteristicos de lignina.

El trabajo con subestructuras de lignina ha permitido seleccionar microorganismos con capacidad ligninolítica, facilitado el estudio de mecanismos de biodegradación y la búsqueda de actividades enzimáticas específicas. Generalmente se utilizan compuestos modelo diméricos cuyos residuos se encuentran unidos entre si mediante alguno de los enlaces característicos de la lignina. El empleo de estas estructuras sintéticas permite estudiar en detalle no sólo la ruptura del enlace, sino también otras reacciones relacionadas, tales como desmetoxilaciones, ruptura del anillo aromático y modificación de la cadena

alifàtica. Justamente el uso de dimeros permitiò descubrir la peroxidasa de lignina en *P. chrysosporium* y dilucidar su mecanismo de acciòn (Kirk y Farrell, 1987; Tien, 1987).

Se han realizado algunos estudios con respecto a la capacidad de actinomicetes de degradar compuestos modelo de lignina. La mayor parte de ellos se ha limitado al uso compuestos aromáticos simples, y son escasos los trabajos en que se ha ensayado la acci<mark>ón de las bacterias filamentosas sobre</mark> estructuras dimèricas. Las especies con las cuales se han efectuado dichos estudios incluyen a S. viridosporus T7A, S. setonii, S. albulus 321, S. nigrifaciens, S. verticillatus y S. sioyaensis P5. Tambièn se han publicado algunas investigaciones en esta àrea con cepas de Streptomyces identificadas a nivel de gènero solamente (Sutherland y cols., 1981; Crawford y Olson, 1978). S. setonii, S. nigrifaciens y S. verticillatus son los únicos microorganismos en los cuales se ha estudiado la degradación de algunos àcidos fenilpropanoicos. S. nigrifaciens hidroxila el àcido cumàrico a àcido cafeico, el cual es metabolizado a travès de àcido protocatecuico (Nambudiri y Bhat, 1972). Se encontrò que S. setonii metaboliza los àcidos ferülico. cinâmico y cumárico a compuestos alifáticos a través de las vias clàsicas descritas para bacterias Gram negativas (Sutherland y cols., 1983). Especificamente, el àcido cinàmico es convertido a benzaldehido, el cual es oxidado a àcido benzoico para luego ser convertido a catecol. A su vez, los àcidos cumârico y ferúlico son transformados a p-hidroxibenzaldehido y vanillina, respectivamente, los que son oxidados para ser luego convertidos a àcido protocatecuico por hidroxilación o desmetoxilación. Por su parte, S. verticillatus convierte el àcido cinàmico en cinamamida (Bezanson y cols., 1969).

En todos los demás actinomicetes se ha estudiado exclusivamente la metabolización de àcidos benzoicos. Se ha visto, por ejemplo, que S. albulus 321 degrada los àcidos benzoico, vanillico, y m- y p-hidroxibenzoicos convirtiêndolos a compuestos alifàticos por acción de dioxigenasas específicas (Sutherland y cols., 1981). S. sioyaensis P5 metaboliza los àcidos vanillico y p-hidroxibenzoico del mismo viridosporus T7A cataboliza los àcidos benzoico y m-hidroxibenzoico. Ninguna de estas tres cepas nombradas es capaz de degradar los àcidos veràtrico y m- o p-anísico (Sutherland y cols., 1981). Tambièn se ha demostrado que S. setonii metaboliza fenol (Antai y Crawford, 1983), veratrol (Sutherland, 1986) y àcido vanillico (Pometto y cols., 1981) a catecol. Por otra parte, S. viridosporus T7A oxida vanillina a acido vanillico (Pometto y Crawford, 1983). En esta misma especie se purificò parcialmente una aldehido oxidasa intracelular que oxida benzaldehido, vanillina y veratraldehido, entre otros, a los àcidos correspondientes (Crawford y cols., 1982). Algunos de los àcidos formados son posteriormente degradados, mientras otros se acumulan en el medio de cultivo (Crawford y cols., 1982). Aparentemente esta enzima no està involucrada en la solubilización de lignocelulosa (Deobald y Crawford, 1987).

La acción de estas bacterias filamentosas sobre compuestos modelo de lignina dimèricos sólo ha sido ensayada escasamente. Se ha descrito que S, viridosporus oxida la dehidrodivanillina (que contiene un enlace bifenilo) al àcido correspondiente y aparentemente èste es degradado posteriormente a travès de una vía metabólica desconocida (Crawford y cols., 1981). El otro trabajo publicado en esta materia se refiere a la degradación de un compuesto tipo f-O-4 por esta misma cepa

(Crawford y cols., 1983a). Esta ocurriria en virtud de una f-eterasa, aunque como se indicò màs arriba, estos datos no han podido ser confirmados (Deobald y Crawford, 1987). Recientemente apareciò en la literatura que S. cyaneus degrada un dimero de estructura f-O-4 no fenòlico a travès de una ruptura entre los carbonos alfa y beta, si bien èsta constituye una comunicación preliminar (Zimmermann y cols., 1988).

El objetivo general de este trabajo de tesis es hacer un aporte al conocimiento del papel de las bacterias en la biodegradación de la lignina. Como una aproximación inicial se analizó la versatilidad metabólica de la bacteria filamentosa Streptomyces viridosporus T7A utilizando compuestos modelo de lignina sintéticos de bajo peso molecular, en un intento por encontrar enzimas responsables de la liberación de APPL. Al mismo tiempo, se estudió la acción de cepas bacterianas aisladas de la naturaleza sobre este sustrato soluble, lo que constituye un trabajo inédito a la fecha.

As for Productions.

Percent their on Assessment the Manuscript and Assessment to the State of t

Minimum Constitute and the constitute of the con

BURNING STREET, STORY AND THE BURNING

MATERIALES Y METODOS.

MATERIALES

1.- Material biològico.

1.1.- Cepas microbianas.

Streptomyces viridosporus T7A (Antai y Crawford, 1981): gentileza del Dr. D.L. Crawford, Navarre, Min., E.E.U.U. Pseudomonas putida KT2440 (Franklin y cols., 1981): gentileza del Dr. D. Helinski, La Jolla, Cal., E.E.U.U. Pseudomonas aeruginosa 1161 (Hosoya y Tomikuza, 1984): gentileza del Dr. I.C. Gunsalus, University of Illinois., E.E.U.U. Pseudomonas aeruginosa 2A, Ex y 2Ata: gentileza del Dr. O. Grau, La Plata, Argentina. Pseudomonas fluorescens Biovar I A: y Pseudomonas acidovorans Dz. fueron aisladas en el Laboratorio. Salmonella typhi (pRz): gentileza del Dr. A. Mendoza, Hospital de Infecciosos, Santiago, Chile. Las cepas 14FA, 2CH, 13S y 3A fueron aisladas en fracciones de lignina kraft en el Laboratorio por A. Merino. Ganoderma applanatum: gentileza del Dr. E. Agosin, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

1.2.- Proteinas.

Peroxidasa de lignina de *Phanerochaete chrysosporium* BKM F-1767: gentileza del Dr. T.K. Kirk, Forest Products Laboratory, Madison, Wisconsin, E.E.U.U. Lisozima fue comprada a Boehringer, Mannheim, Alemania. Ovoalbůmina fue adquirida en Sigma Chemical Co., St. Louis, E.E.U.U. Quimotripsinògeno-A fue adquirido a Worthington Biochemical Co., NJ, E.E.U.U.

1.3.- Sustratos biològicos.

La paja de trigo utilizada como fuente de lignocelulosa fue donada gentilmente por el del Dr. G. Pichard, Fac. de Agronomía, Pontificia Universidad Catòlica de Chile, Santiago, Chile. Lignina kraft fue obtenida a partir de licor negro, gentileza de Celulosa Arauco y Constitución, Chile. Galacto-manano (de locust bean gum) se obtuvo de Sigma Chemical Co., St. Louis, E.E.U.U. Xilano (ex larch sawdust pract.) se adquirió en Koch-Light Lab, Coinbrook, Bucks, Inglaterra. Arabino-galactano (reinst, 95 %) se obtuvo de Serva GMBH & Co., Heidelberg, Alemania.

1.4.- Medios de cultivo.

Extracto de levadura se obtuvo de Bethesda Biological Laboratories, Maryland, E.E.U.U. Triptona se adquiriò en LabM, Londres, Inglaterra. Agar malta se obtuvo de Difco Lab., Detroit, E.E.U.U. Agar-agar se adquiriò en MIDESA, Santiago, Chile.

2.- Reactivos.

2.1. Reactivos generales.

De Merck, Darmstadt, Alemania, se adquirieron el tartrato de amonio, dodecilsulfato de sodio, cloroformo, metanol, etanol, dioxano e isopropanol. De Riedel de Haen, Hannover, Alemania, se obtuvieron el èter etilico, N,N'-dimetilformamida, fosfato bàsico de potasio y fosfato dibàsico de potasio. De Sigma Chemical Co., MI, E.E.U.U., se obtuvo 2,2- dimetilsuccinato, àcido nitriloacètico, Trizma base, EDTA y cloruro de litio. De Aldrich Chemical Co., WI, E.E.U.U. se adquiriò paladio y àcido transaconítico. De Arquimed, Santiago, Chile, se obtuvo èter etilico. De Sudelab, Santiago, Chile, se adquiriò eter etilico.

diclorometano. De Distribuidora Cientifica, Santiago, Chile, se obtuvo el cloroformo para el fraccionamiento de la lignina kraft.

2.2. Compuestos aromáticos.

Guaiacol, desoxianisoina, desoxibenzoina, àcido 1,2-difenildo solve a propenoico (x-fenilcinàmico), anisaldehido, benzaldehido, alcohol anisico, aldehido anisico, àcido benzoico, catecol, àcido àcido cinàmico, 2,3-, 2,4-, cafeico, 3,4-2,5-, dihidroxibenzaldehidos, åcidos 2,3-, 2,4-, 2,6-, 3,5dihidroxibenzoicos, 2,2 dimetoxi-2-fenilacetofenona, àcido ferùlico, àcido gentísico, àcido p-hidroxibenzoico, protocatecuico, àcido siringico, àcido 2,3,4- trihidroxibenzoico, alcohol vanillico, vanillina, àcido vanillico, alcohol veratrilico, veratraldehido, àcido veràtrico, 4,4'bifenol y 3,3'dimetoxibifenilo se obtuvieron de Aldrich Chemical Co., WI, E.E.U.U. Acido gàlico y àcido 3-0-metil gàlico fueron obsequiados por el Dr. Kent Kirk de Madison, Wisconsin, E.E.U.U. Aducto de glicina fue sintetizado por R. Vicuña en el laboratorio del Dr. Kent Kirk de Madison, Wisconsin, E.E.U.U. Azul de Remazol (CI 61200, Reactive Blue 19) y siringaldacina provinieron de Sigma Chemical Co., St. Louis, E.E.U.U. De Calbiochem-Behring Corp., CA, E.E.U.U. se obtuvo tiamina-HCl.

2.3. Reactivos utilizados en los anàlisis quimicos.

2.3.1. Reactivos utilizados en el anàlisis de carbohidratos:
Inositol se obtuvo de Matheson, Coleman & Bell, NJ, E.E.U.U.
Galactosa, glucosa y maltosa se obtuvieron de Merck, Darmstadt,
Alemania. Arabinosa, fructosa, manosa, ribosa y xilosa se
obtuvieron de Fluka A.G. Buchs SG, Suiza. Borohidruro de sodio
fue comprado a Aldrich Chemical Co., WI, E.E.U.U. Anhidrido

acètico se adquiriò a Merck, Darmstadt, Alemania.

2.3.2. Reactivos utilizados en la tioacidòlisis: De Merck, Darmstadt, Alemania, se adquiriò etanotiol, trifluoruro de boro-eterato y benzofenona, todos de pureza para sintesis.

2.4. Reactivos usados en experimentos genêticos.

De Bio Rad, CA, E.E.U.U., se obtuvo azul de bromofenol. Acido nalidixico, bromuro de etidio, kanamicina, mitomicina C, novobiocina y tetraciclina fueron obtenidos de Sigma Chemical Co., St.Louis, E.E.U.U. Agarosa para electroforesis fue adquirida a Seakem, Rockland, ME, E.E.U.U.

3.- Material cromatográfico.

Silica gel 60 en polvo y Silica gel 60 F254 en placas de alumnio de 20 \times 20 cm fueron compradas a Merck, Darmstadt, Alemania. Sephadex G-50 fue adquirido a Pharmacia Fine Chemicals, NJ, E.E.U.U.

4.- Miscelàneos.

Pelicula Polaroid tipo 55 (50ASA/18DIN) fue adquirida en Polaroid Corp., MA, E.E.U.U. Pelicula en placa fue adquirida en Agfa Gevaert, Santiago, Chile. Papel filtro Whatman Nº1, fue comprado a Whatman, Inglaterra. Filtros desechables con membranas de 0,45 μ de diàmetro fueron adquiridos a Millipore Corp., MA, E.E.U.U. y a Schleicher y Schüll, Dassel, Alemania.

METODOS.

1.- Manejo de microorganismos.

1.1.- Bacterias no filamentosas.

1.1.1.- Aislamiento y cultivo de cepas.

Se recogieron muestras de madera en descomposición, suelos húmedos, diversos efluentes de plantas de celulosa y de la capa vegetal de bosques nativos como fuente potencial de microorganismos. Estas muestras se cultivaron en un medio minimo salino denominado "Ksal" (Salkinoja-Salonen y cols., 1979) conteniendo un sustrato aromático apropiado como única fuente de carbono. El medio "Ksal", ajustado a pH 6,7, está compuesto por 2,0 g de NH4Cl, 2,1 g de KH2PO4, 3,8 g de K2HPO4x3H2O, 0,3 g de MgSO4x7H2O y 0,1 g de NaCl por litro de solución. Este medio de cultivo fue suplementado con un volumen apropiado de una solución stock 1000 x que contiene 0,6 mg/ml de sulfato fèrrico, 0,2 mg/ml de sulfato de cobre, 0,2 mg/ml de sulfato de manganeso y 0,2 mg/ml de sulfato de cobre, 0,2 mg/ml de sulfato de manganeso y 0,2 mg/ml de sulfato de cobalto (Mateles y cols., 1967).

Mediante traspasos sucesivos en el medio líquido descrito se enriqueció la población en cepas que utilizaron el sustrato escogido en forma más eficiente. El paso siguiente consistió en sembrar el cultivo primario en placas con medio rico Luria 1 x (que contiene 5 g de NaCl, 5 g de extracto de levadura y 10 g de triptona por litro de solución), de modo de obtener colonias aisladas. Con el fin de determinar si las colonias aisladas eran capaces de utilizar el sustrato aromático como única fuente de

carbono, dichos cultivos puros fueron nuevamente inoculados en el medio minimo conteniendo el mismo compuesto en estudio.

Los cultivos fueron incubados a 30°C con agitación y el crecimiento bacteriano se determinó por densidad óptica a 600 nm en un espectrofotòmetro Varian Techtron modelo 635.

1.1.2.- Mantenciòn de cepas.

Las cepas aisladas fueron mantenidas en glicerol 50 % a -20°C o en agar blando a 4°C, lo cual permite que las cepas permanezcan viables durante al menos 6 meses.

1.1.3.- Identificación de cepas.

Las cepas en estudio se identificaron a nivel de gênero luego de someterlas a diversas pruebas. Los criterios fundamentales utilizados para ello fueron : tinción de Gram, motilidad, test de oxidasa, presencia de pigmentos amarillos, capacidad de fermentar la glucosa (oxidativa-fermentativa) y presencia y posición de flagelos. Los flagelos fueron visualizados al microscopio electrônico de transmisión según la têcnica descrita en la sección 8.2. de Materiales y Métodos. La identificación se realizó con la colaboración de Inès Calderón, Lab. de Microbiología de esta Facultad.

1.2.- Bacterias filamentosas.

1.2.1.- Cultivo de Streptomyces viridosporus T7A.

El medio de cultivo empleado (Crawford, 1978) consistió en una solución tamponante salina que contenía 0,02 % de NaCl, 0,1 % de KH2PO4 y 0,4 % de K2HPO4x7H2O), suplementada con CaCl2x2H2O 0,005 % y MgSO4x7H2O 0,02 % y un porcentaje

variable de extracto de levadura, según los requerimientos del experimento.

Los cultivos líquidos de *S. viridosporus* T7A fueron incubados a 37°C con agitación rotatoria. La medición del crecimiento del microorganismo se dificulta por la formación de micelios, por lo cual no se determinó crecimiento en forma rutinaria. En algunos experimentos se cuantificó el crecimiento mediante determinación de peso seco, filtrando el cultivo a través de membranas de 0,45 µ de diàmetro o de filtros de fibra de vidrio 6/F prepesados. El uso de filtros de fibra de vidrio resultó ser más conveniente, puesto que son de más fácil manejo. Las membranas con micelio se secaron en estufa a 80°C hasta peso constante.

1.2.2.- Mantención de la cepa.

El cultivo de *S. viridosporus* se mantuvo en agares extendidos de medio de cultivo Luria 1 x. Se sembraron en superficie y se incubaron los cultivos a 37°C hasta formación abundante de esporas de color blanco o verdoso (48-72 hrs). Los cultivos se traspasaron cada 2 a 4 semanas y se guardaron a 4°C.

1.2.3.- Preparación de inóculos.

Se agregò agua previamente esterilizada a tubos con cultivos del actinomicete sobre agar extendido y se raspò suavemente la superficie del cultivo con un asa, de modo de desprender las esporas. Se utilizaron tres modalidades de inòculo:

a) Se adicionò directamente un volumen medido de la suspensiòn (D.O.600 nm=0,3) de esporas en agua correspondiente a un dècimo del volumen final del medio de cultivo que contiene el

sustrato aromàtico y un determinado porcentaje de extracto de levadura (0,1-0,3 %).

- b) Se incubò un volumen de la suspensión de esporas con 9 volúmenes del medio de cultivo conteniendo 0,3 % de extracto de levadura a 37°C con agitación durante 24-48 hrs hasta formación abundante de micelio. Se adicionaron 0,1 ml de la suspensión de micelios sobre 10 ml del medio de cultivo descrito conteniendo también 0,3 % de extracto de levadura y el sustrato aromàtico elegido.
- c) En cultivos sobre lignocelulosa, 0,1 ml del inòculo de micelios se transfirieron sobre 100 mg de lignocelulosa previamente esterilizada y se incubò sobre este sustrato sòlido durante 96 hrs a 37°C en forma estacionaria. Al tèrmino de esta preincubación se agregaron 10 ml de medio de cultivo, suplementado con 0,3 % de extracto de levadura y el sustrato a ensayar. Luego se continuò la incubación con agitación a 37°C por el tiempo deseado.

1.3.- Basidiomicetes.

1.3.1. - Cultivo de Ganoderma applanatum.

Se observò que cultivos puros de *G. applanatum* se desarrollan bien en un medio liquido agitado a unas 200 rpm durante alrededor de 8 dias y mantenido entre 25 y 30°C (S. Rios, comunicación personal). El medio de cultivo utilizado está basado en el medio descrito para *P. chrysosporium* (Kirk y cols., 1978) y contenia el tampón 2,2 dimetilsuccinato 10 mM, pH 4,5, KH₂PO₄ 1,47 mM, MgSO₄×7H₂O 2,03 mM, CaCl₂×2H₂O 1,0 mM, suplementado con 1,0 ml de una solución de minerales y 0,5 ml de una solución de vitaminas por litro de cultivo. Se adicionaron también glucosa

al 1,0 % y alguna fuente de nitrògeno (aminoàcidos o tartrato de amonio) a una concentración final 3 mM de nitrògeno. La mezcla de minerales contenía 15 g de àcido nitriloacètico, 30 g de MgSO4x7H2O, 5 g de MnSO4x7H2O, 10 g de NaCl, 1,0 g de FeSO4x7H2O, 1 g de CoSO4, 1,0 g de CaCl2, 1,0 g de ZnSO4x7H2O, 0,1 g de CuSO4, de AlK(SO4)2x12H2O, de H3BO3 y de NaMoO4x2H2O por litro de solución. La mezcla suplementaria de vitaminas contenía 2,0 mg de biotina, 2,0 mg de àcido fólico, 5,0 mg de tiamina-HCl, 5,0 mg de riboflavina, 10 mg de piridoxina-HCl, 0,1 mg de cianocobalamina, 5,0 mg de àcido nicotínico, 5,0 mg de pantotenato de calcio y 5,0 mg de àcido p-aminobenzoico por litro de solución.

1.3.2.- Mantención de la cepa.

2. - Promite Sci Dy ster additional

- $G.\ applanatum$ fue mantenido en placas de Petri con agar malta (15 g/l) a 4°C, condición en la cual se mantuvo viable durante al menos varias semanas.
- 1.3.3.- Preparación de inóculos de *G. applanatum*.

Se prepararon inòculos raspando la superficie de la placa con un asa estèril, de modo de arrastrar los micelios. Esta manipulación resultò más eficiente al sacar los micelios con una capa muy delgada de agar. Los micelios crecidos en una placa fueron transferidos a tubos estèriles que contenían 10 ml de agua destilada y bolitas de vidrio. Se agitaron los tubos exhaustivamente en vortex hasta observar la formación de una suspensión homogènea turbia de micelios fragmentados. Los cultivos se inocularon con alicuotas de 1,5 ml de esta suspensión recièn preparada por cada 125 ml de medio.

2.- Preparación de sustratos.

2.1.- Sustratos preparados por sintesis quimica.

Las estructuras de todos los compuestos modelo utilizados en este estudio se muestran en la Figura 2. La sintesis del aducto de glicina (XVI) se realizò según mètodo previamente descrito (Tien y cols., 1987). Los compuestos dimèricos con estructura del tipo 1,2 diarilpropano (\$\beta\$-1) 1,2-bis (4-metoxifenil)-3-hidroxipropanona o hidroximetil desoxianisoina (HMDA, XXI) y 1,2-bis (4-metoxifenil) -propano-1,3-diol (HMRDA, XXVIII) fueron sintetizados según el protocolo descrito (Kirk y Nakatsubo, 1983).

Los compuestos modelo con estructura de tipo arilglicerol -\(\theta\)-aril\(\theta\)ter (\(\theta\)-0-4) fueron sintetizados de acuerdo al m\(\theta\)todo de Landucci (Landucci y cols., 1981) y Adler (Adler y cols., 1952). El compuesto XXXII es un intermediario de la sintesis de los compuestos de estructura \(\theta\)-0-4. La sintesis de estos compuestos modelo fue realizada en el laboratorio de Qu\(\text{imica}\) Org\(\theta\)nica de la Facultad de Qu\(\text{imica}\) de esta Universidad a iniciativa de nuestro grupo de investigaci\(\theta\)n, representando \(\theta\)sta la primera experiencia en nuestro pa\(\text{is}\) en la s\(\text{intesis}\) de este tipo de estructuras.

Se prepararon también derivados reducidos de siete compuestos modelo, mediante los procedimientos que se resumen a continuación:

Mediante reducción con NaBH4 a temperatura ambiente en tetrahidrofurano con 10 % de etanol se obtuvieron hidrobenzolna (XXIV), desoxihidroxibenzolna (XXV), hidroanisolna (XXVI) y desoxihidroxianisolna (XXVII), a partir de benzolna (XVII), desoxibenzolna (XVIII), anisolna (XIX) y desoxianisolna (XX),

CRXIAA III

Figura 2: Estructuras moleculares de compuestos modelo de lignina utilizados. Los nombres correspondientes se encuentran a lo largo del texto.

respectivamente. Por otra parte, el àcido 2,3 difenilpropanoico (XXIX) se obtuvo por hidrogenación catalítica con Pd bajo presión del àcido α -fenilcinàmico (2,3 difenilpropenoico, XXXVII) (Gonzàlez, 1988).

Los compuestos 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)- 2-(4-metoxi fenoxi)-propano-1,3-diol, (XXXIII) y el 1-(3,4-dimetoxifenil)-2-(4-metoxifenoxi)-propano-1,3-diol (XXXIV) fueron sintetizados mediante reducción con NaBH4 a partir de los dimeros oxidados correspondientes: 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-2-(4-metoxifenoxi)-3-hidroxipropanona (XXX) y la 1-(3,4-dimetoxifenil)-2-(4-metoxifenoxi)-3-hidroxipropanona (XXXI). Estos compuestos son denominados comúnmente guaiacilglicerol-\$\textit{\rho}\$- guaiacil\textit{\rho}\$ter o GGGE (XXXIII) y veratrilglicerol-\$\textit{\rho}\$- guaiacil\textit{\rho}\$ter o VGGE (XXXIV). Asimismo, sus an\textit{\rho}\$logos oxidados se designan con la abreviatura GGGEox (XXX) y VGGEox (XXXI), respectivamente.

Debido a su escasa solubilidad en agua, se prepararon soluciones stock de los compuestos modelo dimèricos en dimetilformamida, a razòn de 400 mg/ml. En general, estos compuestos fueron utilizados como sustrato a una concentración final de 1 mg/ml, obtenida por dilución directa de una alícuota de la solución orgânica en el medio de cultivo previamente esterilizado. Las soluciones stock fueron mantenidas a -20°C.

Se prepararon habitualmente soluciones stock de los compuestos monomèricos en el medio Ksal (50 mM), adicionando NaOH 1 N gota a gota hasta neutralizar y solubilizar totalmente estos sustratos. En general se diluyeron a una concentración final de 5 mM, salvo indicación contraria. Las soluciones stock fueron esterilizadas por filtración y guardadas a 4°C.

2.2. Sustratos preparados por extracción y purificación.

2.2.1.- Lignocelulosa de paja de trigo.

La paja de trigo cortada en trozos de 0,25-2,0 mm fue sometida al siguiente proceso de extracción (Crawford y Crawford, 1976) en un aparato Soxhlet con el fin de eliminar componentes solubles de bajo peso molecular: i) dos extracciones con tolueno-etanol 1:1, por 4 hrs; ii) lavado con etanol puro hasta obtención de solvente reflujado incoloro; iii) extracción con agua hasta obtención de líquido incoloro. La lignocelulosa obtenida fue secada a 50°C y homogeneizada ligeramente en un mortero.

2.2.2.- Fraccionamiento de lignina kraft.

El licor negro, fuente de la lignina kraft utilizada en esta tesis, fue acidificado con el fin de precipitar los oligómeros derivados de la lignina. Para ello, 150 ml de licor negro se diluyeron con 300 ml de agua, se agregaron 32 ml de cloroformo (Whalen, 1975) y se acidificò a pH 1,0-1,5 con àcido clorhidrico bajo agitación constante. Luego se filtrò a través de papel Whatman 1 y se secò el residuo sòlido a 50°C. El rendimiento promedio fue de aproximadamente 20 g de lignina kraft.

El sòlido obtenido fue fraccionado según el protocolo descrito para la purificación de este sustrato (Lundquist y Kirk, 1980). Dicho procedimiento consiste en una serie de extracciones que se detallan a continuación. Se disolvieron 10 g de sòlido en 60 ml de agua, 135 ml piridina y 15 ml àcido acètico, se transfirió la solución a un embudo de decantación y se extrajo con 270 ml de cloroformo. La fase orgânica resultante se extrajo

a su vez con una "fase acuosa" previamente saturada (preparada mezclando nuevamente 60 ml de agua destilada, 270 ml de cloroformo, 135 ml de piridina y 15 ml de àcido acètico). Se descartò la fase acuosa y se evaporò la fase orgànica hasta reducir el volumen a unos 100 ml. Luego se agregò 1,0 litro de èter etilico a la fase orgànica concentrada, se homogeneizò bien y se filtrò a travès de papel Whatman 1, recogièndose la fracción soluble en èter (FSE) en el filtrado y la fracción insoluble en èter (FSE) como residuo sòlido en el filtro. La FSE se evaporò hasta obtener un residuo semisòlido y la FIE se secò totalmente, obtenièndose un polvo oscuro luego de homogeneizar en un mortero.

Se prepararon soluciones stock (25 mg/ml) de ambas fracciones. Con este fin se disolvieron en NaOH (0,25 N y 0,1 N para la FSE y la FIE, respectivamente). Luego de diluir con un poco de agua, se agregò $H \approx PO = 4$ gota a gota bajo una agitación vigorosa hasta pH 11,3 en el caso de la FSE y pH 9,0 para la FIE y se ajustò al volumen deseado. Las soluciones stock se filtraron a travès de papel Whatman 1 y luego se esterilizaron por filtración a travès de membranas de 0,45 μ de diàmetro de poro. En la mayoría de los ensayos las FSE y FIE fueron utilizadas a una concentración final de 2,5 mg/ml.

Las soluciones stock obtenidas se mantuvieron a 4°C y fueron estables durante al menos 6 meses.

2.3.- Sustratos preparados biològicamente.

2.3.1.- Obtención de APPL en medio líquido.

Los APPL en medio liquido se prepararon a partir de cultivos de *S. viridosporus* T7A sobre lignocelulosa en la forma descrita en la sección 1.2.3.c de Mètodos, omitiendo la adición

de un sustrato aromàticó exògeno.

2.3.2.-Cuantificación de APPL en medio líquido.

En aquellos experimentos en que se incubò *S. viridosporus* T7A en presencia de lignocelulosa y de algún compuesto modelo, se determinò ademàs la cantidad de APPL formados. Para ello se sacaron alícuotas de 2 ml del medio de incubación, se filtraron a travès de papel Whatman 1, se acidificaron muestras de 1 ml de filtrado con 20 µl de H₂SO₄ 12 M, se dejaron reposar durante 3 hrs y se determinò su absorbancia a 600 nm, homogeneizando previamente en vortex (Crawford y cols., 1983).

2.3.3. - Obtención de APPL en medio sòlido.

Se prepararon AFFL a partir de lignocelulosa purificada de paja de trigo según està descrito (Crawford y cols., 1983). Las botellas de 500 ml con 2,5 g de lignocelulosa cada una, las cuales fueron colocadas destapadas en autoclave a 120°C durante una hora para disgregar algunas estructuras làbiles con el fin de facilitar la penetración posterior de las hifas de la bacteria filamentosa al sustrato y luego esterilizadas nuevamente en autoclave (tapadas). La lignocelulosa húmeda y estèril de cada botella fue inoculada con 25 ml de cultivo de S. viridosporus T7A incubado previamente durante 48 hrs, como està descrito en la sección 1.2.3. En seguida se hizo rodar cuidadosamente cada botella en el mesón, con el fin de repartir homogèneamente la preparación de lignocelulosa y de micelios en la mayor superficie posible. Finalmente se incubaron las botellas en un baño húmedo a 37°C durante 2-6 semanas o el tiempo indicado en el experimento.

2.3.4. - Cosecha de APPL.

Una vez completado el periodo de incubación en medio sólido, se agregaron a cada botella 125 ml de agua destilada, se esterilizaron al autoclave a 100°C y 0,5 psi y se filtró a través de papel Whatman 1 prepesado. En algunas preparaciones se determinó la pérdida de peso seco de la lignocelulosa luego de secar el residuo a temperatura ambiente. Los APPL se encuentran en el filtrado, el cual fue dializado exhaustivamente contra agua destilada (3 días a 4°C) y luego liofilizado a sequedad. El rendimiento promedio fue de un 5 % aproximadamente del peso de material lignocelulósico inicial.

2.3.5. - Esterilización de APPL.

Se prepararon soluciones stock de APPL (5 ò 10 mg/ml en agua) para aquellos ensayos en que los APPL constituían el sustrato. Para ello se disolvió la cantidad determinada de APPL en agua, se filtrò a travès de papel Whatman 1, luego (con vacio) a travès de membranas de 0,45 µ de diâmetro de poro y finalmente se esterilizaron a travès de filtros desechables con membranas de igual tamaño de poro. Este complejo procedimiento de esterilización fue inevitable, puesto que los APPL precipitan al ser autoclavados aún a sòlo 100°C por 30 minutos; por otra parte, al utilizar directamente filtros desechables despuès de filtrar a travès del papel Whatman, los poros de las membranas se taparon inmediatamente y no se logrò una buena esterilización.

3.- Anàlisis de productos metabòlicos de bajo peso molecular.

3.1. - Anàlisis espectrofotomètrico.

Las alicuotas retiradas de los medios de cultivo fueron diluídas a una absorbancia apropiada y luego se determinò su espectro de absorción entre 200 y 400 nm en un espectrofotòmetro Shimadzu UV-visible conectado al registrador Shimadzu Graphic Printer PR-1 (Shimadzu Corp., Kyoto, Japòn). En algunos casos, las muestras extraídas y secadas fueron resuspendidas en 1 ml de agua destilada y analizadas en el espectrofotòmetro. Se hicieron registros de los espectros tanto en medio neutro como en medio alcalino (espectro de ionización), es decir, inmediatamente después de agregar una gota de hidròxido de sodio i N a la cubeta de lectura (Kirk y Adler, 1970).

3.2. - Cromatografia en capa fina (TLC).

El anàlisis de las muestras mediante TLC y HPLC se realizò retirando alicuotas de 1 ml de los medios de cultivo, las cuales fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 5 min en una centrifuga Beckman para tubos Eppendorff. Los sobrenadantes obtenidos fueron acidificados a pH 1,0-2,0 con àcido clorhidrico concentrado, extraidos dos veces con un volumen de èter etilico y finalmente la fase orgânica se evaporò a sequedad. Los extractos etèreos fueron resuspendidos en 20 µl de èter etilico y aplicados sobre placas de silicagel de 4x4 cm (Silica Gel 60F-254, Merck, Darmstadt).

Este protocolo no pudo ser aplicado cuando se sabía o se sospechaba de la presencia de sustratos volátiles, tales como veratraldehido, alcohol anísico, guaiacol y p-anisaldehido. Con el fin de evitar la evaporación del compuesto aromático junto al solvente, se extrajeron alicuotas de 0,1 ml de sobrenadante acidificado con un volumen de èter y se aplicó directamente la fase orgânica a las placas de silicagel. En algunas ocasiones este procedimiento rápido fue utilizado también con sustratos no volátiles.

Las muestras fueron separadas en diferentes sistemas de solventes, a saber: los compuestos modelo dimèricos con enlaces \$-0-4 fueron analizados mediante un sistema de cloroformo: isopropanol: amoníaco (12:2:1). Se empleò la mezcla benceno: àcido acètico (2:1) para separar los àcidos gàlico, 3-0-metilgàlico, siringico y protocatecuico entre sí. Los àcidos ferúlico y cinàmico fueron separados en cloroformo: acetona (20:7), el aducto de glicina y guaiacol en cloroformo: acetona (40:1) y todos los demàs compuestos en cloroformo: acetona (9:1) (Ver Tabla 1).

Los compuestos aromàticos fueron visualizados mediante luz ultravioleta de onda corta. Se tomaron fotografías de placas utilizando una película Polaroid 55 positivo/negativo de 50 Asa/18 Din.

3.3.- Cromatografia liquida de alta presión (HPLC).

La preparación de extractos etéreos fue idéntica a la descrita en la sección 3.2. de Materiales y Métodos. Estos extractos etéreos previamente secados fueron resuspendidos en agua destilada e inyectados en un sistema de cromatografía de

Tabla 1.

res de Rf encontrados para los compuestos modelo de lignina analizados por cromatografía de capa fina en silica qel.

Nº Fig.	.2 Compuesto	Rf	solvente	
VII	àcido veràtrico	0,13	cloroformo: acetona	9:1
	veratraldehido	0,66	cloroformo:acetona	9:1
	alcohol veratrilico	0,27	cloroformo: acetona	9:1
٧	acido p-antsico	0,14	cloroformo: acetona	9:1
	p-anisaldehido	0,79	cloroformo:acetona	9:1
	alcohol p-anisico	0,41	cloroformo: acetona	9:1
	àcido o-anisico	0,21	cloroformo:acetona	9:1
	o-anisaldehido	0,74	cloroformo:acetona	7:1
	àcido m-anisico	0,16	cloroformo:acetona	9:1
	m-anisaldehido	0,68	cloroformo:acetona	9:1
IV	àcido protocatecuico	0,41	benceno: acètico	2:1
IX	àcido gàlico	0,22	benceno:àc. acètico	2:1
XI	acido siringico	0,74	benceno: àc. acètico	2:1
X	àcido 3-0-metil gâlico	0,53	benceno:àc. acêtico	2:1
XIA	àcido cafeico	0,56	benceno:àc. acètico	2:1
XIII	àcido cumárico	0,84	benceno:àc. acètico	2:1
ΧV	àcido feràlico	0,58	cloroformo:acetona	20:7
XII	àcido cinàmico	0,44	cloroformo:acetona	20:7
II	guaiacol	0,62	cloroformo:acetona	40:1
XVI	aducto de glicina	0,93	cloroformo:acetona	40:1
XIX	anisolna	0,68	cloroformo:acetona	9:1
XXVI	hidroanisolna	0,31	cloroformo:acetona	9:1
XX	desoxianisolna	0,78	cloroformo:acetona	9:1
XXVII	desoxihidroxianisolna	0,58	cloroformo:acetona	9:1
XVII	benzolna	0,70	cloroformo:acetona	9:1
XXIV	hidrobenzolna	0,31	cloroformo:acetona	9:1
XXIII	dimetoxibencilo	0,68	cloroformo:acetona	9:1
XXVIII	desoxibenzoina	0,84	cloroformo:acetona	9:1
XXV	desoxihidroxibenzoina	0,69	cloroformo:acetona	9:1
XXI	hidroximetildesoxianisolna	, ,	cloroformo:acetona	9:1
XXVIII		0,20	cloroformo:acetona	9:1
XXXV	4,4'-bifenol	0,86	cloroformo:acetona	9:1
XXXVI	3,3'-dimetoxibifenilo	0,91	cloroformo:acetona	9:1
XXXVII	∝-fenilcinâmico	0,26	cloroformo:acetona	9:1
XXIX	α-femilcimamico reducido	0,26	cloroformo:acetona	9:1
XXXII	"trimero"	0,90	cloroformo:acetona	9:1
XXX	666Eox	0,67	clor.:isopr.:amon.	13:1:1
XXXI	V66Eox	0,53	clor.:isopr.:amon.	13:1:1
XXXIII		0,60	clor.:isopr.:amon.	13:1:1
XXXIV	V66E	0,50	clor.:isopr.:amon.	13:1:1

alta presión con gradiente (System 41 Gradient Analytical HPLC, Gilson, Middleton, Wis.) conectado a un detector HM/HPLC y un integrador 3380A, de Hewlett-Packard (Palo Alto, Cal.). Se utilizó una columna Ultrasphere ODS Cie de fase reversa de Vydac (Hesperia, Cal.). Las muestras inyectadas fueron separadas mediante una gradiente de metanol/agua. La concentración de metanol fue de 20 % durante los primeros 5 min, luego fue aumentada gradualmente de 20 a 40 % en el transcurso de 5-14 min y se mantuvo en 40 % hasta los 32 min; luego se disminuyó a 20 % en el minuto siguiente, permaneciendo estacionaria en 20 % entre los 33 y 45 min.

3.4.- Resonancia Magnètica Nuclear (NMR).

Los anàlisis mediante resonancia magnètica nuclear se realizaron en un aparato Bruker Spectrospin del Forest Products Laboratory, Madison, Wis. Se utilizò cloroformo deuterado como solvente, tanto para los espectros con 13C como para los de 1H. El espectro de 13C fue realizado a 62,89 MHz y a 303°K. El anàlisis con 1H fue hecho a 250,13 MHz y 303°K.

3.5.- Espectrometria de Masas (M.S.).

Para el anàlisis por espectrometría de masas del compuesto purificado producido por *S. viridosporus* T7A se utilizò el espectròmetro Finnigan MAT 4510 (Finnigan, San Josè, Calif.) del Forest Products Lab., Madison, Wisconsin.

3.6.- Espectros Infra-rojo (I.R.).

Los espectros de I.R. se hicieron en un espectrofotòmetro Perkin Elmer 1310 de la Facultad de Ciencias Químicas de la P. Universidad Catòlica de Chile. Las muestras sòlidas fueron preparadas en pastillas de KBr.

4.- Anàlisis químicos de productos metabólicos de alto peso molecular.

4.1. - Determinación de hidratos de carbono en muestras de APPL.

Se realizò un anàlisis cuali y cuantitativo de los hidratos de carbono presentes en la lignocelulosa de paja de trigo y en los APPL derivados de ella según un mètodo recomendado para madera y pulpa de madera (Ver ref. anònima "Provisional method...", 1975). En este mètodo se determina el contenido de glucosa (glucanos), manosa (mananos), arabinosa (arabinanos), xilosa (xilanos) y galactosa (galactanos), los cinco monosacàridos principales que definen la composición de carbohidratos de la madera. Se introdujeron algunas modificaciones y el mètodo fue adaptado para cantidades mucho menores de muestra. El procedimiento utilizado consta de las etapas descritas a continuación.

4.1.1.- Preparación de muestras y calibración.

Las muestras de lignocelulosa fueron cernidas a travès de un cedazo de 60 mesh. Las muestras de APPL incubadas con bacterias fueron centrifugadas al têrmino del periodo de

incubación y alícuotas de 20 ml (50 mg) de los sobrenadantes liofilizadas a sequedad.

Con el fin de calibrar el mètodo se prepararon dos mezclas de los cinco monosacàridos estàndares que fueron procesadas en forma idèntica a las muestras. Se escogieron dos de las mezclas sugeridas en el mètodo de referencia. La mezcla "1" contenía 135,0 mg de glucosa, 8,75 mg de xilosa, 4,5 mg de manosa, 0,88 mg de arabinosa y 0,5 mg de galactosa. La mezcla "2" contenía 107,5 mg de glucosa, 18,0 mg de xilosa, 16,0 mg de manosa, 5,75 mg de arabinosa y 2,25 mg de galactosa.

4.1.2.- Preparación de acetatos de alditoles.

La preparación de los acetatos de alditoles constó de las siguientes cinco etapas:

a.- Hidròlisis.

Se colocaron 45 mg de cada muestra en un tubo cònico de vidrio, se agregaron 0,75 ml de H2SO4 al 72 %, se homogeneizò con una pipeta Pasteur sellada y se incubò durante 1 hr en un baño a 30°C agitando ocasionalmente. Al tèrmino de la incubación, las muestras fueron transferidas cuantitativamente a un vaso precipitado de vidrio de 100 ò 250 ml lavando con 21 ml de agua destilada y se calentaron al autoclave a 19 psi y 120°C durante 30 min.

b.- Neutralizaciòn.

Las muestras fueron enfriadas a temperatura ambiente, se les agregò 2,5 ml de una solución estàndar de inositol 1 % y lentamente se les adicionò 1,05 g de CaCOs (1,4 g de CaCOs por cada ml de H2SO4 agregado inicialmente). El CaCOs fue

sedimentado por centrifugación a 8000 rpm en el rotor JA-20, Beckman, durante 5 minutos, el sobrenadante filtrado a través de papel Whatman 1 y colectado en un matraz aforado de 50 ml. El sedimento fue lavado varias veces con agua destilada, recogiéndose el sobrenadante filtrado en el matraz hasta aforar.

c.- Reducción.

El filtrado se vertió en un balón, se agregaron 80 mg de NaBH4 agitàndose ligeramente y se dejó durante 1,5 a 2 hrs bajo campana a temperatura ambiente con agitación ocasional. Luego se agregó àcido acètico glacial gota a gota hasta que cesara la evolución de gas y el líquido se volviera transparente. La mezcla fue evaporada en un rotavapor Büchi KRV 65/45 a una temperatura del baño no superior a 40°C hasta dejar un residuo de unos 5 ml. Enseguida se agregaron 10 ml de metanol y se evaporó la mezcla. Se adicionó metanol nuevamente y se evaporó a sequedad. Finalmente se secó durante 15 minutos en estufa a 105°C.

Es indispensable completar el protocolo hasta esta etapa en forma continuada, puesto que los compuestos reducidos formados son inestables en solución.

d.- Acetilación.

El producto de la reducción fue acetilado agregando 7,5 ml de anhidrido acètico y 0,5 ml de àcido sulfúrico concentrado bajo campana. La mezcla fue incubada en un baño a 55°C durante 1 h agitando suavemente hasta disolver completamente el residuo adherido a las paredes del balón. Al término de la incubación el balón fue enfriado a temperatura ambiente y su contenido transferido lentamente a un vaso precipitado con 30 ml de agua destilada y 40 g de hielo. La mezcla obtenida fue

extraida sucesivamente con 25, 15 y 10 ml de diclorometano en un embudo de decantación. Se colectaron las tres fases orgânicas obtenidas en un balón y se evaporó casi a sequedad en el rotavapor manteniendo el baño a 65°C. Se agregaron 2 ml de agua y se evaporó a sequedad. El residuo fue resuspendido cuantitativamente en 1 ml de diclorometano.

4.1.3.- Anàlisis por cromatografía de fase gaseosa.

Se analizaron las muestras en un cromatógrafo Tracor 560 acondicionado con una columna de vidrio de 10 pies de longitud con un soporte de chromosorb WHP recubierto de cianosilicona (SP2330 al 3 %). Se utilizó un detector de ionización de llama acoplado a un integrador Hewlett-Fackard 3390A. La temperatura del inyector y del detector fue de 190°C, en tanto que la columna se mantuvo a 250°C (isotèrmica). Se utilizó nitrógeno como gas de arrastre y se inyectaron volúmenes de 1 µl de las diversas muestras. En estas condiciones el orden de elución de los monosacàridos fue el siguiente : arabinosa, xilosa, manosa, galactosa, glucosa e inositol, con tiempos de retención de 19,7; 28,9; 47,0; 53,6; 65,4 y 84,0 min, respectivamente. Estos anàlisis fueron realizados por el Lab. de Servicios Externos de la Fac. de Guímica de esta Universidad.

4.2.- Tioacidòlisis.

La tioacidòlisis de las muestras de lignocelulosa de trigo y de AFFL fue realizada esencialmente según el siguiente protocolo desarrollado por Lapierre (Lapierre y cols., 1985).

4.2.1.- Preparación de muestras.

Las muestras sòlidas de lignocelulosa y de APPL fueron preparadas en forma idèntica a las muestras utilizadas para el anàlisis de hidratos de carbono (Materiales y Mètodos, sección 4.1.1.).

4.2.2.- Preparación de tioacidolizados.

Se colocaron 3-11 mg de una muestra de lignocelulosa, de APPL o 10 mg de un compuesto modelo estàndar en un tubo pyrex con tapa rosca sellada con un disco de teflòn. Las muestras fueron secadas sobre sulfato de magnesio anhidro durante 15 horas a temperatura ambiente. Bajo flujo de nitrògeno se agregaron a cada muestra 9 ml de dioxano recièn destilado y deshidratado sobre una mezcla de Na-benzofenona. Enseguida, bajo campana y flujo de nitrògeno se adicionaron 1,0 ml de etanotiol y 0,3 ml de BFs-eterato a cada muestra. Antes de sellar, en cada tubo se colocò un pequeño agitador magnètico y se burbujeò nitrògeno durante 1-2 minutos. Despuès fueron colocados en un baño de aceite a 100°C durante 4 hr con agitación magnètica permanente y homogeneización por inversión cada 15 minutos. Al tèrmino de la incubación la mezcla fue enfriada en agua con hielo y ajustada a pH 3-4 con NaHCO₃, previa adiciòn de 10 ml de agua destilada. La mezcla fue extraîda con 30 ml de diclorometano y la fase orgânica fue deshidratada sobre Na₂SO₄. Posteriormente fue filtrada a travès de papel Whatman 1 y concentrada pràcticamente a sequedad en un rotavapor Büchi manteniendo la temperatura del baño entre 45 y 50°C. El residuo fue resuspendido cuantitativamente en 1,3 ml de diclorometano.

4.2.3.- Anàlisis mediante cromatografía de fase gaseosa de monòmeros tioacidolizados.

El anàlisis de las muestras se realizò según està descrito (Lapierre y Monties, 1986) en el propio laboratorio de C. Lapierre, Thiverval-Grignon, Francia.

4.3.- Determinación de azúcares totales y reductores en celulosas y hemicelulosas.

4.3.1.- Determinación de azócares totales.

Fara la determinación de azúcares totales en muestras de celulosas y hemicelulosas se utilizò el mètodo del orcinol (Rimington, 1940). El reactivo requerido para este anàlisis fue àcido sulfùrico 70 % p/v al cual se adicionò 0,1 % de orcinol. La solución transparente obtenida se guardó a 4°C en botella àmbar. Brevemente, el protocolo seguido fue el siguiente: Se pusieron los tubos de ensayo en agua con hielo y a cada tubo se agregaron lentamente 5 ml del reactivo sobre 2 ml de la muestra diluida en forma apropiada. Despuès de agitar los tubos en vortex colocaron en un baño a 100°C durante exactamente 20 min. Luego se enfriaron, se agitaron nuevamente y se determinò su densidad òptica a 425 nm en un espectrofotòmetro Spectronic 20. Para cuantificar el contenido de azúcares, se incluyo un blanco con agua destilada y se hizo una curva de calibración con glucosa en el rango de 0,5-20,0 mg/ml de solución. Todas las determinaciones se hicieron en duplicado.

4.3.2. - Determinación de azúcares reductores.

La determinación de azúcares reductores se realizó según el mètodo de Somogyi-Nelson que se basa en la capacidad del

azůcar para reducir el iòn cùprico a cuproso formando un complejo de arsenomolibdato coloreado (Nelson, 1944). El anàlisis requiriò de cuatro soluciones, a saber: Soluciòn A, que contenía 25 g de Na2CO3, 25 g de tartrato de Na-K, 20 g de NaHCO3 y 200 g de Na2SO4 por litro de soluciòn. La solución B constò de CuSO4x5H2O al 15 % acidificado con 1-2 gotas de H2SO4 concentrado por cada 100 ml de solución. La solución C se preparò al momento de usar mezclando 25 ml de solución A con 1 ml de solución B. La solución D se obtuvo disolviendo 25 g de heptamolibdato en 450 ml de agua destilada y agregando despuès 25 ml de H2SO4 concentrado. Finalmente se agregaron 3 g de Na2HASO4x7H2O en 25 ml de agua destilada y se aforò a 500 ml. Las soluciones B y D se guardaron a 4°C en botellas àmbar y la solución A filtrada se mantuvo a 37°C.

La medición se realizó mezclando 1 ml de las muestras con 1 ml de la solución C y luego calentando a 100°C durante 30 min. Al término de esta etapa, se enfriaron los tubos en agua con hielo y se adicionó 1 ml de solución D a cada muestra. Posteriormente estos se agitaron en vortex, se esperó 10 min, se diluyeron las muestras con 9,5 ml de agua destilada y se determinó su absorbancia a 520 nm en un espectrofotómetro Spectronic 20. Todos los experimentos con celulosas y hemicelulosas se realizaron en el Lab. de Biotecnología del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos de la U. de Chile.

4.4.- Determinación de nitrógeno.

La determinación de nitrógeno de muestras de las fracciones FSE y FIE de lignina kraft y de lignocelulosa de paja

de trigo y de APPL derivados de èsta se realizò según el mètodo de Kjehldal mejorado (Ver ref. anònima "Methods of ...", 1980). Esta modificación del mètodo original permite la determinación de nitratos, incluyendo la cuantificación de nitrògeno proteico, aminas y amidas del sistema tradicional.

El anàlisis se llevò a cabo en un sistema semiautomatizado formado por una unidad de digestión Büchi 425 y una unidad de destilación y titulación Büchi 315 del Lab. de Ingenierla Bioquímica de la Fac. de Ingenierla, U. de Chile.

5.- Anàlisis cromatogràfico y espectroscòpico de materiales de alto peso molecular.

5.1.- Filtración en gel.

Con el objeto de determinar la distribución de pesos moleculares de muestras de APPL y de las fracciones FSE y FIE de lignina kraft, se montó una columna de Sephadex G-50 medium. Sus dimensiones fueron de 69 cm x 1,1 cm², con un volumen aproximado de 90 ml. La columna se equilibró en una solución de LiCl 0,1 N y NaOH 0,1 N, se ajustó el flujo a aproximadamente 9 ml/h y se colectaron 80-100 fracciones de 1 ml (20 gotas). El uso de LiCl elimina sustancialmente las interacciones entre los residuos aromàticos de la lignina y la resina (Lundquist y Kirk, 1980). El volumen de elución de las muestras se determinó por absorbancia a 280 nm. En la columna se cargaron entre 1,5 a 5 mg de muestra disueltas en 0,6 a 1,0 ml de agua o medio de cultivo previamente alcalinizados con 0,5 ml de la fase mòvil.

El volumen de exclusión fue determinado con azul dextrano y el de inclusión con àcido cumárico. Se calibró la columna

determinando la migración de proteínas globulares disueltas en una solución 1 M de NaCl. Se utilizaron las siguientes proteínas: ovoalbůmina (PM=45~kD), quimotripsinògeno A (PM=24~kD) y lisozima (PM=14~kD).

5.2.- Cromatografia liquida de alta presión de APPL.

La distribución de pesos moleculares de las muestras de APPL fue determinada también mediante el uso de un cromatógrafo líquido HPLC Perkin Elmer Series 2 con una columna Shodex Ion Pak S-804/S (formada por poliestirenos sulfonados ramificados y divinilbenceno). La columna fue acoplada a un detector UV Perkin Elmer ajustado a 280 nm y un inscriptor Perkin Elmer 024. La columna fue equilibrada con una solución de NaOH 0,1 N y LiCl 0,05 N. Se inyectaron volúmenes de 0,5-2,0 µl de las muestras resuspendidas en la misma solución, manteniêndose un flujo de 1,0 ml/min.

Se calibrò la columna con una serie de pululanos (polisacàridos) de peso molecular conocido. Estos fueron analizados mediante un detector de indice de refracción, puesto que dichos polisacàridos no absorben la luz ultravioleta. Se prepararon soluciones stock de 5 mg/ml de dichos estàndares, de las cuales se inyectaron 15 µl en el cromatògrafo. Los pesos moleculares y tiempos de retención de estos estàndares en las condiciones descritas fueron:

P-800 75,8 ×10⁴ D 4,95 min.

P-400 33,8 ×10⁴ D 5,2 min.

P-200 19,4 ×10⁴ D 5,5 min.

P-100 9,54 ×10⁴ D 6,1 min.

P-50 4,67 ×10⁴ D 6,95 min.

P-20 2,08 ×10⁴ D 7,25 min.
P-10 1,2 ×10⁴ D 7,6 min.

P-5 0,53 x104 D 8,15 min.

Todos los anàlisis de HPLC utilizando la columna Shodex Ion Pak S-804/S fueron realizados en el Lab. de Fisicoquimica de Polimeros de la Facultad de Quimica de esta Universidad.

5.3.- Cromatografia liquida de alta presión de la fracción soluble en èter de lignina kraft.

Se analizaron muestras de FSE de lignina kraft en un cromatògrafo Shimadzu LC-6A acoplado a un inyector S/L-1A y un detector Shimadzu SPD-6A UV ajustado a 280 nm. Las señales fueron analizadas en un integrador Shimadzu Chromatopac C-R3A. Se utilizò una columna de 4,6 mm x 15 cm C18 µBondapak de 10 µm para la separación del material inyectado. La fase mòvil empleada fue un sistema isocràtico de agua : metanol (80:20) ajustado a un flujo de 0,7 ò 1,0 ml/min.

Con el fin de aumentar la resolución en la separación de los diversos componentes de la FSE, previo a la cromatografía líquida de alta presión se sub-fraccionaron las muestras mediante una precolumna SEP-PAK de 1,0 ml que contiene una fase estacionaria idéntica a la columna utilizada para el análisis de la FSE, según el procedimiento desarrollado por nuestro grupo de investigación (Goycoolea y cols., 1986). Brevemente, en estas precolumnas se cargaron alicuotas de 1 ml y se obtuvieron cuatro subfracciones al lavar dicha precolumna sucesivamente con porciones de 1 ml de una solución al 0, 10, 20 y 50 % de metanol en agua. Cada uno de los lavados fue recibido separadamente. Luego, èstos fueron acidificados a pH 1-2, extraídos dos veces

con un volumen de èter etilico y evaporados a sequedad. Los extractos fueron resuspendidos en 50 µl de agua, inyectàndose al cromatògrafo alicuotas de 1-5 µl.

5.4. - Anàlisis espectrofotomètrico de APPL.

Se registraron los espectros entre 350 y 250 nm, zona de mayor absorción de los APPL, en soluciones de 0,08 mg/ml de APPL en agua. Parte de los registros de la zona ultravioleta fueron realizados en un espectrofotòmetro Perkin Elmer Lambda 3B, UV/VIS acoplado a un registrador Perkin Elmer 561. En otras ocasiones se determinaron también los espectros de APPL en un espectrofotòmetro Shimadzu UV-160.

5.5.- Espectros de fluorescencia de APPL.

Las mediciones de emisión de fluorescencia de APPL se realizaron en un espectrofotómetro de fluorescencia Perkin Elmer 204-S acoplado a un registrador Perkin Elmer 023. Se empleó una fuente de poder de Xenon Perkin Elmer 150. Se utilizaron soluciones acuosas de APPL a una concentración de 0,083 mg/ml, las cuales fueron excitadas a 275 nm. Luego se registraron los espectros de emisión de fluorescencia a partir de los 280 nm. En algunos casos se hicieron ensayos a otras longitudes de onda, es decir variando la longitud de onda de excitación entre 270 y 295 nm y registrando la emisión a partir de los 275 y 300 nm, respectivamente. Las mediciones de los espectros de fluorescencia fueron realizadas en el Lab. de Fisico-química de Polímeros de la Facultad de Química de esta Universidad.

5.6. - Resonancia magnètica nuclear de APPL.

Se realizaron algunos anàlisis preliminares de APPL en un Varian XL-100 de la Facultad de Quimica de la P. Universidad Catòlica de Chile. Las muestras de APPL se disolvieron en agua deuterada e hidròxido de sodio. Los espectros se determinaron a 1000 Hz y a 32°C.

5.7.- Espectros Infra-rojo de FIE.

Los espectros IR fueron realizados en un espectrofotò metro Perkin Elmer 1310. Se prepararon las muestras en KBr.

6.- Mètodos de manipulación genètica.

6.1.- Detección de plasmidios.

Se determinò la presencia de plasmidios en las cepas aisladas de bacterias no filamentosas mediante el mètodo de Kado (Kado y Liu, 1981), que se detalla a continuación. Se prepararon cultivos de cada cepa en 1 ml de medio Luria, los cuales fueron incubaron a 30°C con agitación durante 15 hrs. También se utilizaron colonias cultivadas en placas de Petri con el mismo medio de cultivo rico como fuente de bacterias. De los cultivos en medio líquido se sacaron alícuotas de 0,2 ml, las cuales se centrifugaron por 5 min a 7000 rpm en una centrifuga Beckman para tubos Eppendorff. Se descartó el sobrenadante obteniêndose un sedimento de aproximadamente 1 mg de cèlulas. Alternativamente se raspò la colonia cultivada en placa con un mondadiente estèril recogièndose directamente una masa celular de alrededor de 1 mg.

Luego se resuspendieron las cèlulas en 20 μ l de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM) y se agregaron 0,1 ml de una mezcla litica. Esta contenia SDS al 3 % y Tris-HCl 50 mM pH 8,0. La solución lítica se ajustó a pH 12 antes de adicionar a las cèlulas. La mezcla se incubó a 55°C durante una hora y al tèrmino del periodo de incubación se extrajo con un volumen de una mezcla de fenol:cloroformo 1:1 agitando vigorosamente. Se separaron las fases mediante centrifugación y se aplicaron entre 30 y 50 μ l de la fase acuosa directamente en un gel de agarosa (Ver sección 6.2.1. de Materiales y Mètodos).

6.2.- Electroforesis del DNA.

6.2.1.- Geles de agarosa.

Para la separación de las distintas fracciones de DNA se prepararon geles de agarosa verticales al 1,0 % (Johnson y Grossman, 1977). Se pesò la cantidad necesaria de agarosa, se disolvió en tampón TEA (Trizma-base 4,84 g, acetato de sodio anhidro 1,64 g y EDTA disòdico 0,74 g por litro, ajustado a pH 8,1) y se fundió la agarosa por ebullición. Al descender la temperatura a 65-70°C, la agarosa fue vertida a placas de vidrio, formàndose geles de 1,5 ò 3 mm de espesor.

Las muestras, cuyos volúmenes finales fluctuaron entre $30-50~\mu l$, fueron mezcladas con un dècimo de su volumen con solución de carga (glicerol 50~%, SDS 5~%, EDTA 12~mM y azul de bromofenol 0,05~%), fueron calentadas durante 5~min a 60° C y luego aplicadas al gel. Se sometieron a una intensidad de corriente de 100~mA para forzar su entrada al gel en forma de banda angosta y luego a 60~mA durante el resto de la corrida.

6.2.2.- Visualización del DNA.

Los geles fueron separados de las placas de vidrio y sumergidos durante 10 min en una solución de bromuro de etidio 1 mg/ml y observados sobre un transiluminador de luz ultravioleta. En algunos casos, los geles fueron fotografiados utilizando películas Polaroid 55 positivo/negativo de 50 Asa / 18 Din. El tiempo de exposición usado fue dependiente de la intensidad de la fluorescencia de las bandas y varió entre 5 y 10 minutos.

6.3.- Eliminación de plasmidios (curación).

El procedimiento utilizado para eliminar plasmidios mediante agentes quimicos, consistió en incubar la cepa de interès en un medio lìquido rico en presencia de una concentración ligeramente inferior a la concentración minima inhibitoria del reactivo hasta alcanzar la fase estacionaria. Los agentes curantes ensayados fueron bromuro de etidio, mitomicina C, novobiocina, dipiridilamina e incubación a altas temperaturas. En los ensayos de curación por alta temperatura, se incubaron los cultivos liquidos a 44°C durante 48 hrs. Enseguida, en ambos casos se sembraron diluciones apropiadas en placas con medio de cultivo Luria en ausencia del agente curante y se incubò a 30°C durante 24 hrs. Las colonias aisladas formadas fueron transferidas paralelamente a placas con medio Luria y placas con medio minimo con algún sustrato aromático como fuente de carbono. La transferencia se hizo mediante mondadientes estèriles, dando a cada colonia una posición fija correlativa sobre un cuadriculado. De este modo, se reconocieron las colonias que se desarrollaban en medio rico pero no lo hacian en medio restrictivo. En estos

casos se verificò la presencia o ausencia de plasmidios mediante las tècnicas descritas en las secciones 6.1 y 6.2. de Materiales y Mètodos.

6.4.- Conjugación celular.

Se utilizaron dos protocolos de conjugación, a saber, conjugación en medio líquido y en medio sólido. Como receptoras se utilizaron diversas cepas que se especifican en la sección 2.2.2. de Resultados.

Las conjugaciones en medio líquido se realizaron preparando cultivos frescos en medio rico por separado de las dos cepas que intervendrían en la conjugación. Los cultivos se incubaron con agitación a 30°C hasta la densidad óptica deseada. Luego se mezclaron volúmenes apropiados de cada cultivo en un matraz estèril relativamente grande, de modo que el líquido sólo cubriera el fondo del recipiente y se dejó reposar a 30°C sin perturbación durante el tiempo previsto en el experimento. Al término del período de incubación se sembraron alícuotas o diluciones apropiadas del cultivo en placas con medio selectivo y se incubaron durante 3-4 días. El medio selectivo sólo permite el crecimiento de la cepa huèsped en la medida que èsta haya adquirido los caracteres de la cepa dadora en estudio mediante la conjugación. Obviamente, el medio selectivo no permite el desarrollo de la cepa dadora.

El protocolo de conjugación en medio sòlido consistió en mezclar gotas de los cultivos de las cepas dadora y receptora que habían alcanzado la densidad óptica buscada, sobre una membrana Millipore estèril depositada en una placa con medio rico. Las densidades ópticas de los cultivos fluctuaron entre 0,6 y 1,0.

Las placas fueron incubadas a 30°C durante las horas indicadas en el experimento (4-19 hrs) y luego se resuspendieron las bacterias adheridas a los filtros en un volumen minimo de medio rico. Alicuotas del cultivo resuspendido fueron sembradas en placas con medio rico, tal como se procedió en las conjugaciones en medio liquido.

7.- Medición de actividades enzimàticas extracelulares.

7.1.- Ensayo de ligninasa.

La actividad de lignina peroxidasa se ensayò midiendo la oxidación de alcohol veratrílico a veratraldehido, la cual se detectó por un aumento de absorbancia a 310 nm (Tien y Kirk, 1984). La enzima se ensayò en 1 ml de solución tamponada con tartrato de amonio 25 mM pH 2,5 que contenía alcohol veratrílico 2 mM. Para la determinación de actividad en los sobrenadantes de cultivos, se adicionó generalmente una alícuota de 0,75 ml hasta un volumen final de 1,1 ml del medio de ensayo. La reacción se inició adicionando 50 µl de H2O2 8 mM por ml de medio de ensayo.

7.2.- Mediciòn de lacasa + peroxidasa en sobrenadantes de cultivos de 6. applanatum.

El ensayo se basa en el cambio de color de la siringaldacina a 525 nm (Leonowicz y Grzynowycz, 1981). La enzima se ensayò en alícuotas de sobrenadantes de cultivos tamponados con fosfato 67 mM pH 5,5 a los cuales se adicionò H_{202} 0,4 mM. Se iniciò la reacción al adicionar el sustrato fenòlico.

8.- Microscopia electrònica.

8.1.- Microscopia electrônica de barrido.

Se prepararon muestras de cultivos de *S. viridosporus* T7A para su observación al microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-255II. Para ello se fijaron en una solución de alcohol al 75 %, àcido acètico y formaldehido en proporción de 90 : 5 : 5 y posteriormente se sometieron al procesamiento descrito para microscopia electrónica de barrido. Estas preparaciones fueron realizadas con la ayuda de la Dra. Gloria Montenegro, Lab. de Botànica de esta Facultad.

8.2. - Microscopia electrônica de transmisión.

Con el fin de observar las características externas de las cèlulas de diversas cepas de bacterias no filamentosas, se empleò el mètodo de la tinción negativa utilizando la tècnica de soporte de mica (Valentine y cols., 1968). Esta consistió en colocar unas gotas de cultivo fresco en medio rico de la cepa de interès en un pocillo, en el cual se sumergió un trocito de mica recubierto con una capa delgada de carbón. Se desprendió cuidadosamente la película de carbón de su soporte y se permitió la adherencia de las cèlulas al carbón durante 4 min. Enseguida se recogió la película de carbón con la misma mica, se transfirió a un pocillo con acetato de uranilo al 1 % y se tiñó durante un min, despuès de desprender nuevamente la película de carbón. Finalmente, èsta fue recogida con un grilla previamente flameada en llama de alcohol.

En aquellos casos en que no se observo una buena adherencia de las bacterias a la capa de carbón se utilizo la modalidad del "glow", que consiste en someter la mica con la película de carbón a un campo iónico de modo de aumentar su caracter hidrofilico antes de ponerlas en contacto con las células. Este proceso fue llevado a cabo en un equipo evaporador de alto vacio Kinney Vacuum Equipment 80-3. Las micas sometidas al "glow" fueron utilizadas según el protocolo descrito más arriba. La microscopía electrônica fue realizada en el Lab. de Histología de esta Facultad con la colaboración del Dr. Jorge Garrido, Lucy Messen y Raúl Fuentes.

Las preparaciones fueron analizadas en un microscopio electrônico Elmiskop 102 a 80 kV y fotografiadas utilizando una película Agfa Gevaert Scientia Film.

According to the Later beautiful the Committee of the Com

RESULTADOS

1.- Caracterización metabólica de Streptomyces viridosporus T7A.

1.1.- Metabolización de monòmeros modelo de lignina.

Con el fin de profundizar el conocimiento sobre las propiedades ligninolíticas de esta bacteria filamentosa, se analizò su capacidad de metabolizar diferentes compuestos modelo de lignina conteniendo un solo anillo aromàtico. Aunque en rigor la capacidad de degradar estos compuestos no es necesariamente un reflejo de una actividad ligninolitica propiamente tal, su uso ha sido de gran utilidad para dilucidar los mecanismos enzimàticos utilizados por hongos en la biodegradación de la lignina. Por otra parte, se ha descrito que S. viridosporus T7A solubiliza fragmentos ricos en lignina a partir de lignocelulosa mediante un sistema enzimàtico que no ha sido definido aùn, pero que serla inducible en presencia de lignocelulosa. Con el objeto de determinar si la metabolización de los compuestos modelo de lignina ocurre mediante los mismos sistemas enzimàticos utilizados en la solubilización de lignocelulosa, se realizaron estos ensayos tanto en presencia como en ausencia de lignocelulosa, según el protocolo detallado en la sección 1.2.3.c de Mètodos.

Entre los compuestos simples que presentan cierta relación con la lignina, se eligieron diversos alcoholes aromàticos y åcidos benzoicos y fenilpropanoicos cuya metabolización no había sido estudiada en S. viridosporus T7A (Ver números I al XVI, Figura 2). Así, por ejemplo, se encontrò

que el microorganismo oxida al alcohol anísico a àcido anísico (V) con igual eficiencia, tanto en presencia como en ausencia de lignocelulosa. No se logrò detectar anisaldehído, el cual debe ser oxidado ràpidamente a àcido anísico. Si se utiliza anisaldehído como sustrato, èste también es convertido al mismo àcido por acción de S. viridosporus T7A (Figura 3). Se encontrò que los isòmeros orto y meta anisaldehido son oxidados sòlo parcialmente a los àcidos o- y m- anísico, respectivamente, cuando èstos se encuentran en baja concentración en el medio (1 mM). A concentraciones mayores (5 mM), o-anisaldehido inhibe el crecimiento de la bacteria.

Se encontrò que guaiacol (II), los àcidos benzoicos gâlico (IX), 3-0-metilgàlico (X) y siringico (XI) y los àcidos fenilpropanoicos cinàmico (XII), cumàrico (XIII) y ferúlico (XV) no son modificados por *S. viridosporus* T7A. En los ensayos que se hicieron en presencia de lignocelulosa, se observò siempre una solubilización parcial de este sustrato por la acción de este microorganismo (Figura 4).

Se estudiò tambièn la actividad de *S. viridosporus* T7A sobre un sustrato denominado "aducto de glicina" (XVI). Este compuesto es un modelo de lignina muy atractivo, ya que està descrito que en condiciones ligninolíticas el basidiomicete *Phanerochaete chrysosporium* lo rompe produciendo glicina, veratraldehido y formaldehido, pudiendo actuar la primera como fuente de nitrògeno (Tien y cols., 1987). Se encontrò que el actinomicete en estudio no modifica el aducto de glicina, ya sea en presencia o ausencia de lignocelulosa.

El hallazgo màs interesante de este grupo de ensayos consistió en determinar que el alcohol veratrílico sólo es convertido significativamente a àcido veràtrico (VII) en

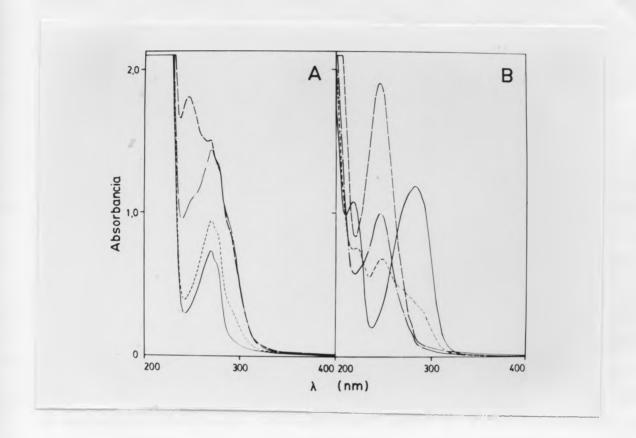


Figura 3: Oxidación de alcohol p-anísico y p-anísaldehído a àcido anísico (\mathbf{V}). Trazados espectrofotomètricos de las muestras tomadas durante los cultivos de S. viridosporus T7A en A) alcohol p-anísico y B) p-anísaldehído en presencia de lignocelulosa de trigo. Los tiempos de incubación en días son: O (——), 1 (---), 2 (——) y 3 (——).

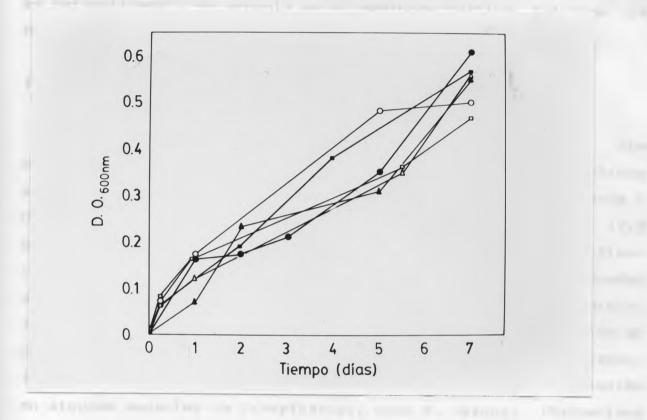


Figura 4: Producción de APPL a partir de lignocelulosa de trigo por acción de S. viridosporus T7A en presencia de diversos compuestos aromàticos. (\bullet): àcido cumárico (XIII); (\triangle): catecol (I); (\triangle): dimetoxibenzoilo (XXIII); (\blacksquare): VGGE (XXXIV); (\square): 4,4'bifenol (XXXV) y (O): sin adición de un compuesto aromàtico.

presencia de lignocelulosa. En su ausencia, la oxidación del sustrato es escasa (Ver Figura 5). El àcido veràtrico formado no es metabolizado y se acumula en el medio de cultivo, tal como lo han descrito otros autores (Crawford y cols., 1982).

1.2.- Un caso especial: el àcido protocatecuico.

Numerosos estudios indican que existen tres vias metabòlicas generales para la metabolización de àcidos aromàticos simples. Estas son aquellas denominadas de ruptura orto (Clarke y Ornston, 1975), de ruptura meta y del àcido gentísico (2,5 dihidroxibenzoico, VIII) (Bayly y Barbour, 1984). Los últimos intermediarios aromàticos de las dos primeras rutas mencionadas son el catecol o el àcido protocatecuico (3,4 dihidroxibenzoico, IV). El rol central del àcido protocatecuico en la degradación de diversos compuestos aromàticos ha sido establecido en *Pseudomonas* (Toms y Wood, 1970), *Bacillus* (Crawford y cols., 1979) y también en algunas especies de *Streptomyces*, como *S. setonii* (Sutherland y cols., 1983) y *S. sioyaensis* (Sutherland y cols., 1981)

Se incubò S. viridosporus T7A en un medio minimo suplementado con 0,1 % de extracto de levadura y àcido protocatecuico 5 mM y se sacaron alicuotas del medio de cultivo a distintos tiempos de incubación. Se observó que en estas condiciones el àcido no era degradado sino convertido en otro compuesto con un màximo de absorción a 260 nm que se acumula en el medio (Figura 6A). Este ensayo se realizó incubando la bacteria filamentosa con el àcido protocatecuico tanto en ausencia como en presencia de lignocelulosa. En ambas condiciones de cultivo se forma igual cantidad del producto descrito. Por otra parte, al incubar el microorganismo en idènticas condiciones

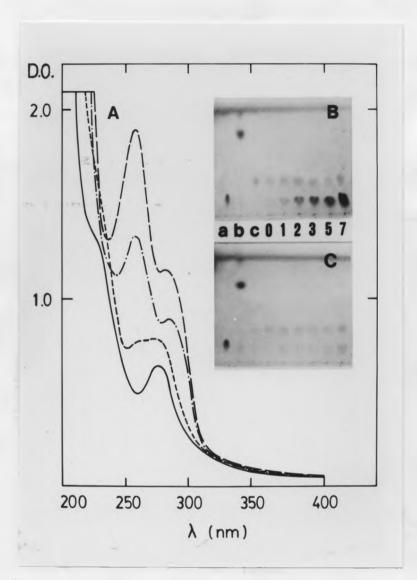


Figura 5: Oxidación de alcohol veratrílico a ácido verátrico. A) Trazados espectrofotométricos de sobrenadantes de cultivos de S. viridosporus T7A conteniendo lignocelulosa y 5 mM alcohol veratrílico tomados a los O (—), 1 (---), 2 (---) y 5 (—-) días de incubación. B) Cromatografía en capa fina de las mismas muestras que en A). C) Cromatografía en capa fina de muestras tomadas de cultivos de S. viridosporus T7A con alcohol veratrílico en ausencia de lignocelulosa. a, b y c corresponden a estándares de ácido verátrico (VII), veratraldehido y alcohol veratrilico, respectivamente. Los números indican el tiempo de incubación en días.

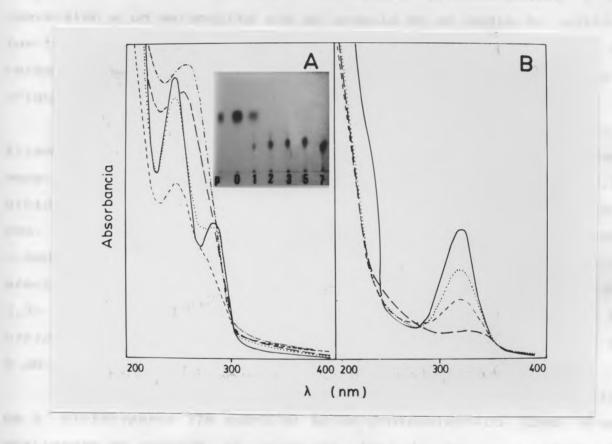


Figura 6: Acción de S. viridosporus T7A sobre los àcido protocatecuico y gentísico. Trazados espectrofotométricos de sobrenadantes de cultivos tomados a los O (—), 2 (····), 3 (---), 5 (—) y 7 (-·-) días de incubación en un medio de incubación que contiene A) àcido protocatecuico 5 mM (IV), o B) àcido gentísico 5 mM (VIII). El inserto muestra una cromatografía en capa fina de las mismas alícuotas que en A). "p" corresponde a un estàndar de àcido protocatecuico y los números indican el tiempo de incubación en días.

The burners of the later of the control of the later do

con àcido gentísico, se observa una clara desaparición de la absorbancia en el rango descrito al transcurrir el tiempo de incubación, indicando que este compuesto si es degradado a intermediarios alifàticos que no absorben luz ultravioleta (Figura 6B). La degradación del àcido protocatecuico y su conversión a un metabolito que se acumula en el medio de cultivo fue también analizada mediante HFLC. Este presenta un tiempo de retención idêntico al àcido gâlico en las condiciones ensayadas (Figura 7).

En forma paralela se estudió la acción de la bacteria filamentosa sobre una serie de àcidos aromàticos hidroxilados, específicamente los àcidos 2,3-, 2,4-, 2,6- y 3,5-dihidroxibenzoicos y los àcidos 3,4,5- y 2,3,4- trihidroxibenzoicos. Se encontró que ninguno de estos compuestos eran degradados o modificados por *S. viridosporus* T7A, y que tampoco èstos afectaban su crecimiento y desarrollo. En cambio, los aldehidos 2,3- y 2,4- dihidroxilados inhiben el desarrollo de *S. viridosporus* T7A cuando estàn presentes a una concentración de 5 mM.

Nos interesò identificar el producto formado por acción de *S. viridosporus* T7A sobre el àcido protocatecuico. Como etapa preliminar se comparò el producto formado con una serie de compuestos aromàticos monomèricos disponibles en el laboratorio. No se encontrò coincidencia completa con ninguno de los compuestos ensayados según tres criterios analíticos: 1) espectro UV en medio neutro, 2) espectro UV en medio alcalino y 3) cromatografía en capa fina utilizando placas de silicagel y diversos sistemas de solventes.

Se procediò entonces a purificar el compuesto a partir de incubaciones preparativas de un litro de medio de cultivo

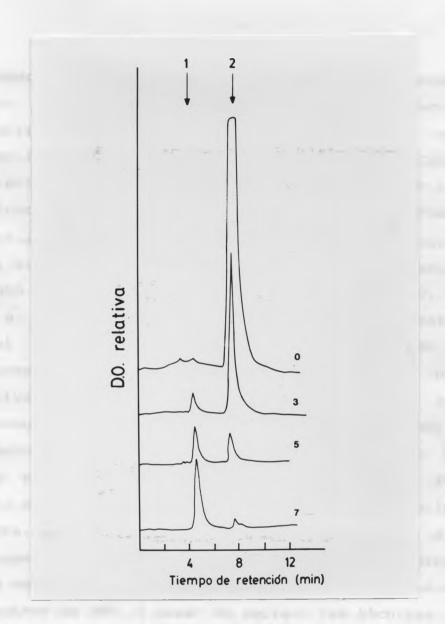


Figura 7: Perfil de elución de HPLC de muestras tomadas a distintos tiempos de incubación de cultivos de *S. viridosporus* T7A suplementados con àcido protocatecuico. Las flechas indican los tiempos de retención de estándares de ácido gálico (IX) (1) y de àcido protocatecuico (IV) (2). Los números indican el tiempo de incubación en dlas.

conteniendo el medio minimo, 0,1 % de extracto de levadura y 5 mM de àcido protocatecuico (770 mg) previamente purificado por recristalización. Despuès de concluir el período de incubación y comprobar la presencia del producto en el medio de cultivo por los criterios indicados más arriba, se separaron los micelios por filtración y se acidifico el medio a pH 1,0. Posteriormente se separò el producto mediante extracciones sucesivas con èter etilico, evaporàndose la fase orgânica a sequedad. El mejor rendimento obtenido fue de 200 mg de producto impuro, el cual se sometiò a purificaciones sucesivas mediante cromatografía en silicagel eluyendo con cloroformo y acetona en distintas proporciones. Como control se realizò también una purificación preparativa a partir de cultivos de 1 litro en ausencia de protocatecuico, en la cual no se obtuvo ni trazas del producto. El producto purificado de color blanco obtenido fue sometido a diversos anàlisis quimicos y espectroscòpicos (IR, ¹H-NMR, *3C-NMR y espectrometria de masas) con el fin de dilucidar su estructura. Se propuso la estructura indicada al pie de esta pàgina, que es consistente con el peso molecular indicado por el espectro de masas y con la mayoria de las señales que aparecen en los espectros de NMR. A pesar de emplear las tècnicas analíticas nombradas, el conjunto de datos obtenidos no permitiò postular un estructura definitiva para el producto purificado (Ver Discusión).

1.3.- Utilización de compuestos diméricos modelo de lignina.

Como ya se ha indicado, los compuestos modelo dimèricos de lignina son aquellos que poseen residuos aromàticos unidos entre si por enlaces característicos encontrados en este polímero. La utilización de compuestos modelo de lignina dimèricos permite evaluar la capacidad de un microorganismo para romper específicamente dichos enlaces. Las estructuras moleculares de los compuestos modelo de lignina dimèricos utilizados en este trabajo se muestran en la Figura 2, números XVII al XXXVII. Los sustratos dimèricos se adicionaron al medio de cultivo a una concentración final de 1 mg/ml.

1.3.1.- Compuestos del tipo 6-1.

Se había descrito que compuestos modelo de estructura diariletano como la anisolna (XIX), son atacados por hongos ligninolíticos en forma similar a los diarilpropanos, obteniêndose en ambos casos una ruptura entre los carbonos y f (Shimada y cols., 1983). En este trabajo se investigo la capacidad de S. viridosporus T7A de metabolizar compuestos modelo f-1 tanto en ausencia como en presencia de lignocelulosa de paja de trigo purificada.

Se encontrò que el actinomicete modifica la anisoina reduciendo el grupo carbonilo a carbinol. Dicha reducción fue detectada inicialmente por cromatografía en capa fina (TLC) y luego confirmada por espectrofotometría, ya que se produce un cambio en el espectro de la anisoina a aquel que es característico de la hidroanisoina (XXVI). Esta reducción ocurre también en el 4,4'-dimetoxibenzoilo (XXIII), que posee dos grupos

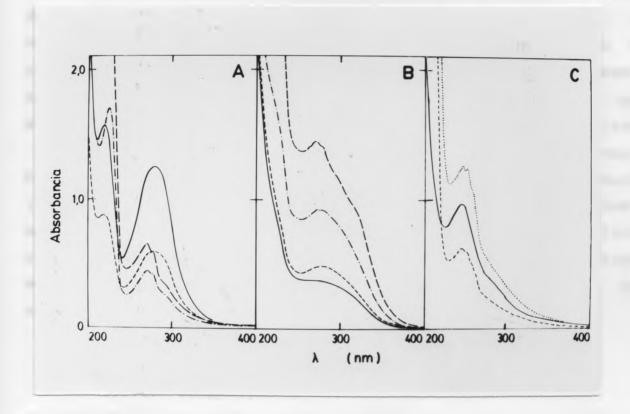


Figura 8: Reducción de compuestos de estructura diariletano por S. viridosporus T7A en presencia de lignocelulosa de trigo. Trazados espectrofotométricos de sobrenadantes de cultivos tomados a las O (——), 6 (---), 22 (——), 94 (——) y 220 (……) horas en presencia de 1 mg/ml de A) anisoina (XIX), B) dimetoxibenzoilo (XXIII) y C) benzoina (XVII).

carbonilo, acumulândose hidroanisoîna en el medio de cultivo (Figura 8). La reducción del carbonilo a alcohol secundario se observó también en los análogos benzoîna (XVII), desoxibenzoina (XVIII) y desoxianisoina (XX), produciendo los compuestos XXIV, XXV y XXVII, respectivamente. En todos estos casos, la modificación del grupo carbonilo se observa de igual grado en ausencia y en presencia de lignocelulosa. En ningún experimento se observó ruptura entre ambos carbonos alifáticos, reacción que sí ocurre en estos modelos en presencia de hongos ligninolíticos.

For otra parte, el compuesto de estructura diarilpropano hidroximetildesoxianisolna (HMDA, XXI), su anàlogo reducido (XXVIII) y 2,2 dimetoxi-2- fenilacetofenona (XXII) no fueron modificados por *S. viridosporus* T7A. Esta observación se realizó con y sin lignocelulosa presente en el medio de cultivo. En todos estos experimentos se detectó la liberación de APPL por solubilización parcial de lignocelulosa (Ver Figura 4).

1.3.2.- Compuestos de estructura 6-0-4.

Como se señalò anteriormente, el enlace arilglicerol-\(\theta\)-aril\(\theta\)ter o \(\theta\)-0-4 es el encontrado con mayor frecuencia en la lignina. En el laboratorio se dispone de diversos compuestos modelo con enlaces \(\theta\)-0-4 tanto fen\(\theta\)licos como no fen\(\theta\)licos (XXX-XXXIV), los cuales fueron utilizados para determinar la capacidad de \(\theta\). \(\textit{viridosporus}\) T7A de modificarlos tanto en presencia como ausencia de lignocelulosa purificada de paja de trigo. Se utiliz\(\theta\) tambi\(\theta\)n un compuesto denominado "trimero" (XXXII), que es un intermediario de la s\(\textit{lntesis}\) quimica de los modelos dim\(\theta\)ricos y que contiene tres anillos arom\(\theta\)ticos. Se comprob\(\theta\) mediante el uso de diversas t\(\theta\)cnicas, tales como

espectrofotometria, cromatografía en capa fina y HPLC que ninguno de estos compuestos modelo era roto o modificado por la bacteria filamentosa en estudio (Ver Figura 9 como ejemplo). Se verificò que en presencia de lignocelulosa tampoco ocurre modificación alguna, en condiciones que simultâneamente se producían APPL en el medio de cultivo (Figura 4). Esta observación contrasta con lo reportado por R. Crawford, quien describió una actividad enzimàtica de S. viridosporus T7A que rompe el dimero no fenòlico VGGE (XXXIV) cuando el microorganismo es incubado en presencia de lignocelulosa de maiz (Crawford y cols., 1983a). Los ensayos se realizaron con el mismo compuesto modelo, el mismo microorganismo y en condiciones de cultivo aparentemente idènticas a las utilizadas por Crawford con las que detectò ruptura de VGGE (Ver Discusión).

1.3.3. Compuestos bifenilos.

Se investigò también la capacidad de *S. viridosporus* T7A de degradar compuestos modelo dimèricos cuyos anillos se encuentran ligados por enlaces bifenilo. Existe en la literatura un antecedente que señala que esta bacteria es capaz de oxidar el bifenilo dehidrodivanillina al àcido correspondiente (Crawford y cols., 1981). Los autores de este trabajo sugieren ademàs que el àcido formado es degradado, aunque no se presentan evidencias concretas de este hecho. Nosotros utilizamos como sustrato otros dos compuestos con estructura bifenílica (XXXV y XXXVI), los cuales se muestran en la Figura 2. Se encontrò que *S. viridosporus* T7A no modifica estos sustratos, aún cuando la incubación se realizò sobre lignocelulosa que fue parcialmente solubilizada por la bacteria durante la incubación (Figura 4).

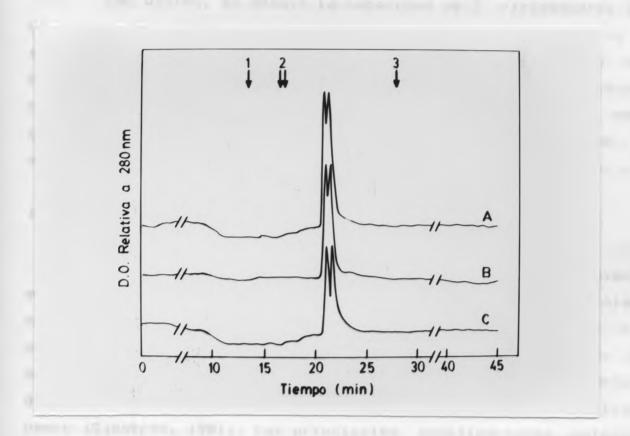


Figura 9: Perfil de elución de HPLC de muestras tomadas de cultivos de *S. viridosporus* T7A suplementados con VGGE, formas eritro y treo (XXXIV). A) y B) Alicuotas de cultivos en ausencia de lignocelulosa tomadas a las O y 22O h de incubación.

C) Alicuota de cultivo que contiene lignocelulosa tomada a las 22O h de incubación. Las flechas indican los tiempos de retención de guaiacol (1), formas eritro y treo de GGGE (XXXIII) (2) y VGGEox (XXXI) (3).

1.3.4. α -fenilcinàmico.

Por último, se ensayò la capacidad de S. viridosporus T7A de romper o modificar el àcido α-fenilcinàmico (XXXVII) y su anàlogo reducido, el àcido 2,3 difenilpropanoico (XXIX) a una concentración final de 0,1 mg/ml en el medio de cultivo. Nuevamente, las incubaciones se hicieron tanto en presencia como en ausencia de lignocelulosa, sin detectarse algún cambio en la estructura de dichos compuestos modelo por acción bacteriana.

1.4.- Utilización de lignina kraft.

En la actualidad, el proceso kraft es el procedimiento màs importante para la obtención de pulpa química a nivel mundial. Se basa en el tratamiento a altas temperaturas de las astillas de madera con una solución concentrada de hidróxido de sodio y sulfuro de sodio, lo que conduce a la remoción selectiva de la lignina que se solubiliza dando lugar al llamado licor negro (Sjöström, 1981). Las principales modificaciones químicas producidas en la lignina bajo estas condiciones son la ruptura de enlaces aril-alquilèter, modificación de cadenas alifâticas y condensaciones diversas (Crawford, 1981; Sjöström, 1981). Sin embargo, tradicionalmente se la ha usado como sustrato en estudios de degradación de lignina. Presenta la ventaja además de ser soluble en agua.

Se ha demostrado que algunos hongos filamentosos poseen la capacidad de degradar la lignina kraft (Fukuzumi, 1980; Janshekar y cols., 1982), lo que ha permitido desarrollar mètodos de biodecoloración de los efluentes de la industria de la celulosa en base a estas propiedades (Eaton y cols., 1980;

Livernoche y cols., 1981). Se ha estudiado también la acción de diversas bacterias (Deschamps y cols., 1980; Goycoolea y cols., 1986; Kawakami y Ohyama, 1980) sobre la lignina kraft, demostràndose que en la mayoría de los casos su efecto es más bién limitado. Sin embargo, en algunos de estos trabajos se utilizó lignina kraft sin purificar, lo cual le resta confiabilidad a los resultados obtenidos (Deschamps y cols., 1980). A su vez, no hay trabajos publicados acerca de la capacidad de actinomicetes de metabolizar fracciones purificadas de lignina kraft.

Nos propusimos entonces estudiar la acción de S. viridosporus T7A sobre fracciones purificadas de lignina kraft, puesto que los resultados que se obtuvieran revistirían un interès bàsico y también aplicado. El licor negro que se utilizó como fuente de lignina kraft fue purificado y fraccionado (Lundquist y Kirk, 1980) según se detalla en la sección 2.2.2. de Materiales y Mètodos. Se obtuvieron dos fracciones: una de peso molecular mayor de 3.000 D e insoluble en èter (FIE) y otra de peso molecular menor de 3.000 D que es soluble en èter (FSE) (Lundquist y Kirk, 1980).

1.4.1.- Efecto de FIE y FSE sobre el crecimiento de S. viridosporus T7A en extracto de levadura.

En primer lugar se estudió el efecto de ambas fracciones sobre el crecimiento de *S. viridosporus* T7A cultivado en el medio minimo descrito y suplementado con 0,3 % de extracto de levadura. Para ello se prepararon matraces con 9,0 ml de medio minimo a los cuales se adicionaron cantidades crecientes de una u otra fracción de lignina kraft y se inocularon con 1,0 ml de una

suspensión turbia de esporas. Al término de una incubación de cuatro días a 37°C con agitación y se midió el desarrollo de los micelio. La FSE se ensayó entre 0,5 y 5,0 mg/ml y la FIE entre 1,0 y 5,0 mg/ml.

Se encontrò que ambas fracciones tienen efectos diferentes sobre el crecimiento de la bacteria filamentosa: mientras la FSE lo inhibe, la FIE pràcticamente no lo afecta. En la Figura 10B se muestra el efecto inhibitorio de la FSE sobre el desarrollo bacteriano. Cuando la concentración de FSE fue de sòlo 0,5 mg/ml, los micelios producidos eran muy escasos y de desarrollo pobre. A 1,5 mg/ml la inhibición del crecimiento fue total. La FIE, por el contrario, no inhibió el crecimiento (Figura 10A).

Si bien el efecto de S. viridosporus T7A sobre FIE parece no ser importante, se considerò la posibilidad que se produjeran cambios en el grado de polimerización del sustrato. Para verificarlo, se retiraron alicuotas del medio de cultivo en el transcurso de la incubación (O, 4, 8 y 12 días) y se filtraron a travês de una columna Sephadex G-50 según se detalla en la sección 5.1. de Materiales y Mètodos. No se encontraron diferencias en los patrones de elución de muestras inoculadas con la bacteria y controles estèriles. Asimismo, no hubo diferencias significativas en los espectros infra-rojos obtenidos de muestras inoculadas y controles. Del mismo modo, se filtraron alicuotas del medio de cultivo suplementado con FSE a travês de la misma columna Sephadex G-50. Como era de esperar, no se observaron cambios en el patrón de elución de alicuotas incubadas con la bacteria filamentosa y los respectivos controles sin inòculo.

Se quiso determinar si *S. viridosporus* T7A descolora la lignina kraft, tanto en presencia como en ausencia de lignocelu-

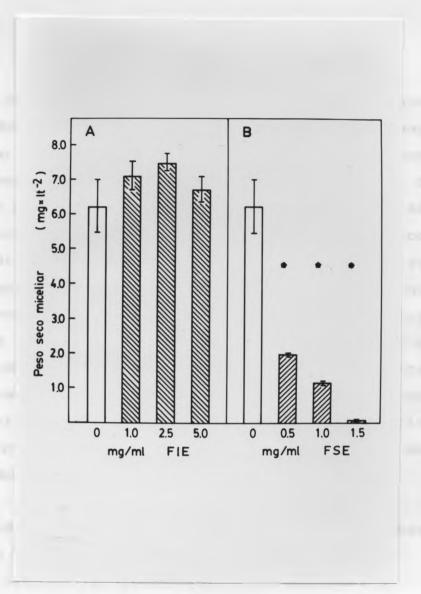


Figura 10: Efecto de fracciones purificadas de lignina kraft crecimiento de Si viridosporus T7A. Las barras corresponden al peso seco de micelios de1 microorganismo recuperados al cabo de 4 días de incubación en un medio que contenía 0,3 % de extracto de levadura. A) Biomasa recuperada de cultivos suplementados con 0, 1,0, 2,5 y 5.0 mq/ml insoluble en èter de lignina kraft (FIE). B) Biomasa recuperada de cultivos suplementados con 0, 0,5, 1,0 y 1,5 mg/ml de fracción soluble en èter de lignina kraft (FSE). Se indican valores promedio y desviaciones estàndar. Anàlisis de varianza de Student: *: p<0,005.

losa, tal como se ha descrito en hongos ligninolíticos (Eaton y cols., 1980; Fukuzumi, 1980). Para ello se ensayaron ambas fracciones, aunque el crecimiento de *S. viridosporus* T7A es inhibido por FSE. Por esta razòn, los ensayos con FSE se prepararon precreciendo la bacteria durante 48 h en el medio de cultivo habitual. Las FIE y FSE se ensayaron a una concentración final en el medio de 2,5 y 1,25 mg/ml, respectivamente. Se observò que *S. viridosporus* T7A no descolora la FIE ni la FSE de lignina kraft, ya sea en presencia o ausencia de lignocelulosa, aún cuando las incubaciones se prolonguen durante 20 o màs dias (datos no mostrados). La descoloración de ambas fracciones se determinò midiendo la absorbancia a 465 nm (Eaton y cols., 1980). Estos resultados vuelven a indicar que las modificaciones en el sustrato por acción de *S. viridosporus* T7A son escasas (Seelenfreund y Vicuña, 1989).

1.4.2.- Anàlisis mediante HPLC de la FSE antes y despuès de incubar con *S. viridosporus* T7A.

La FSE fue analizada mediante HPLC al tèrmino de incubaciones con esporas y micelios de *S. viridosporus* T7A y comparadas con el control sin inòculo correspondiente. La intenciòn era determinar si a pesar de la inhibición del desarrollo del microorganismo, se producen pequeñas modificaciones en la FSE por acción de la bacteria. Con este propòsito se incubaron esporas durante cuatro días en un medio de cultivo que contenía un 0,3 % de extracto de levadura suplementado con 2,5 mg/ml de FSE. En estas condiciones se obtuvo un desarrollo parcial de micelios. En forma paralela se realizaron cultivos inoculados con micelios crecidos previamente

en un medio sin fracciones de lignina kraft y un control estèril. Con el fin de aumentar la resolución se prefraccionaron los sobrenadantes a analizar, obtenièndose cuatro sub-fracciones de cada uno, las que fueron extraidas con êter antes de ser inyectadas en el cromatògrafo (ver sección 5.3 de Materiales y Mètodos). En la Figura 11 se muestran los perfiles de elución obtenidos para las cuatro subfracciones de las muestras analizadas. Se observò que tanto las esporas como los micelios produjeron modificaciones en los perfiles de elución con respecto al control sin inòculo. Ambos cultivos metabolizaron el pico de menor polaridad de la sub-fracción A y causaron la aparición de nuevos picos en la sub-fracción B que no estaban presentes en la fracción correspondiente del cultivo control. Los cambios detectados en la sub-fracción C son pequeños, en tanto que no se observaron cambios significativos en la subfracción D.

Este tipo de anàlisis no puede ser realizado con la FIE, debido a que no se puede hacer el subfraccionamiento descrito más arriba, ya que sus componentes no son solubles en èter. Sin embargo, existe la posibilidad de examinar si se liberan molèculas solubles en èter al medio de cultivo por acción bacteriana. Para ello se incubò S. viridosporus T7A en el medio minimo con 0,3 % de extracto de levadura y 2,5 mg/ml de FIE durante cuatro dias. Al término de la incubación se sacaron alicuotas medidas de sobrenadante y la mitad del material se acidificò y extrajo con èter etilico para su posterior inyección cromatògrafo. La porciòn remanente se en extrajo acidificar previamente. Todas las muestras preparadas fueron comparadas con fracciones de un control sin inòculo tratadas del mismo modo. Los perfiles de elución obtenidos de las muestras acidificadas y a pH neutro no mostraron diferencias con respecto

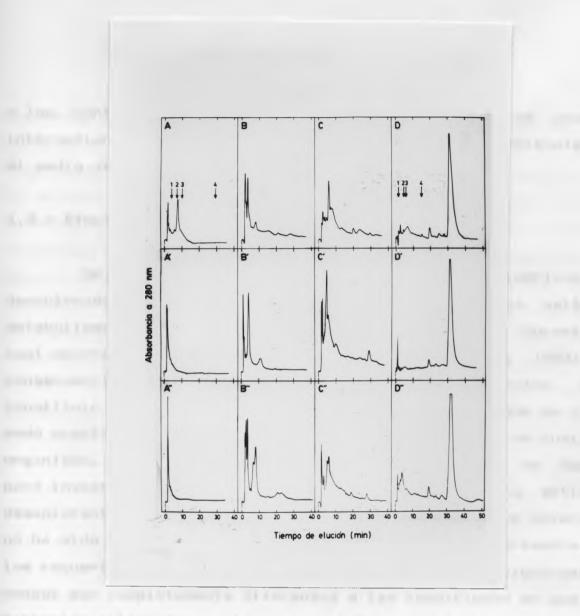


Figura 11: Perfil de elución de HPLC de sub-fracciones de la fracción soluble en èter de lignina kraft después de incubar en presencia de esporas y micelios de S. viridosporus T7A. A-D: control incubado sin inòculo, A'-D': cultivo inoculado con esporas y A"-D": cultivo inoculado con micelios precrecidos de S. viridosporus T7A. Las muestras fueron fraccionadas en un pre-columna SEP-PAK y eluidas con concentraciones crecientes de metanol antes de cargar en la columna de HPLC: A,A',A": eluido; B,B',B": lavado con 10 % de metanol; C,C',C": lavado con 20 % de metanol y D,D',D": lavado con 50 % de metanol. La fase mòvil utilizada fue metanol/agua 20:80 %. Se indican los tiempos de retención de los siguientes estàndares: 1: àc. vanillico, 2: àc. cumàrico, 3: àc. ferúlico y 4: àc. cinàmico.

a los controles sin inòculo, indicando que no se acumulan intermediarios de degradación estables de bajo peso molecular en el medio de cultivo (Seelenfreund y Vicuña, 1989).

1.5.- Efecto sobre Azul de Remazol.

Se ha descrito que ciertos colorantes polimèricos son descolorados por hongos ligninolíticos cuando èstos están en metabolismo secundario, que es el estado metabólico durante el cual ocurre la degradación de lignina (Glenn y Gold, 1983). En consecuencia, el uso de colorantes como sustratos puede constituir una aproximación ràpida y preliminar, aunque de ningún modo exacta para detectar la actividad ligninolitica de cualquier organismo. Nosotros seleccionamos el colorante Azul de Remazol para investigar si S. viridosporus T7A posee una actividad descolorante similar. La acción de actinomicetes sobre colorantes no ha sido descrita en la literatura. Debe tenerse presente que los requerimientos fisiológicos para inducir la ligninasa en hongos son completamente diferentes a las condiciones en que las bacterias filamentosas atacan a la lignocelulosa, ya que los actinomicetes degradan lignocelulosa durante su etapa de crecimiento, es decir, durante el estado de metabolismo primario (McCarthy, 1987).

Con el fin de determinar si *S. viridosporus* T7A es capaz de descolorar el Azul de Remazol se prepararon cultivos en medio sòlido conteniendo el medio minimo y lignocelulosa de trigo y se incubò durante 90 horas a 37°C en medio sòlido. Se incluyeron un tubo control sin inòculo y otro control sin lignocelulosa. Al tèrmino de este periodo se adicionò màs medio de cultivo y el colorante en una concentración final de 0,05 %. Los cultivos se

incubaron con agitación a 37°C y se retiraron alícuotas del medio durante el transcurso del experimento. Como se observa en la Figura 12, se produjo una descoloración parcial del colorante en el ensayo que contenía lignocelulosa. En cambio, los controles sin lignocelulosa y sin inòculo presentan razones constantes de absorbancia a 585 y 500 nm. Se grafica una razón de absorbancias, para diferenciar el cambio espectral del colorante de una simple adsorción al micelio. Este resultado indica que el o los sistemas enzimàticos inducibles por lignocelulosa tienen una cierta relación con la descoloración de Azul de Remazol, si bien èstos no son capaces de descolorar la lignina kraft (Seelenfreund y Vicuña, 1989).

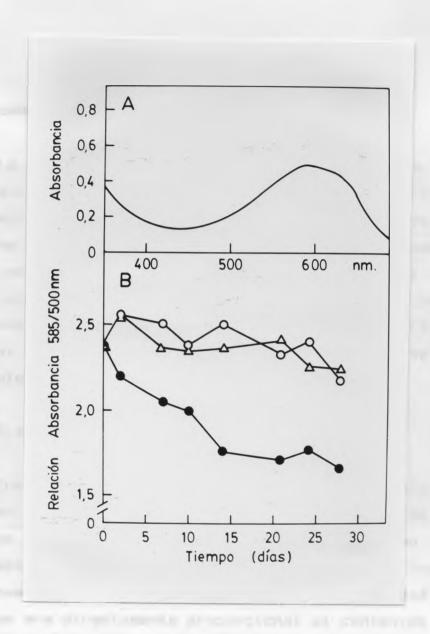


Figura 12: Efecto de S. viridosporus T7A sobre Azul de Remazol.

A) Espectro visible del colorante. B) (O) Control estèril conteniendo lignocelulosa, (△) cultivo inoculado con S. viridosporus T7A, pero en ausencia de lignocelulosa y (●) cultivo incubado en presencia de lignocelulosa de trigo.

all the wide the contribution on printing as a member of the contribution of

1.6.- Producción de APPL.

La característica de *S. viridosporus* T7A de generar lignina soluble (APPL) a partir de lignocelulosa permite estudiar la biodegradación de este sustrato natural. Los APPL son producidos tanto en cultivo líquido como en medio sólido, mediante mecanismos que aún se desconocen. En este trabajo se hicieron algunos estudios preliminares acerca de la producción de APPL en medio líquido y en medio sólido. En la Figura 13 se muestra el aspecto de los cultivos de *S. viridosporus* T7A sobre lignocelulosa en ambos tipos de medio.

1.6.1.- Producción en medio liquido.

Crawford describió que se produce una acumulación de APPL al incubar *S. viridosporus* T7A sobre lignocelulosa de maiz en un medio de cultivo líquido suplementado con distintas concentraciones de extracto de levadura (Crawford y cols., 1983). Estos investigadores encontraron que la cantidad de APPL producidos era directamente proporcional al contenido de extracto de levadura. Se repitió el experimento utilizando lignocelulosa purificada de trigo. Los cultivos fueron preparados en la forma descrita a pequeña escala en la sección 1.2.3.c de Materiales y Mètodos y se sacaron numerosas alícuotas de sobrenadante durante el transcurso del experimento. Se determinó el contenido de APPL en dichas alícuotas según se especificó en la sección 2.3.2. de Materiales y Mètodos. A diferencia de lo observado en maiz, utilizando lignocelulosa de trigo no se detectó una dependencia importante del contenido de extracto de levadura (Figura 14). No

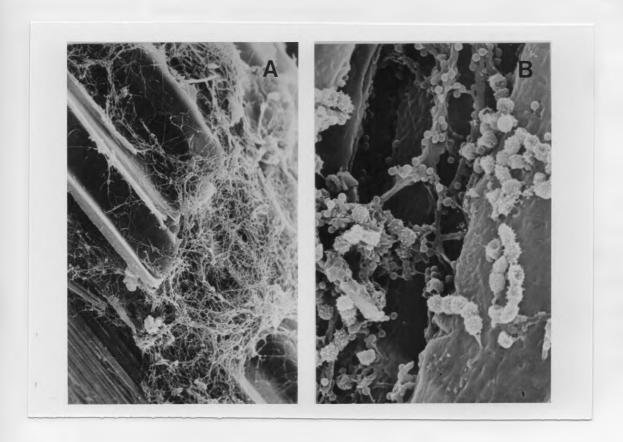


Figura 13: Microfotografias electrônicas de barrido de lignocelulosa de trigo incubada con *S. viridosporus* T7A. A) Aspecto del cultivo después de 400 hr de incubación con agitación en medio líquido. Aumento 780 x. B) Lignocelulosa de trigo incubada con la bacteria filamentosa en medio sòlido durante 8 semanas. Aumento 8200 x.

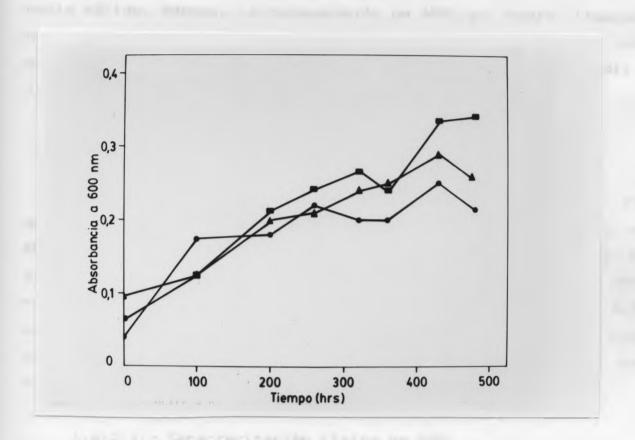


Figura 14: Producción de APPL en medio líquido. Se inoculó la lignocelulosa de trigo con S. viridosporas T7A y se incubó en presencia de O (ullet), O,3 (ullet) y O,6 % (ullet) de extracto de levadura. Se tomaron muestras los tiempos indicados, se precipitaron los APPL con àcido y se midió la turbidez del medio como densidad òptica a 600 nm.

Announce translation on the extension on according to Papers 15, sometimes from part (from the admitted on the latest test and little appropriate from the according to the papers and according to th se insistiò en profundizar màs estos estudios, puesto que està descrito que el rendimiento de APPL es menor que en cultivos en medio sòlido. Ademàs, la recuperación de APPL en medio líquido, que se efectúa por precipitación con àcido, produce una polimerización artefactual de la lignina (Crawford y cols., 1983).

1.6.2. - Producción en medio sólido.

Se prepararon series de cultivos de S. viridosporus T7A sobre lignocelulosa en botellas en la forma descrita en 2.3.3. de Materiales y Mètodos y se incubaron en un baño húmedo a 37°C. Al tèrmino de cada incubación se cosecharon y cuantificaron los APPL recuperados en la forma descrita en Materiales y Mètodos 2.3.4. Los tiempos de incubación variaron entre los O días y seis a ocho semanas. Se observó una conversión de lignocelulosa a APPL que fluctuó entre 3-5 % en todos los casos.

1.6.2.1. - Caracterización física de APPL.

Con el fin de analizar la heterogeneidad en la distribución de peso molecular de los componentes de los APPL, se emplearon dos criterios, a saber filtración en una columna Sephadex G-50 y cromatografía líquida de alta presión utilizando un columna Shodex Ion Pak S-804/S.

La columna Sephadex G-50 se calibrò como està descrito en la sección 5.1 de Materiales y Mètodos. De cada muestra de material liofilizado a sequedad se pesaron 5,0 mg, los cuales fueron disueltos en la solución de elución. La Figura 15 muestra los perfiles de elución obtenidos del anàlisis descrito. Todas las muestras presentan una distribución bimodal de peso molecular

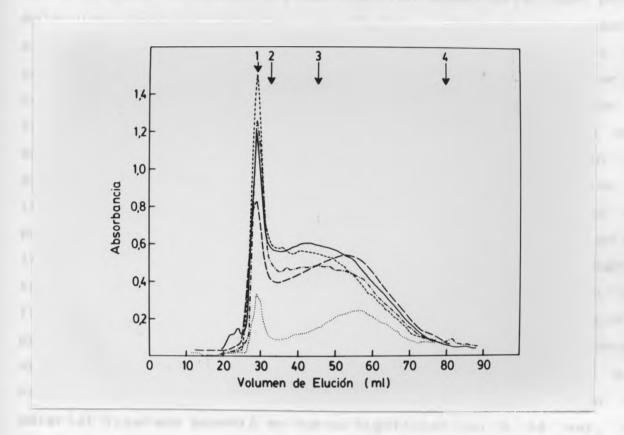


Figura 15: Cromatografía líquida a través de una columna Sephadex G-50 del polímero soluble (APPL) generado por acción de S. viridosporus T7A sobre lignocelulosa de trigo. Se cargaron 5,0 mg de cada muestra en la columna, las cuales fueron resuspendidas y eluidas con una solución de NaOH 0,1 N y LiCl 0,1 N. 2-8 semanas de incubación (—), 4 diás (---), 2 días (---), 0 días (---) y control sin inóculo incubado durante dos semanas (---). Las flechas indican los volúmenes de elución de 1) azul dextrano, 2) quimotripsinógeno A (PM=24 kD), 3) lisozima (PM=14 kD) y 4) àcido cumárico (PM=164 D).

con una fracción significativa excluida de peso molecular aparente mayor de 50.000 D y una fracción mayoritaria con pesos moleculares que varian entre los 20.000 y 1000 D. Se observa claramente que la solubilización de la lignocelulosa es un proceso ràpido, puesto que el perfil cromatogràfico de material proveniente de cultivos de ocho dias a 2 semanas de incubación es indistinguible de los APPL cosechados al tèrmino de seis o mas semanas de incubación. Es interesante notar que la fracción de mayor peso molecular (excluida de la columna) aparece también a los pocos dias de incubación y que el perfil de distribución de peso molecular de los APPL no sufre modificaciones detectables si la incubación se prolonga durante varias semanas. Se observa igualmente que una porción no despreciable de material es liberada al medio en el control sin incubación, lo que ocurre probablemente al esterilizar el cultivo en autoclave. Justamente, se detectò que al esterilizar al autoclave en condiciones màs rigurosas, es decir a 108°C en vez de 100°C. la cantidad de material liberada aumentò en forma significativa. A la vez, el control estèril incubado durante dos semanas presenta un perfil de elución cualitativamente comparable al control sin incubación y difiere del patròn de distribución de pesos moleculares de APPL liberados por acción bacteriana (Figura 15).

La columna Shodex Ion Pak utilizada en la cromatografía liquida de alta presión està diseñada específicamente para el anàlisis de polímeros solubles en agua. Se calibró la columna con una serie de estàndares comerciales de peso molecular conocido disponibles para este tipo de columna. Dichos estàndares son pululanos (polisacàridos complejos), que fueron filtrados en idènticas condiciones de corrida a las muestras, pero analizados mediante un detector de indice de refracción. Los perfiles de

elución obtenidos indicaron que los APPL colectados al término de 2-6 semanas de incubación presentan un pico mayoritario de peso molecular entre 5 y 20,000 D, además de una fracción pequeña de peso molecular muy alto, sobre 50,000 D (Figura 16).

1.6.2.2. - Anàlisis quimico de los APPL.

Se realizaron también anàlisis mediante resonancia magnètica nuclear de baja resolución de los APPL. Se encontraron señales fuertes para grupos hidroxilos indicativos de la presencia de carbohidratos y en comparación, señales muy débiles correspondientes a grupos aromàticos (datos no mostrados).

Dada la heterogeneidad de este complejo producto natural descrita ya por otros autores (Crawford y cols., 1983; McCarthy, 1987) y confirmada mediante los ensayos con NMR, se considerò necesario complementar su caracterización con el estudio quimico de sus componentes. Para ello se hizo un anàlisis cuali- y cuantitativo de los hidratos de carbono presentes en los APPL colectados a diferentes tiempos y se compararon con lignocelulosa de trigo de la cual derivan. El mètodo utilizado, el que involucra la formación de acetatos de alditoles, es el recomendado para el anàlisis de maderas y pulpas y permite cuantificar el contenido de cinco hidratos de carbono, a saber, arabinosa, xilosa, manosa, galactosa y glucosa (Ver sección 4.1. de Materiales y Mètodos). La ventaja de formar estos derivados de los hidratos de carbono consiste en que se obtiene un sòlo derivado por monosacàrido, puesto que al formar los alditoles se pierde la quiralidad del carbono anomèrico (Sloneker, 1972; Sawardeker y cols., 1965) y se evitan las isomerizaciones del anillo (Turner y Cherniak, 1981). Los acetatos de alditoles formados fueron cuantificados en la forma descrita en la sección

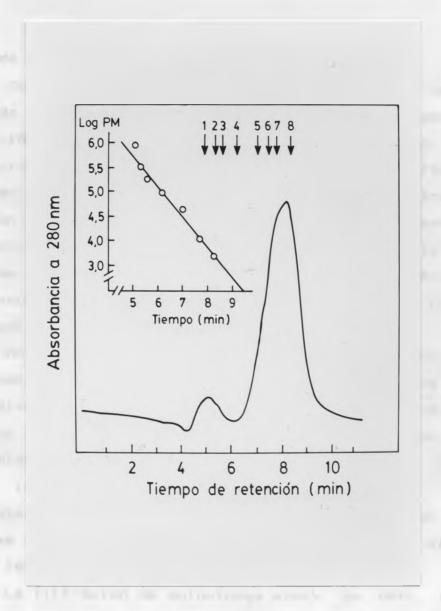


Figura 16: Cromatografia líquida de alta presión a través de una columna Shodex Ion Pak 804/S del polímero soluble (APPL) generado al incubar S. viridosporus T7A sobre lignocelulosa de trigo durante 2-6 semanas. La fase mòvil utilizada fue una solución acuosa de LiCl O,1 N y NaCl O,05 N a un flujo de 1 ml/min. La columna se calibrò con una serie de polisacàridos estàndares de peso molecular conocido. Los tiempos de retención y los pesos moleculares se indican mediante flechas: 1) 75,8x104 D,

^{2) 33,8×10&}lt;sup>4</sup> D, 3) 19,4×10⁴ D, 4) 9,54×10⁴ D, 5) 4,67×10⁴ D,

^{6) 2,08×104} D, 7) 1,2 ×104 D y 8) 0,53×104 D.

4.1.3. de Materiales y Mètodos.

Como se muestra en la Figura 17, se observò que a tiempos cortos de incubación (0-8 días), se producen cambios en la composición de hidratos de carbono, tales como una disminución importante de glucosa y un aumento de manosa y galactosa. Además, desde períodos de incubación de un día las muestras de APPL contienen un azúcar adicional, el cual lamentablemente no pudo ser identificado ni cuantificado (ver Discusión). Los datos obtenidos sugieren que los APPL se enriquecen en hemicelulosas en el transcurso de su solubilización y que disminuye relativamente su contenido de celulosa y/o de \$-glucanos.

Anàlisis de diferentes preparaciones de APPL indicaron que se detectan cambios por factores abiòticos en los porcentajes de los diversos azùcares: por efecto de filtración de los APPL a travès de membranas de 45 µ de diàmetro se observaron variaciones principalmente en los niveles de arabinosa, xilosa y galactosa (Figura 18). Asimismo, se encontraron pequeñas variaciones adicionales en la composición glucídica al incubar soluciones filtradas y estèriles de APPL (2,5 mg/ml) durante 5 días a 30°C (Figura 18).

La filtración de soluciones stock de APPL (5 mg/ml) a travès de membranas modifica también la distribución de pesos moleculares de este polímero. Como se muestra en la Figura 19, parte de los complejos de mayor peso molecular quedan retenidos en la membrana. Este resultado sugiere que los APPL serían heterogêneos no sólo en cuanto a su tamaño, sino también en su composición de hidratos de carbono.

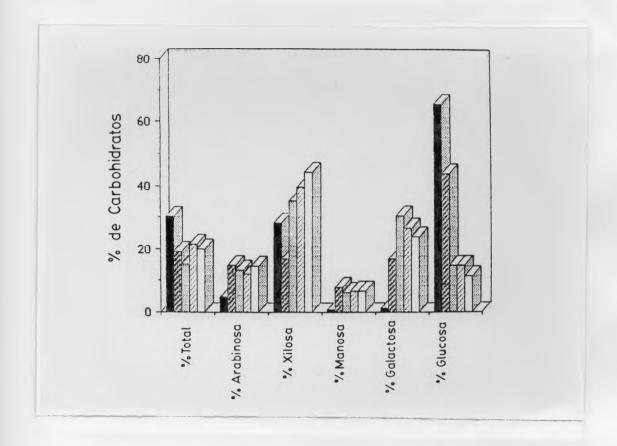


Figura 17: Anàlisis de carbohidratos en el curso temporal de formación de APPL por acción de S. viridosporus T7A sobre lignocelulosa de trigo. El 100 % se refiere al contenido total de azúcares de cada muestra. El porcentaje de azúcares totales està referido al peso total de la muestra. Se determinó el contenido de arabinosa, xilosa, manosa, galactosa y glucosa de lignocelulosa (\blacksquare) y de APPL cosechados luego de una incubación de O días (\boxtimes), 4 días (\boxtimes), 8 días (\boxtimes) y 2-6 semanas de incubación (\square).

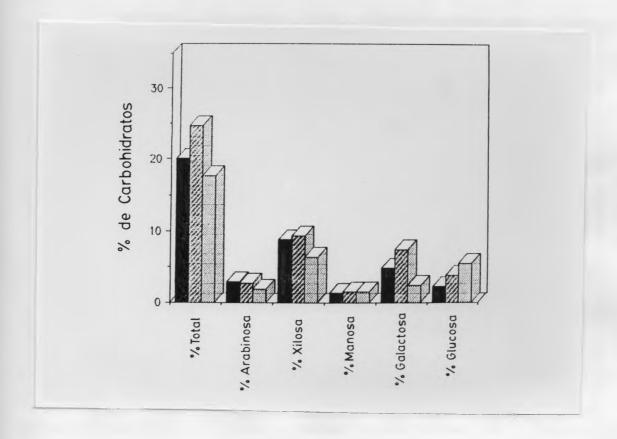


Figura 18: Efecto de filtración e incubación sobre la composición glucidica de APPL. El 100 % se refiere al peso total de la muestra. (\blacksquare): APPL cosechados a las dos semanas de incubación de S. viridosporus T7A sobre lignocelulosa de trigo; (\boxtimes): la misma muestra filtrada a travès de membranas de 45 μ de diàmetro; (\blacksquare): APPL filtrados y posteriormente incubados en forma estèril durante 4 días a 30°C con agitación.

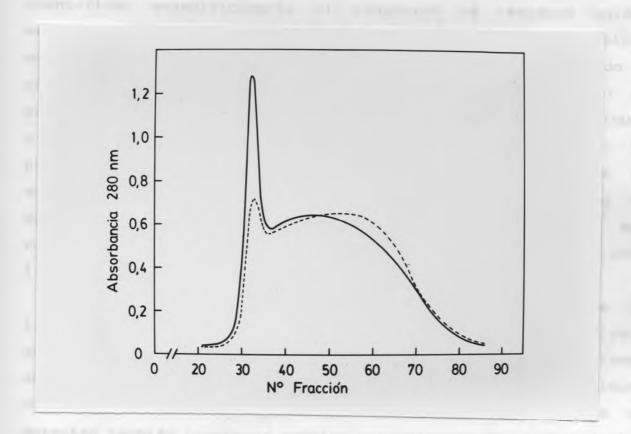


Figura 19: Efecto de la filtración a través de membranas de $45~\mu$ de diàmetro sobre el peso molecular de los AFPL. Perfiles de elución a través de una columna Sephadex 6-50 de una solución 5~mg/ml de APPL no filtrada (---) y una solución filtrada a través de membranas de $45~\mu$ de diàmetro (---). En ambos casos se utilizaron APPL obtenidos después de una incubación de dos semanas de 8.~viridosporus T7A sobre lignocelulosa de trigo.

Se estudió también la porción aromàtica de los APPL mediante la novedosa tècnica de la tioacidólisis, que permite cuantificar específicamente el contenido de residuos unidos mediante enlaces arilglicerol-\(\theta\)-arilèter (\(\theta\)-0-4) de la muestra, es decir, la fracción no condensada de la lignina (Rolando y cols., 1989; Lapierre y Monties, 1986). Mediante este mètodo es posible determinar las razones encontradas entre residuos p-hidroxifenilos (H), guaiacilos (G) y siringilos (S) de la porción no condensada, permitiendo obtener una visión de la estructura de la muestra de lignina analizada. Como ya se mencionó en la Introducción, estos tres tipos de residuos son característicos de la lignina presente en tejidos vegetales poco lignificados, como es la lignocelulosa de trigo.

Los cromatogramas obtenidos del anàlisis de muestras de lignocelulosa de paja de trigo y de APPL mediante tioacidòlisis se muestran en la Figura 20. Se observa que en las condiciones empleadas se separan los isòmeros eritro y treo de los residuos H, G y S. El perfil de las muestras es complejo, porque se detectan también numerosas señales provenientes de carbohidratos presentes tanto en la lignocelulosa como en los APPL. Los anàlisis se realizaron en triplicado y se cuantificò el contenido de los tres residuos de ambas muestras (Tabla 2). Se observa una disminución en el contenido de los residuos guaiacílicos, lo que se traduce en un cambio significativo en la razón de residuos S y G. Como dato ilustrativo se incluyen los valores obtenidos por otros autores para distintos tipos de lignina mediante el anàlisis de tioacidolisis (Tabla 3).

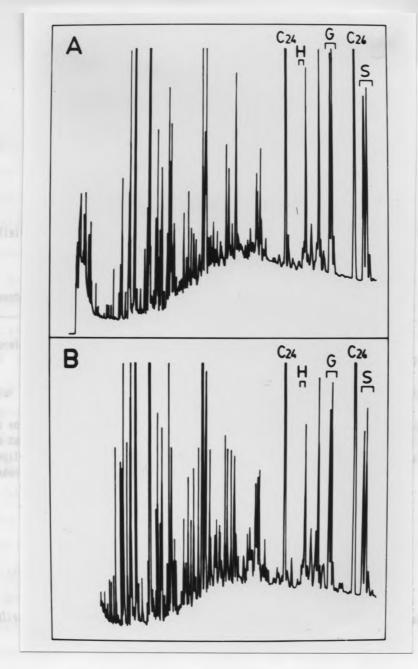


Figura 20: Perfiles de cromatografla de fase gaseosa de muestras de APPL sometidas a tioacidòlisis. A) lignocelulosa de trigo; B)

-PPL de 2 semanas de incubación. H = p-hidroxifenilo,

5 = isòmeros eritro y treo de guaiacilo, S = isòmeros eritro y treo de siringilo. C24 y C26 son estàndares internos.

I was region. The marks in C. Landert Landson by the control

Tabla N°2.

Anàlisis por ticacidòlisis de residuos aromàticos de lignocelulosa de trigo y APPL.

Muestra	Η %	6 %	S %	\$/6
Lignocelulosa APPL	0,13 (0,015) 0,14 (0,005)	1,77 (0,140) 1,44 (0,015)	1,66 (0,130) 1,58 (0,035)	0,94 (0,00) 1,097 (0,01)
valor de p	N.S.	p<0,02	n.s.	p<0,001

Los resultados se expresan como porcentaje sobre el peso total de la muestra (p/p). Se hicieron tres seterminaciones para cada muestra. Las desviaciones estàndar se indican entre parèntesis. H = p~hidroxifenilo; 6 = maiacilo; S = siringilo. Los valores de p fueron obtenidos al comparar los datos para lignocelulosa con los de APPL según el test de Student. n.s. = no significativo.

Tabla Nº3.

Anàlisis por tioacidòlisis de residuos aromàticos de diversas especies vegetales.

Muestra	H %	6 %	S %	\$/6
Alamo (madera angiosperma) pino (madera gimnosperma)	0.74	4,60	7,39	1,61
× lignoceluosa de arroz lignocelulosa de centeno	0,24 0,37 0,17	10,64 1,23 4,06	1,17 4,77	0,95
lignocelulosa de trigo	0,21	2,89	2,93	1,17 1,01

Todos los valores se expresan en porcentaje por g de muestra extraída. H = p-hidroxifenilo; 6 = guaracilo; S = siringilo. Datos tomados de C. Lapierre (comunicación personal).

En las muestras de APPL se encontrò también un contenido importante de àcido ferúlico, que se identificò mediante GC/MS (Figura 21). La presencia de este àcido no fue evidente en la lignocelulosa original. Esta observación es interesante, puesto que en pastos se encuentran àcidos fenòlicos como el àcido cumàrico y el àcido ferúlico unidos mediante enlaces èster y èter a grupos hidroxilos de las hemicelulosas (Higuchi, 1985; Scalbert y cols., 1985). Anàlisis de los APPL mediante el mètodo de Kjehldahl indicaron ademàs que èstos contienen alrededor de un 2,0 % de nitrògeno, porcentaje que es muy similar al encontrado en la lignocelulosa de trigo (2,03 %)

En resumen, de los resultados obtenidos se desprende que los APPL difieren en su estructura de la lignocelulosa que los origina. Los cambios mayoritarios en la porción glucídica ocurren durante la primera semana de incubación, y posteriormente sufren sólo variaciones mínimas difíciles de detectar. Las modificaciones en los componentes aromàticos, detectables mediante el anàlisis empleado, consisten principalmente en una disminución de los residuos guaiacílicos. Este resultado es indicativo de un cambio en la estructura de los APPL con respecto al sustrato inicial, reflejado en un incremento significativo de la razón S/6.

And the second control of the second second

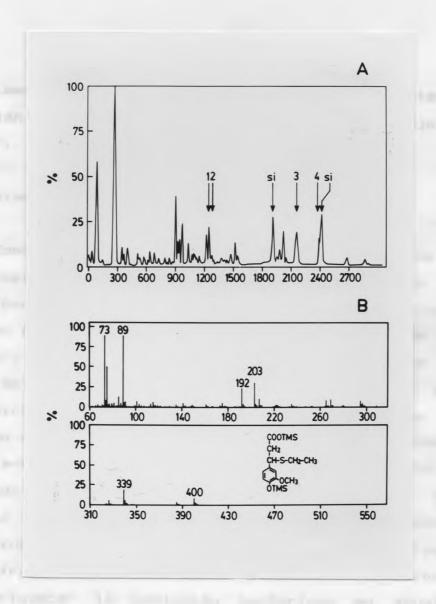


Figura 21: Evidencia de la presencia de àcido ferûlico en muestras de APPL mediante cromatografía de fase gaseosa acoplada a espectrometría de masas. A) Cromatograma de APPL en que se indica el pico correspondiente a àcido ferûlico (1), residuos guaiacilo modificados C_2C_4 (2) (Ver Discusión), residuos guaiacilo (3) y residuos siringilo (4). s.i.: estàndar interno (C_{24} y C_{24}). B) Espectro de masas del derivado trimetilsililado de àcido ferûlico.

2.- Aislamiento y caracterización de cepas bacterianas que metabolizan compuestos modelo de lignina de bajo de peso molecular.

2.1.- Aislamiento y caracterización metabólica.

Como se ha indicado anteriormente, uno de los objetivos de esta tesis consiste en el estudio de la capacidad metabólica de cepas bacterianas naturales no filamentosas. Inicialmente se escogieron sustratos aromáticos sencillos derivados de ácidos benzoicos y fenilpropanoicos, como única fuente de carbono y energia. Se aislaron diversas cepas de suelos y maderas en descomposición de localidades del centro y sur de Chile. Se prepararon cultivos con un medio salino minimo denominado "Ksal" (Salkinoja-Salonen y cols., 1979) y un compuesto aromàtico relacionado con lignina como única fuente de carbono y energia, los cuales fueron inoculados con cada una de estas muestras. Los cultivos fueron incubados a 30°C con agitación y traspasados a cultivos frescos que contenian la misma fuente de carbono con el fin de enriquecer la población bacteriana en aquellas cepas capaces de metabolizar estos compuestos. Al cabo de tres o más traspasos se sembraron los cultivos diluidos en placas con medio de cultivo Luria. De las placas se seleccionaron colonias aisladas, las cuales fueron nuevamente cultivadas en el medio salino con el sustrato aromàtico apropiado como única fuente de carbono. De este modo se seleccionaron alrededor de cincuenta cepas bacterianas distintas, las cuales fueron caracterizadas en cuanto a su capacidad de metabolizar compuestos modelo de lignina distintos al empleado en su aislamiento inicial.

Como fuente de carbono se utilizaron compuestos simples

de un anillo aromàtico, tales como los àcidos vaníllico (VI) y cumàrico (XIII) que son àcidos benzoicos sustituídos, ya sea en forma individual o mezclas de ellos. También se utilizaron las fracciones de lignina kraft FSE y FIE como fuente de carbono en los cultivos de enriquecimiento para la selección inicial de cepas bacterianas. La versatilidad metabòlica de las cepas aisladas se ensayò evaluando su crecimiento en todas los compuestos aromáticos pertinentes, tales como diversos ácidos benzoicos y àcidos fenilpropanoicos y las fracciones purificadas de lignina kraft. En la Tabla 4 se resumen las propiedades metabòlicas de algunas de las cepas seleccionadas. Es interesante resaltar que las características del sustrato inciden en el número de cepas diferentes que se pueden aislar y la versatilidad metabòlica que poseen. Se observò también que algunos àcidos benzoicos, tales como el àcido vanillico (VI) y el àcido protocatecuico (IV), son metabolizados por pràcticamente la totalidad de las cepas aisladas, en cambio otros, como el àcido siringico (XI) y los àcidos fenilpropanoicos como el àcido cinàmico (XII) son metabolizados por algunas cepas solamente. Además, las cepas aisladas en ácido vaníllico o cumárico sólo son capaces de metabolizar determinados àcidos benzoicos y fenilpropanoicos y no crecen en los compuestos modelo dimèricos de lignina. Por otra parte, aquellas escasas cepas aisladas en anisoina y dimeros 6-0-4 son capaces de metabolizar una gran variedad de compuestos aromàticos (Gonzâlez y cols., 1986).

Se llevò a cabo una clasificación preliminar de las cepas mostradas en la Tabla 4. Todas ellas resultaron ser Gram negativas, presentaron heterogeneidad morfològica y utilizaron citrato en condiciones aeròbicas. Ademàs, todas excepto la cepa Sio, presentaban un alto grado de motilidad, eran fluorescentes,

Tabla N°4.

Versatilidad metabôlica de cepas aisladas en compuestos modelo de lignina.

Сера	selecc.			mond	merc	15				1.kr	aft		dia	eros	
	inicial	Va	Cu	Fe	Ci	Si	Ca	Pr	Bz	FSE	FIE	XXX	XXXI	XXI	XIX
A10	Va/Cu	+	+	+		-	+	+	+	+	-	-	-		
A6	Va/Cu	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
C2	Va/Cu	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	191	-	-	
M5	Va/Cu	+	+	+	-	+	+	+	+	4	-	-	-		-
510	Va/Cu	+	+	+	-	-	+	+	+		-	-		-	-
14FA	FIE	+	+	-	4	nd	-	+	+	4	+	-	nd	nd	nd
135	FSE	+	+	+	-	-	+	+	+	+		-	nd	nd	nd

Se determino el crecimiento de las cepas midiendo la densidad òptica a 600 nm despuès de tres días de incubación a 30°C con agitación continua. Va = àcido vanillico (VI); Cu = àcido cumàrico (XIII); Fe = àcido feròlico (YV); Ci = àcido cinàmico (XII); Si = àcido siringico (XI); Ca = àcido cafeico (XIV); Pr = àcido protocatecuico (IV); Tr = àcido benzoico; FSE = fracción soluble de lignina kraft; FIE = fracción insoluble de lignina kraft; l.kraft = lignina kraft; nd = no determinado.

oxidasa positiva, no fermentativas y poselan càpsula. El conjunto de estas propiedades indica claramente que estas cepas pertenecen a las *Pseudomonaceae*, a excepción de la cepa S10, la cual se clasificò en el grupo de bacterias *Pseudomonas similar*.

2.2.- Bùsqueda de plasmidios degradativos.

Como ya se señalò anteriormente, una gran variedad de sustancias xenobiòticas y naturales son degradadas por bacterias, muchas de las cuales pertenecen a la amplia familia de las *Pseudomonas*. Los genes de las enzimas involucradas en la metabolización de numerosos compuestos aromàticos se encuentran localizados en DNA extracromosomal, como por ejemplo, los plasmidios TOL, SAL y NAH. En base a estos antecedentes, planteamos la hipòtesis que la metabolización de compuestos utilizados como modelos monomèricos de lignina pudiera estar también codificada en plasmidios degradativos o catabólicos.

Al iniciarse este trabajo no existian evidencias experimentales de la participación de plasmidios catabólicos en la degradación de compuestos modelo de lignina. Los únicos trabajos publicados en relación a este tema proponían la existencia de plasmidios degradativos para explicar la inestabilidad metabólica de las cepas en estudio (Salkinoja-Salonen y cols., 1979; Salkinoja-Salonen y Sundman, 1981). Lamentablemente, los autores no verificaron la presencia o ausencia de plasmidios en ellas.

En una primera etapa se determinò la presencia de plasmidios en las cepas bacterianas descritas en la sección 2.1. de Resultados mediante el mètodo de Kado (Kado y Liu, 1981). Se detectò la presencia de plasmidios en aproximadamente un 20 % de

las cepas en estudio. En la mayoria de estos casos se encontrò un sòlo plasmidio por cepa, aunque se detectaron también algunas con dos elementos extracromosomales. En la Figura 22 se muestran los plasmidios de diversas cepas bacterianas naturales separados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8 %.

Con el fin de determinar si estos elementos extracromosomales están involucrados o no en la metabolización de los compuestos en estudio, se abordó el problema desde dos enfoques complementarios, es decir mediante la curación o eliminación del plasmidio y mediante su conjugación a una bacteria hospedera apropiada.

2.2.1. - Ensayos de curación.

Para lograr la eliminación del (los) plasmidio(s) en su huesped natural, algunas cepas escogidas de bacterias no filamentosas fueron sometidas a la acción de diversos agentes y condiciones descritas como agentes curantes. Se hicieron ensayos utilizando bromuro de etidio (Bouanchaud y cols., 1969), mitomicina C (Chakrabarty, 1972), novobiocina (Wolfson y cols., 1983), dipiridilamina (Vicuña y cols., 1988) y temperaturas de cultivo elevadas (Hughes y cols., 1984). Las concentraciones minimas inhibitorias fueron diferentes para cada reactivo y cada cepa. El protocolo utilizado està descrito en la sección 6.3. de Materiales y Mètodos.

Los cultivos incubados con el agente curante en estudio fueron sembrados en diluciones apropiadas sobre placas de agar con medio rico y medio selectivo que contenía un compuesto modelo de lignina como única fuente de carbono. Se encontró que aproximadamente un 1 % de las colonias era capaz de desarrollarse

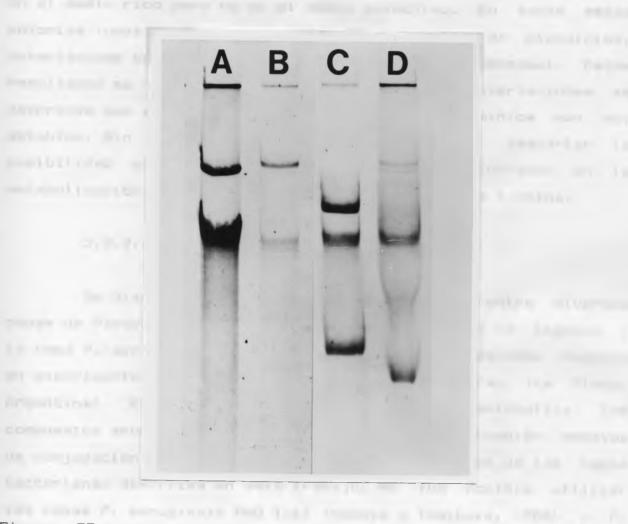


Figura 22: Electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % de plasmidios de diferentes cepas. A) Plasmidio p \mathbb{R}_2 de SalmoneIlatyphi (PM=62 MD), B) plasmidio de la cepa \mathbb{C}_2 , C) plasmidios de la cepa \mathbb{A}_1 0 y D) plasmidios de la cepa \mathbb{S}_1 0.

The control of the control of the property of the control of the c

en el medio rico pero no en el medio selectivo. En todas estas colonias (unas 200) se analizò la presencia de plasmidios, detectàndose en todas ellas el elemento extracromosomal. Estos resultados se resumen en la Tabla 5. De estas observaciones se desprende que al menos en estas cepas, los plasmidios son muy estables. Sin embargo, no permiten afirmar ni descartar la posibilidad que dichos plasmidios estèn involucrados en la metabolización de compuestos modelo monomèricos de lignina.

2.2.2.- Ensayos de conjugación.

Se diseñaron experimentos de conjugación entre diversas cepas de *Pseudomonas* aisladas en compuestos modelo de lignina y la cepa P. aeruginosa 2A, la cual ha sido utilizada como huesped en experimentos de conjugación por el Dr. O. Grau (La Plata, Argentina). Esta bacteria, por cierto, no metaboliza compuestos aromàticos en cuestión. Se realizaron también ensayos de conjugación utilizando como receptoras a algunas de las cepas bacterianas descritas en este trabajo. No fue posible utilizar las cepas P. aeruginosa PAO 1161 (Hosoya y Tomikuza, 1984) y P. putida 2440 (Franklin y cols., 1981), desarrolladas especificamente para conjugaciones, puesto que eran capaces de crecer en pràcticamente todos los compuestos aromàticos monomèricos en estudio. A pesar de que se ensayaron diversas cepas dadoras y receptoras, ademàs de algunas variantes del protocolo indicado en la sección 6.4. de Materiales y Métodos, no fue posible obtener colonias conjugantes. Los experimentos realizados se resumen en la Tabla 6. Cabe señalar experimentos controles de conjugación con £. coli resultaron positivos, así como el traspaso del plasmidio NAF de la cepa

Tabla Nº5.

Resumen de ensayos de eliminación de plasmidios (curación).

Сера	agente c curante	concentración	medio selectivo	# colonias plaqueadas

A10	mitomicina C	3,5 mg/ml	Cu, Fe, Va	1350
	temperatura	44 °C	Cu, Va	200
	dipiridilamina	500 µg/ml	Cu, Va	300
	bromuro de etidio	450 µg/ml	Cu	200
A6	mitomicina C	5-15 µg/ml	Cu	670
C2	mitomicina C	10-50 µg/ml	Ci, Fe, Va	1550
	novobiocina	10 µg/ml	Ci	50
	temperatura	44 °C	Ci, Va	200
	dipiridilamina	50 µg/ml	Ci, Cu	200
	bromuro de etidio	350 µg/m1	Cu	200
S10	mitomicina C	30-80 µg/ml	Cu, Fe, Va	2200
	novobiocina	1,5-3 µg/ml	Cu	500
	temperatura	44 °C	Va	100
	dipiridilamina	250 μg/ml	Cu, Va	200

Se cultivaron las diferentes cepas en medio Luria 1 x suplementado con el agente curante indicado y luego se sembraron diluciones del cultivo en placas con medio rico (Luria 1 x) y en placas selectivas que contenían el sustrato aromàtico a una concentración final de 5 mM. Ci = àcido cinàmico (XII); Cu = àcido cumàrico (XIII); Fe = àcido feròlico (XV); Va = àcido vanillico (VI).

Tabla Nº6.

Resumen de ensayos de conjugación realizados con cepas aisladas en compuestos aromáticos simples.

Cepa	Cepa	Medio	D.O.600ns	Razòn	t(h)	T(*C)
dadora	receptora	selectivo	dadora:receptora	dadora:receptora	incubación	
\$10 \$10 C2 C2 A10 14FA 2CH 13S	Ps. 2A 3A Ps. 2A A6 Ps. 2A Ps2A Ps2A Ps2A	Kan/Cu Kan/Cu, Kan/Fe Nov/Ci Kan/Cu, Kan/Fe Nov/Cu Kan/Cu, Kan/Fe Kan/Cu, Kan/Fe	0,8:0,8 1,0:1,0 0,6:0,6 0,9:0,9 0,6:0,6 0,7:0,7 0,8:0,8 0,8:0,8	9:1, 1:1, 1:9 9:1, 1:1, 1:9 9:1, 1:1, 1:9 1:1 9:1, 1:1, 1:9 9:1, 1:1, 1:9 9:1, 1:1, 1:9	1, 5, 8 1, 4, 20 4, 18 5 4 4	22, 30, 37 25 25 25, 30 25 25 25 25

Se prepararon cultivos en medio Luria 1 x, se mezclaron en las proporciones y condiciones experimentales indicadas en la tabla. Posteriormente se sembraron sobre placas que contenian el medio selectivo con una concentración apropiada del antibiótico y el sustrato aromático a una concentración final de 5 mM. Nal = àcido nalidixico; Kan = kanamicina; Tet = tetraciclina; Nov = novobiocina; Pr = àcido protocatecuico (IV); Bz = àcido benzoico; Ci = àcido cinàmico (XII); Cu = àcido cumàrico (XIII); Fe = àcido ferùlico (XV); t = tiempo; h = horas; T = temperatura; inc. = incubación.

Pseudomonas Ex a 2A (datos no mostrados).

En general, los resultados obtenidos muestran que se logrò aislar y caracterizar un conjunto de cepas interesantes en cuanto a su versatilidad metabòlica para degradar compuestos aromàticos simples relacionados con lignina. No se logrò demostrar, sin embargo, si los plasmidios están o no involucrados en la degradación de dichos compuestos (Vicuña y cols., 1988).

3.- Aislamiento y caracterización de cepas que crecen en APPL.

Otra de las preguntas planteadas en esta tesis fue si existen bacterias no filamentosas capaces de metabolizar los APPL, ya que èstos parecen ser productos metabòlicos terminales los actinomicetes (McCarthy y Broda, 1984). Otros investigadores determinaron que P. chrysosporium y otras especies de Streptomyces no modifican mayormente los APPL generados por S. viridosporus T7A (Pometto y Crawford, 1986). El trabajo indicado adolece de algunas fallas, puesto que examina los productos solubles de bajo peso molecular encontrados en el medio de cultivo luego de incubar los APPL en presencia de los diversos microorganismos y no el sustrato polimèrico mismo. Sin embargo, los resultados tienden a indicar que son microorganismos de otro tipo los que se encargan de degradar este producto ligninoso natural. Como se indicò en la Introducción, nos interesò iniciar una bùsqueda de bacterias que consumen APPL con el fin de investigar si existe una acciòn integrada de diferentes clases de microorganismos en la metabolización de compuestos polimèricos naturales ricos en lignina.

En una primera etapa se ensayò la capacidad de metabolizar APPL de las bacterias no filamentosas descritas en el capitulo anterior. Se encontrò que ninguna de las cepas aisladas en compuestos modelo de lignina se desarrollaba bien en un medio de cultivo que contenía a este sustrato como única fuente de carbono (D.O. a 600 nm menor de 0,1).

Se procedió entonces a aislar nuevas cepas bacterianas en un medio de cultivo que contenia 2,5 mg/ml de APPL como única fuente de carbono y energia. Como fuente de bacterias se utilizaron muestras de maderas en descomposición, efluentes de la industria de la celulosa y también de suelos que presentaran un fuerte aroma característico a tierra húmeda. La razón para elegir este último tipo de muestras se debe a que este aroma, principalmente debido a geosmina, es producido por diversas especies de *Streptomyces* del suelo (Goodfellow y Williams, 1983). La intencion era precisamente buscar cepas bacterianas no filamentosas que compartieran su hábitat con actinomicetes, es decir, con cepas productoras de compuestos del tipo de los APPL.

Los cultivos inoculados con estas muestras fueron incubados a 30°C con agitación y traspasados a cultivos que contenian también 2,5 mg/ml de APPL como única fuente de carbono, con el fin de enriquecer el cultivo en aquellas poblaciones capaces de crecer en APPL. A1 iqual que el aislamiento de las cepas descritas en el capitulo 2, al cabo 2-3 traspasos se sembraron los cultivos en placas con medio Luria y se inocularon cultivos frescos con colonias aisladas. De modo se probò el crecimiento de alrededor de 80 colonias en APPL procedentes de distintas fuentes. Se determinò la densidad òptica a 600 nm alcanzada por estos cultivos, se seleccionaron aquellos que presentaban un mayor desarrollo en las condiciones descritas y se estudiaron en mayor profundidad. Las cepas escogidas fueron las denominadas B23, E21 y V12, que alcanzaron una densidad òptica a 600 nm entre 0,25 y 0,55 al cabo de dos días de incubación. Cabe hacer notar que V12 corresponde a una asociación de dos cepas que hemos denominado V1 y V2, que en conjunto presentan un crecimiento en APPL que supera la suma de las densidades òpticas de ambas cepas cultivadas por separado en un medio con APPL como única fuente de carbono. Se hicieron también mezclas binarias entre algunas de las otras cepas que presentaban un crecimiento significativo en APPL. Sin embargo, en todos estos casos los cultivos mixtos alcanzaban una densidad òptica inferior a la suma de las densidades alcanzadas por las mismas cepas en forma aislada.

3.1.- Identificación y caracterización de tres cultivos seleccionados.

Se realizaron pruebas de identificación de las cepas B₂₃ y E₂₁ y de los componentes del consorcio V₁₂ a nivel de gènero, siendo los criterios fundamentales aquellos enumerados en la sección 1.1.3. de Materiales y Mètodos. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 7 y permitieron concluir que las cepas B₂₃, E₂₁ y V₂ pertenecen al gènero *Pseudomonas*, mientras que la cepa V₁ es un *Enterobacter*. La morfología y los flagelos visualizados mediante tinción negativa al microscopio electrónico de transmisión fueron herramientas fundamentales para la identificación de las cepas (Figura 23).

Se hicieron curvas de crecimiento en APPL de las cepas B₂₃, E₂₁ y del consorcio V₁₂. Como se observa en la Figura 24, los tres cultivos alcanzan el estado estacionario a más tardar a

Tabla Nº7.

Identificación de cepas seleccionadas.

Сера	B23	E21	V1	V2
tinción de Gram motilidad flagelo test glucosa O-F oxidasa pigmento amarillo	- + polar no fermentativa + +	- + polar no fermentativa + +	- perîtrica fermentativa -	- (-) (lateral) no fermentativa + +
gènero asignado	Pseudomonas	Pseudomonas	Enterobacter	Pseudomonas

En esta tabla se resumen las pruebas que se consideraron criterios fundamentales de identificación. Se hicieron numerosas pruebas adicionales tales como metabolización y fermentación de azúcares y determinación de patrón de proteínas de membrana externa.

Figure 251. The respect to the first larger are sent to be full area one

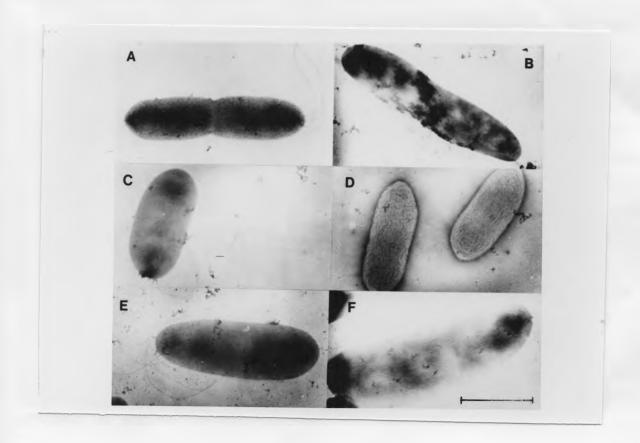


Figura 23: Microscopla electrònica de cepas bacterianas que crecen en APPL. A) *Pseudomonas* B23, B) *Pseudomonas* E21, C) *Enterobacter* V1, D) *Pseudomonas* V2, E) *Pseudomonas* fluorescens Biovar I A1 y F) *Pseudomonas* acidovorans D3.

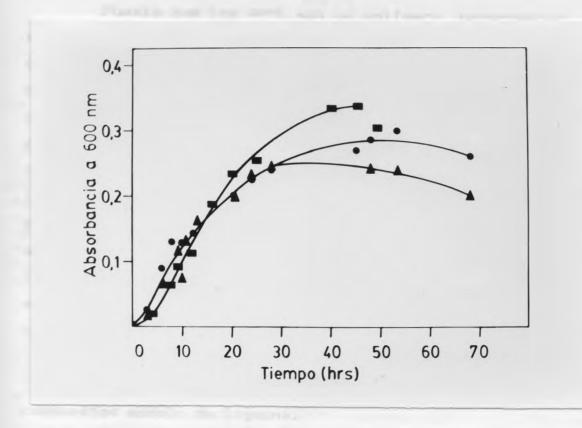


Figura 24: Curvas de crecimiento en APPL de cultivos seleccionados. (♠) Pseudomonas B≥3, (●) Pseudomonas E≥1 y (■) consorcio V12. Los medios de cultivo contenian Ksal y 2,5 mg/ml de APPL y fueron incubados con agitación a 30°C. Se retiraron alicuotas de 1 ml a distintos tiempos de incubación y se determinò su densidad òptica a 600 nm.

las 50 hrs de incubación, observândose luego una disminución gradual de la densidad óptica de cada cultivo.

Puesto que los APPL son un polimero heterogêneo formado por una porción aromàtica y una fracción glucídica, se hizo una caracterización somera de la versatilidad metabólica de estas cepas con el fin de determinar su capacidad de metabolizar compuestos modelo de lignina e hidratos de carbono. Con fines comparativos se incluyeron en estos estudios las *P. acidovorans* Ds y *P. fluorescens* Biovar I A1, que fueron aisladas en nuestro laboratorio. Se eligieron estas cepas debido a su capacidad de metabolizar compuestos modelo de lignina dimèricos. La *P. acidovorans* Ds degrada el dimero \$\theta -0 - 4\$ fenòlico XXXX y no fenòlico XXXI. *P. fluorescens* Biovar I A1 es capaz de romper la anisoina (XIX) y degradar también el compuesto XXX (Gonzàlez y cols., 1986).

3.1.1.- Acción de los cultivos seleccionados sobre compuestos modelo de lignina.

Se encontrò que todas las cepas, excepto una, son capaces de metabolizar diversos compuestos aromàticos simples. Los àcidos vanillico (VI), cumàrico (XIII) y protocatecuico (IV) fueron utilizados por la mayoria de las cepas como fuentes de carbono. Al igual que las cepas descritas en el capitulo 2 de Resultados, sòlo algunas metabolizaron los àcidos cinàmico (XII), siringico (XI) y cafeico (XIV) (Tabla 8). Ninguna cepa aislada en APPL fue capaz de crecer en compuestos modelo dimèricos de lignina, aún cuando las incubaciones se prolongaron durante 10 ò màs dias. Los dimeros ensayados fueron anisoina (XIX), HMDA (XXI), 4,4°-bifenol (XXXV) y VGGEox (XXXI) (Tabla 8).

Tabla Nº8.

Crecimiento en compuestos modelo de lignina de cepas seleccionadas en APPL.

Cepa selección DO 600 nm						monômeros							dimeros			
		inicial	en APPL	Va	Cu	Fe	Ci	Hb	Si	Ca	Pr	Anis	HMDA	bif.	V66Eox	

Pseudomonas	B23	APPL	0,25	+	+	+	+	+		+	+	-	2		210	
Pseudomonas	E21	APPL	0,37	+	+	+	+	+	-	_	+	_	-		-	
Enterobacter	V1	APPL	0,13	-	-	-	_	-	-	-	+	-	-	-	_	
Pseudomonas	V2	APPL	0,34	+	+	-11	_	+	-	+	+	11	- 1	_	-	
Cult. mixto	V12	APPL	0,55	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	
P.flourescens	AI	Anis.	0,10	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	
P.acidovorans	D3	666Eox	0,09	+	+	+	-	+	+	÷	+	-	-	nd	+	

Se indica la densidad òptica alcanzada por los cultivos a los dos días de incubación en APPL. Se determinó el crecimiento de las cepas por densidad òptica a 600 nm después de una incubación a 30°C con agitación durante tres días para los cultivos con monòmeros y diez días para aquellos con dímeros. Los monòmeros se ensayaron a una concentración final de 5 mM en el medio de cultivo. La concentración final de sustratos diméricos en el medio fue de 1 mg/ml. Bz = àcido benzoico; Ca = àcido cafeico (XIV); Ci = àcido cinàmico (XII); Cu = àcido cumárico (XIII); Fe = àcido ferálico (XV); Hb = àcido p-hidroxibenzoico (III); Pr = àcido protocatecuico (IV); Si = àcido siringico (XI); Va = àcido vaníllico (VI); Anis = anisolna (XIX); HMDA = hidroximetil desoxianisolna (XXI); bif. = 4,4° bifenilo (XXXV); V66Eox = dimero veratrílico oxidado (XXXI); 666Eox = dimero guaracilico oxidado (XXX).

Collinson on the standard collinson of the s

DECEMBER OF STATE OF THE PARTY OF THE PARTY

When his car has remaining any analysis and environ, we prove

3.1.2.- Acción de los cultivos seleccionados sobre hidratos de carbono.

Todas las cepas aisladas en AFPL con la excepción de una, crecieron en diversos monosacáridos. Se observó que la mayoría de las cepas metabolizaron diversas hexosas y pentosas, siendo la ribosa consumida por algunas cepas solamente (Tabla 9). Con el objeto de examinar la posibilidad que las cepas aisladas crecieran principalmente a expensas de la porción glucídica de los AFPL, se investigó su capacidad de metabolizar diversas preparaciones de celulosas y hemicelulosas, lo cual constituye un modo indirecto de abordar el problema.

Se eligieron tres preparaciones de celulosas, a saber, celulosa microcristalina, hidroxietilcelulosa y celulosa pura algodòn. Estos tres sustratos difieren en Su solubilidad, siendo la hidroxietilcelulosa soluble y la de algodòn insoluble en soluciones acuosas. Se incubaron matraces con medio minimo de cultivo "Ksal" que contenía una concentración final de 0,5 % de la celulosa a ensayar (en el caso de la celulosa de algodòn se preparò una suspensiòn al 0,3 %) y se inocularon con las diversas cepas bacterianas que se hablan cultivado en un medio con APPL. Los cultivos se incubaron con agitaci<mark>òn a 30°C durante 10 días y se determinaron los azúcares</mark> reductores presentes al tèrmino de 0, 3 y 10 dias de incubación. En este periodo de incubación no se produjo un cambio significativo de los valores encontrados con respecto al control sin inòculo y tampoco se observò turbidez debido a crecimiento bacteriano. Esta observación se repitió para los tres sustratos y todas las cepas ensayadas (Tabla 9).

A la luz de los resultados negativos obtenidos, se pensò

Tabla N°9.

Crecimiento en hidratos de carbono de cepas seleccionadas en APPL.

Сера		selección	DO 600 n	monosacăridos								celulosas		
		inicial	en APPL	glu	gal	man	xil	mal	rib	fru	ara	HEC	MCC	AL6

Pseudomonas	B23	APPL	0,25		-	-				191		101	2	21
Pseudomonas	E21	APPL	0,37	++	++	+	+	+	-	+	+	-	-	-
Enterobacter	V1	APPL	0,13	++	++	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Pseudomonas	V2	APPL	0,34	++	++	+	+	+	+	4	+	-		121
Cult. mixto	V12	APPL	0,55	++	++	+	+	+	+	+	4	-	-	-
P.flourescens	A1	Anis.	0,10	++	++	+	+	+	+	+		-		111
P.acidovorans	D3	666Eox	0,09	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	

Se indica la densidad òptica alcanzada por los cultivos a los dos días de incubación en APPL. El crecimiento en monosacáridos fue determinado midiendo la densidad òptica de los cultivos a 600 nm luego de una incubación a 30°C durante 3 días. La concentración de monosacáridos en el medio fue de 1,0 % y de 0,5 % para las celulosas HEC y MCC y de 0,3 % en el caso de la celulosa de algodón. glu = glucosa; gal = galactosa; man = manosa; xil = xilosa; mal = maltosa; rib = ribosa; fru = fructosa; ara = arabinosa; HEC = hidroxietilcelulosa; MCC = celulosa microcristalina; AL6 = celulosa pura de algodón; Anís = anisoína (XIX); 666Eox = dímero guaiacílico oxidado (XXX); + = D.0. entre 0,1 y 1,0; ++ = D.0. mayor que 1,0.

The process of the second section of the second section of the second second second second section sec

CHIEF CO. In the section of the contract of th

conditions because were and the property of the contract of th

the barrier, and introducer alternative mention of the

que posiblemente las bacterias no eran capaces de crecer en un medio con celulosa como ûnica fuente de carbono. Se repitieron los ensayos utilizando sòlo hidroxietilcelulosa como sustrato y preparando esta vez los inòculos de las cepas en galactosa 1 %, a excepción de *P. acidovorans* Dæ (en fructosa 1 %) y *Pseudomonas* Bæ (en àcido vaníllico 5 mM). Se realizó un traspaso a cultivo fresco con hidroxietilcelulosa para eliminar el hidrato de carbono remanente del inòculo antes de medir los azúcares totales presentes en los cultivos a los 0 y 4 días de incubación. Los azúcares totales fueron determinados en duplicado según el mètodo del orcinol (Rimington, 1940). Nuevamente no se detectó un aumento de turbidez en los cultivos al tèrmino del período de incubación y tampoco se encontró un cambio en el contenido de azúcares totales con respecto al control sin inòculo.

Los trabajos publicados por otros autores (Crawford y cols., 1983; McCarthy y cols., 1986) y los resultados descritos en el capitulo 1 con respecto a la composición quimica de los AFPL, indican que las hemicelulosas constituyen un porcentaje importante de ellos. Por esta razón se ensayó también la capacidad de las cepas escogidas de metabolizar tres hemicelulosas. Los sustratos escogidos fueron arabino-galactano, xilano (que contiene residuos de arabinosa) y galacto-manano.

Se prepararon soluciones al 0,5 % en el medio minimo Ksal de las tres hemicelulosas y al igual que en los ensayos con celulosa, estos se inocularon con cultivos de las diversas cepas crecidas en galactosa, fructosa o acido vanillico. Debido a que experimentos preliminares indicaron que las hemicelulosas no constituyen buenos sustratos para el crecimiento de estas cepas bacterianas, se introdujeron algunas modificaciones en el protocolo: se prepararon inòculos de 20 ml de cultivo en dichas

fuentes de carbono, los cuales fueron centrifugados en forma estèril al cabo de 40 hrs de incubación y resuspendidos en 2,0 ml de medio minimo "Ksal". Los matraces que contenían los diferentes polisacàridos a ensayar fueron inoculados con 0,4 ml de la suspensión de cèlulas, con el fin de aportar una cantidad importante de biomasa de cada cepa al cultivo. De este modo se pretendió detectar la posibilidad de que la cepa fuera capaz de modificar el sustrato aún cuando no creciera a expensas de èl. En el experimento se incluyó también un control sin sustrato para cada cepa, aparte de los controles sin inóculo. Los matraces fueron incubados a 28°C con agitación durante seis días y al término de este periodo se determinaron en duplicado los azúcares reductores y totales de las muestras (Tabla 10).

En algunos casos se observaron cambios notorios en el contenido tanto de azúcares totales como reductores, los cuales se vieron reflejados en variaciones de pH y también en incrementos de la densidad optica alcanzada por el cultivo en estudio. En lineas generales, se observó que la cepa *Pseudomonas* E21 produjo cambios significativos en las tres hemicelulosas, hecho que concuerda bien con su gran versatilidad en la metabolización de monosacáridos. Las otras cepas introducen variaciones menos importantes en los niveles de azúcares reductores y totales de las hemicelulosas ensayadas.

Tabla Nº 10.

Metabolización de hemicelulosas por cultivos seleccionados.

	% Azù	cares tota	% Azóca	% Azòcares reductores				
Muestra	A-6	Xil	6-M	A-6	Xil	6-M		
Control sin inòculo	102,48	107,58	103,33	78,57	97,09	-		
Pseudomonas B23 Pseudomonas E21 Cultivo mixto V12 P. fluorescens A1 P. acidovorans D3	80,99 49,59 72,73 70,25 70,25	90,91 34,85 90,91 98,48 96,97	58,33 55,00 63,33 66,67 75,00	21,43 30,95 69,05 29,76 16,67	87,38 218,45 101,94 87,38 111,65	-		

Se midieron azòcares totales y reductores en los sobrenadantes de cultivos al término de una incubación de 4 días y se compararon con los respectivos controles sin inóculo. El 100 % se refiere al valor encontrado a tiempo cero de incubación. A-6 = arabino-galactano; Xil = xilano; 6-M = galacto-manano.

BETWEEN THE THE STATE OF THE PARTY OF THE PA

3.2. Acción de bacterias sobre APPL.

3.2.1. - Anàlisis mediante mètodos físico-químicos.

Uno de los intereses de este trabajo radicó en determinar los cambios introducidos en los APPL por acción de las bacterias no filamentosas aisladas en un medio conteniendo este polímero heterogêneo. En una primera etapa se hicieron anàlisis espectrofotomètricos de los sobrenadantes de cultivos de las diversas cepas incubadas en el medio minimo Ksal con 2,5 mg/ml de APPL como única fuente de carbono. En estos ensayos se incluyeron todas las cepas descritas en la Tabla 7 y se hicieron registros entre los 350 y 200 nm, región en que los APPL presentan absorción. No se detectaron diferencias en los espectros de absorción de las muestras con respecto al del control sin inòculo (datos no mostrados).

Se realizaron también registros de los espectros de emisión o de fluorescencia, obtenidos al excitar soluciones diluidas de APPL (0,08 mg/ml). El espectro de fluorescencia de un compuesto se produce al re-emitirse la radiación absorbida por la molècula (Guilbault, 1973). Se eligió esta tècnica puesto que la mayoría de los compuestos aromàticos emiten fluorescencia y es más sensible e informativa que otros métodos espectrofotométricos (Guilbault, 1973). En una primer etapa, se verificó que el espectro obtenido es independiente de la longitud de onda de excitación. El registro presentó un máximo de emisión a los 300 nm y otro más prominente a los 400 nm, aproximadamente (Figura 25A). Utilizando soluciones diluidas de APPL, se estableció que el espectro de emisión no era afectado por la presencia de oxígeno (comparando soluciones purgadas con

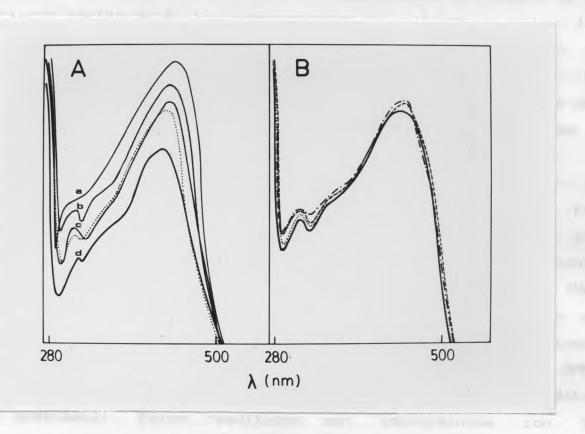


Figura 25: Espectros de fluorescencia de sobrenadantes cultivos en APPL. A) Espectro de emisión o fluorescencia de una solución control de APPL obtenido al excitar la muestra a las distintas longitudes de onda indicadas, en presencia (---) y ausencia (....) de oxígeno. Se indican las longitudes de excitación: a = 285 nm; b = 280 nm; c = 275 nm y d = 270 nm. B) Espectro de emisión obtenidos al excitar a 275 nm a alícuotas de un control sin inòculo (---) y de sobrenadantes de cultivos de Pseudomonas Bas (....), Pseudomonas Eas (---) fluorescens Biovar I Ai (---).

nitrògeno y sin purgar).

Una vez establecidas las caracteristicas del espectro, se hicieron registros de los sobrenadantes de cultivos de todas las cepas mencionadas. Se encontró que estos no se diferenciaron de aquellos de la solución control sin inóculo (Figura 25B). Los anàlisis se realizaron con alicuotas de sobrenadantes tomadas de cultivos de las diversas cepas al cabo de 2 y 4 dias de incubación a 30°C.

Con el fin de determinar si las bacterias modifican la distribución de pesos moleculares de los APPL, ya sea por polimerización o despolimerización, se filtraron los sobrenadantes de los mismos cultivos a través de las columnas Sephadex 6-50 y Shodex S/804-S descritas anteriormente (Ver sección 1.6.2. de Resultados). No se detectaron cambios en el grado de polimerización del sustrato luego de incubaciones exhaustivas de 4-5 días de las diferentes cepas sobre APPL utilizando cualquiera de los dos sistemas cromatográficos (datos no mostrados). Estos resultados son concordantes con la observación previa, referente a la incapacidad de estas cepas de romper enlaces característicos de lignina de compuestos modelo dimèricos.

Estas primeras determinaciones estaban destinadas a observar si se habían producido cambios significativos en la estructura de los APPL, tales como polimerizaciones o despolimerizaciones, cambios en el grado de aromaticidad, etc. En general, en estos ensayos no se detectaron alteraciones de este tipo, lo cual indica que las técnicas empleadas sólo son capaces de detectar modificaciones masivas y aparentemente no permiten analizar cambios de menor envergadura en el sustrato.

3.2.2.- Anālisis quīmicos.

Como ya se explicò anteriormente, los APPL están formados por una porción aromàtica y una fracción importante de hidratos de carbono, principalmente hemicelulosas. Por esta razón se considerò necesario hacer un anàlisis cuali y cuantitativo de ambos componentes del sustrato después de ser sometido a la acción bacteriana. Para este estudio se utilizaron los tres cultivos caracterizados en la sección 3.1. de este capítulo y se compararon nuevamente con las cepas *P. fluorescens* Biovar I A. y *P. acidovorans* Ds. Las técnicas escogidas fueron el anàlisis de los acetatos de alditoles para los carbohidratos y la tioacidòlisis para evaluar los residuos aromàticos.

3.2.2.1.- Acciòn bacteriana sobre el componente glucidico de los APPL.

La acción de las bacterias no filamentosas sobre la porción glucidica de los APPL se determinó según el siguiente protocolo: Se prepararon inòculos de las cepas *Pseudomonas* B₂₃ y E₂₁ y el consorcio V₁₂ en medio minimo Ksal conteniendo 2,5 mg/ml de APPL. Los inòculos de *P. fluorescens* Biovar I A₁ y *P. acidovorans* D₃ se prepararon en el mismo medio salino conteniendo como fuente de carbono anisolna (XIX) y V66Eox (XXXI), respectivamente. Una alicuota (200 µl) de cada uno de estos cultivos incubados durante 48 h fue utilizada a su vez como inòculo para 20 ml de medio minimo Ksal suplementado con 2,5 mg/ml de APPL (50 mg en total) como ùnica fuente de carbono y energia. Al tèrmino de una incubación con agitación durante 96 h a 30°C, los cultivos fueron centrifugados para sedimentar las

bacterias y los sobrenadantes se liofilizaron a sequedad. Estas muestras fueron procesadas según se describió en la sección 4.1. de Materiales y Mètodos. Se hicieron dos determinaciones de hidratos de carbono independientes para cada cultivo, una en el país y la otra en el Forest Products Laboratory de Madison, Wisconsin. La Figura 26 muestra los resultados promediados de estos anàlisis para cada uno de los cultivos realizados despues de 96 h de incubación.

Los datos obtenidos muestran que existe una cierta correlaci<mark>ón entre la densidad óptica alcanzada por cada c</mark>ultivo en APPL, la versatilidad metabòlica con respecto a mono- y polisacăridos (Ver sección 3.1. de este capítulo) y su capacidad de consumir alguno de los hidratos de carbono presentes en los APPL. Por ejemplo, la cepa Pseudomonas Ez: crece bien en APPL. es muy versătil en cuanto a su capacidad de monosacăridos y modificar hemicelulosas, y también muestra un consumo estadisticamente significativo de azücares totales y de mananos con respecto al control sin inòculo. El consorcio Viz degrada una porción importante de xilanos y mananos, lo cual tambièn se refleja en una disminución importante de los carbohidratos totales de los APFL. Aunque el consorcio metaboliza bien diversos monosacàridos, la capacidad de metabolizar estos glàcidos no se visualiza en forma clara utilizando preparaciones de hemicelulosas. El caso de la cepa Pseudomonas B23 es diferente, puesto que crece bastante bien en APPL y sin embargo no metaboliza monosacàridos, hecho que se refleja en la ausencia de un consumo significativo de carbohidratos de los APPL. Por otra parte, P. fluorescens Biovar I A: presenta un desarrollo escaso en el polimero soluble, no es muy versàtil en cuanto a su capacidad de degradar monosacàridos y hemicelulosas, y tampoco

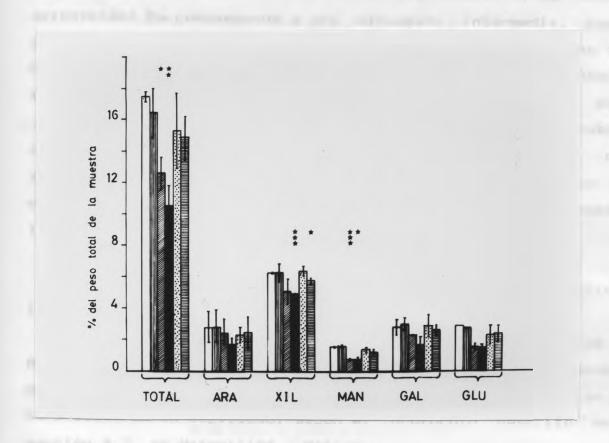


Figura 26: Variación del contenido de hidratos de carbono de APPL por efecto de incubación con cepas bacterianas. Se comparan los valores obtenidos con el control sin inòculo y los cultivos indicados para cada uno de los azúcares cuantificados. *Pseudomonas Bas (III); *Pseudomona Eai (III); *consorcio Viz (III); *P. fluorescens* Biovar I Ai (IIII) y *P. acidovorans* Dis (III). ARA = arabinosa; *XIL = xilosa; *MAN = manosa; *GAL = galactosa y *GLU = glucosa. El 100 % se refiere al material total de cada muestra. Se hicieron dos determinaciones independientes y se indican valores promedio y desviaciones estàndar. Anàlisis de varianza por test de Student: *x: p<0.05, ***: p<0.02, ***: p<0,005.

degrada azúcares de los APPL en forma significativa. La cepa *P. acidovorans* D₃ corresponde a una situación intermedia, puesto que utiliza sólo un monosacárido como fuente de carbono, no crece bien en APPL, ni consume hemicelulosas en forma importante. Se aprecia una disminución estadísticamente significativa en el contenido de uno de los carbohidratos presentes en el sustrato analizado. Se demostró también que ninguna de las cepas seleccionadas es capaz de crecer o modificar celulosas, lo cual es consistente con el consumo relativamente escaso de glucosa en los APPL (Figura 26).

3.2.2.- Acción bacteriana sobre el componente aromàtico de los APPL.

El efecto de las cepas sobre la porción aromàtica de los APPL se midió en muestras preparadas en la misma forma descrita más arriba. Se hicieron dos cultivos independientes que a su vez se procesaron en duplicado, según el protocolo descrito en la sección 4.2. de Materiales y Métodos.

Los resultados de los anàlisis mediante tioacidòlisis se resumen en la Tabla 11. Los datos obtenidos indican que dos de los cultivos incubados con APPL presentan cambios significativos en la recuperación de monòmeros tioacidolizados con respecto al control sin inòculo. Específicamente, en la cepa *Pseudomonas* B23 se observò una disminución significativa de los residuos G y S. También la cepa *P. fluorescens* Biovar I A1 modifica la porción aromàtica de los APPL al disminuir el porcentaje de residuos G, lo cual se traduce en un aumento importante de la razón S/G. En las cepas restantes el rendimiento de los residuos analizados de la lignina no condensada no varía significativamente. Asimismo, la razón entre los diasteroisòmeros S y G permanece pràcticamente

Tabla № 11.

Anàlisis por tioacidòlisis de la fracción aromàtica de los APPL incubados con cepas bacterianas seleccionadas.

Muestra	6 %	S %	\$/6	N.
Control sin inòculo	0,688 (0,115)	0,649 (0,085)	0,945 (0,048)	4
Pseudomonas B23	0,515 (0,055)4	0,497 (0,055)2	0,960 (0,008)	4
Pseudomonas E21	0,568 (0,177)	0,649 (0,177)	0,957 (0,023)	3
Cultivo mixto V12	0,656 (0,122)	0,642 (0,138)	0,973 (0,035)	4
P. fluorescens A1	0,538 (0,032)*	0,564 (0,021)	1,045 (0,031)3	4
P. acidovorans D3	0,577 (0,000)	0,591 (0,044)	1,020 (0,071)	2

Los resultados se expresaron como porcentaje sobre el peso total de la muestra. Se indica el número de determinaciones realizadas en cada caso. Las desviaciones estàndar se senalan entre parêntesis. En cada caso los valores de p fueron obtenidos al comparar los datos de los cultivos con el control sin inòculo, según el Test de Student. 1: p<0,05; 2: p<0,025; 3: p<0,02.

inalterada. Este hecho demuestra que las cepas *Pseudomonas* E21, el cultivo mixto V12 y *P. acidovorans* D3 no afectaron los monômeros aromàticos que componen la fracción no condensada de los APPL.

El conjunto de datos obtenidos mediante los anàlisis químicos de los APPL incubados con diversas cepas naturales de bacterias no filamentosas permiten afirmar que existe un comportamiento que es característico de cada cepa analizada. Algunas de ellas se desarrollan fundamentalmente a expensas de la fracción glucídica del sustrato, permaneciendo virtualmente inalterada la porción aromàtica de los APPL. Tal es el caso de Pseudomonas E21 y el consorcio V12. Otras, como Pseudomonas B23 y P. fluorescens Biovar I A1 introdujeron modificaciones significativas en la porción aromàtica del sustrato, sin afectar mayormente los carbohidratos presentes.

4.- Efecto de hongos sobre APPL.

Se estudió también el efecto de un hongo denominado Ganoderma applanatum sobre los AFPL, con el fin de determinar si su acción difiere a la ejercida por las bacterias no filamentosas seleccionadas. Esta especie pertenece a los basidiomicetes y, como la mayoría de los miembros de su familia, no esporula. Este hongo forma parte del sistema selectivo de deslignificación encontrado en los bosques del sur de Chile conocido como "palo podrido" (A. González y cols., 1986). Esta es una comunidad cerrada de microorganismos que en determinadas condiciones degrada lignina de algunas especies de árboles liberando celulosa pura en el centro del tronco (Dill y Kraepelin, 1986; Zadrazil y cols., 1982). Cabe hacer notar que sólo existen escasos

antecedentes con respecto a la forma de cultivar G. applanatum en un medio de cultivo definido y aŭn no hay trabajos publicados describiendo sus propiedades bioquimicas.

Tambièn se analizò el efecto de preparaciones purificadas de peroxidasa de lignina de *Phanerochaete chrysosporium* sobre los APPL. Como ya se indicò en la Introducción, las propiedades ligninolíticas de este hongo han sido ampliamente estudiadas (Kirk y Farrell, 1987).

4.1.- Efecto de Ganoderma applanatum sobre APPL.

Con el propòsito de estudiar si 6. applanatum ejerce algún efecto sobre los APPL, se prepararon cultivos de este hongo en un medio definido conteniendo glucosa 1 % y uno de los siguientes amino àcidos como fuente de nitrògeno a una concentración final de 3 mM en N: arginina, fenilalanina, histidina o triptofano. Se observò que los cuatro cultivos lograron un buen desarrollo de micelios al cabo de 8 dlas de incubación, siendo el cultivo suplementado con arginina aquel que presentaba una mayor cantidad de micelios. Al tèrmino de este periodo de incubación, cada cultivo fue dividido en forma asèptica en tres partes de 20 ml cada una. En cada caso una fracción fue suplementada con APPL (1 mg/ml final), otra con el colorante polimèrico Azul de Remazol (0,025 % final) y la tercera fracción se dejò como control. Se continuò la incubación en las mismas condiciones durante 8 dias màs y durante este periodo se retiraron alicuotas de cada cultivo a los 0, 1, 2, 3, 6 y 8 dias. Las alicuotas con Azul de Remazol fueron analizadas espectrofotomètricamente, encontràndose que cada uno de estos cultivos presentaba un patròn diferente. Por ejemplo, aquel

suplementado con arginina decoloraba ràpidamente el Azul de Remazol, en cambio en el cultivo que contenía histidina como fuente de nitrògeno no se detectò decoloración. En la Figura 27 se muestran el espectro de absorción visible del colorante y su decoloración por acción del hongo en cultivos suplementados con arginina como fuente de nitrògeno. Por otra parte, alícuotas de los cultivos suplementados con APPL fueron analizadas mediante filtración en gel a través de la columna de Sephadex G-50. Se encontrò en cada caso que los perfiles de elución al término del período de incubación eran iguales a los de las muestras de tiempo cero de incubación. En estudios preliminares no se detectò la presencia de ligninasa y peroxidasa + lacasa en los sobrenadantes de todos los cultivos, sin detectarse actividad en ninguno de ellos (Figura 278).

4.2.— Efecto de peroxidasa de lignina de *P. chrysosporium* sobre APPL.

Existen numerosos estudios que demuestran que *P. chrysosporium* sòlo degrada lignina cuando se encuentra en metabolismo secundario, requiriêndose condiciones fisiològicas muy específicas, entre otras, de carencia de nitrògeno, para que el hongo pase a este estado metabòlico en que se libera la enzima ligninasa (Jeffries y cols., 1981; Fenn y Kirk, 1981).

Actualmente es un hecho conocido que la ligninasa purificada de *P. chrysosporium* no degrada lignina, sino por el contrario, la polimeriza (Haemmerli y cols., 1986). Al parecer èsto se debe a que no se ha logrado reconstituir aun el sistema ligninolítico completo, que al parecer està formado por al menos tres tipos de enzima (Kersten y Kirk, 1987; Paszczynski y cols.,

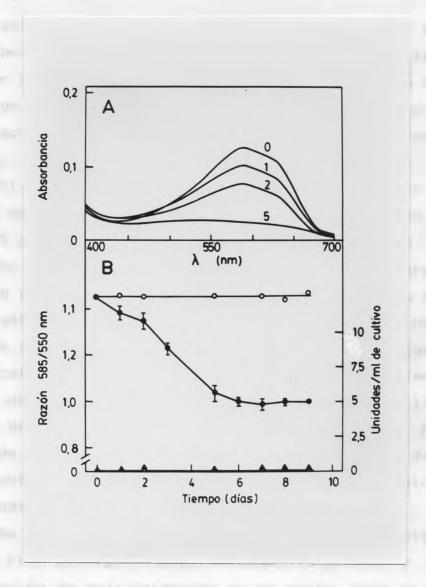


Figura 27: Descoloración de Azul de Remazol en cultivos de G. applanatum conteniendo arginina como fuente de nitrògeno, y medición de actividades enzimàticas extracelulares. A) Espectro visible de Azul de Remazol de alicuotas tomadas cultivos de inoculados con *G. applanatum*. Los números indican el tiempo de incubación en días. B) Descoloración de Azul de Remazol medida como razón de absorbancias a 585 y 550 nm de alicuotas tomadas de un control sin inòculo (O) y de cultivos inoculados (·) . indica el promedio de tres cultivos independientes desviaciones estàndar calculadas. Actividades de ligninasa (▲) de lacasa + peroxidasa (\triangle) .

1986; Nishida y Eriksson, 1987). Hasta la fecha no hay trabajos publicados acerca de la acción de la peroxidasa de lignina sobre APPL. Por esta razón se diseñaron experimentos para determinar el efecto de la ligninasa sobre los APPL variando tanto la concentración de enzima en el medio como la cantidad de H₂O₂ agregada.

El medio de incubación de los ensayos en que se varió la cantidad de enzima adicionada, contenía el tampón de tartrato de amonio 25 mM, pH±2,5, 3 mg/ml de APPL y 0, 5, 10 ò 15 µl de enzima. En todos los casos la reacción se inició agregando 50 µl de H±02 8 mM al tubo de ensayo. Las incubaciones se hicieron a 37°C durante dos horas, adicionando otros 50 µl de H±02 a los 60 min de incubación. Posteriormente las muestras fueron cargadas en la columna Sephadex G-50, previa alcalinización con la solución de corrida hasta observar una total solubilización. Los perfiles de elución de estas muestras coincidieron perfectamente con los de controles sin enzima o con enzima hervida, indicando que no había efecto de la ligninasa sobre el sustrato en las condiciones descritas (resultados no mostrados).

Se repitieron los ensayos, esta vez utilizando una cantidad fija de ligninasa purificada (15 μ l/ml) y variando la concentración de agua oxigenada en el medio. Para ello se agregó el cofactor cada 15 o cada 30 min y también al cabo de 60 min de incubación. Como controles se incluyeron ensayos con las mismas cantidades de H $_2$ O $_2$, pero en ausencia de enzima. Nuevamente no se observó ningún efecto de la enzima, ni tampoco hubo modificación detectable en el sustrato por acción del agua oxigenada en ausencia de la ligninasa (datos no mostrados).

DISCUSION.

La biodegradación de la lignina es una de las etapas claves del ciclo del carbono en la biòsfera. Con el fin de lograr una comprensión cabal de este complejo fenómeno, resulta indispensable investigar el papel que cumplen en èl los diversos tipos de microorganismos. En los últimos años se han logrado importantes avances en el conocimiento de los hongos ligninolíticos. La evidencia apunta a que son ellos los primeros en atacar la lignina in situ, labor que se ve facilitada con la penetración de la madera por las hifas. Algunos gèneros bacterianos también degradan lignina nativa, aunque éstos son escasos y lo hacen a una velocidad lenta (Vicuña, 1988). El papel de las bacterias en este proceso parece ser más bien el consumir intermediarios liberados por los hongos, contribuyendo así en forma decisiva a la mineralización de dicha macromolècula aromàtica. En todo caso, la bioquímica de la ligninolisis bacteriana es escasamente conocida. En esta tesis se planteò hacer avances al respecto, mediante el estudio de la acción de gèneros taxonòmicos muy distantes sobre sustratos naturales ricos en lignina y sobre modelos sintetizados quimicamente. Las especies escogidas fueron S. viridosporus T7A, una bacteria filamentosa que pertenece a la familia de los actinomicetes, y diversas cepas naturales que luego de identificadas resultaron ser en su mayoría pseudomonas.

Las preguntas planteadas en este trabajo pueden resumirse de la siguiente manera:

- 1) Ya que S. viridosporus T7A es capaz de solubilizar lignocelulosa liberando un producto polimèrico rico en lignina denominado AFPL, ¿ es esta bacteria filamentosa capaz de atacar directamente los enlaces encontrados en la lignina? En este mismo contexto, ¿ son afectados mayormente los componentes aromàticos o los glucídicos de la lignocelulosa en el proceso de su solubilización parcial?
- 2) ¿ Què ocurre con el producto liberado? La pregunta surge debido a la existencia de antecedentes bibliogràficos que indican que el polímero soluble es un producto terminal que no es modificado significativamente por otras especies de actinomicetes.

Acción de *S. viridosporus* T7A sobre compuestos aromáticos sencillos.

En primer tèrmino se hizo una caracterización de S. viridosporus T7A con respecto a su versatilidad metabólica frente a compuestos aromàticos simples y a compuestos modelo de lignina dimèricos. En general se observó que la bacteria metaboliza una gama mayor de compuestos aromàticos simples que los descritos en la literatura (Rüttimann y cols., 1986). Nuestros resultados indican que S. viridosporus T7A además es capaz de oxidar algunos alcoholes aromàticos al àcido correspondiente. La observación más interesante consistió en descubrir que el alcohol veratrílico es oxidado significativamente por la bacteria sólo en presencia de lignocelulosa. Otros autores (Crawford y cols., 1982) encontraron

una aldehido oxidasa constitutiva en S. viridosporus T7A, la que oxida, entre otros sustratos aromàticos, el veratraldehido a àcido veràtrico. En consecuencia, la enzima inducible de este sistema podria ser la enzima que convierte al alcohol a aldehido (probablemente una deshidrogenasa). El alcohol veratrilico es producido *de novo* por diversas especies de basidiomicetes, incluyendo el hongo de pudrición blanca P. chrysosporium, al comenzar la etapa de metabolismo secundario (Lundquist y Kirk, 1978; Shimada y cols., 1981). Se presume que este metabolito cumple un rol importante en la biodegradación fúngica de la lignina, aunque èste no ha sido determinado aŭn con claridad. Lo que si se ha comprobado fehacientemente es que protege a la ligninasa contra la inactivación por agua oxigenada (Leisola y cols., 1985; Tonon y Odier, 1988). Hasta la fecha se desconoce si el alcohol veratrilico tiene alguna significancia fisiològica en Streptomyces. En actinomicetes la degradación de lignocelulosa ocurre en forma paralela a su crecimiento (McCarthy, 1987; Mason y cols., 1988), no siendo una manifestación del metabolismo secundario.

Cuando se ensayô la acción de S. viridosporus T7A sobre el àcido protocatecuico, se esperaba que èste fuese fàcilmente degradado, tal como ha sido descrito en bacterias no filamentosas (Bayly y Barbour, 1984) y también en otras especies de Streptomyces (Sutherland y cols., 1981; Sutherland y cols., 1983). Sin embargo, se observô la acumulación de un compuesto que posteriormente no es metabolizado ni en ausencia ni en presencia de lignocelulosa de trigo. Por otra parte, se comprobó que el àcido gentísico es degradado cuantitativamente. El àcido benzoico también es metabolizado, lo cual coincide con observaciones de otros autores (Sutherland y Crawford, 1981). El producto formado

a partir de àcido protocatecuico fue analizado mediante HPLC, TLC y espectrofotometria UV en medio neutro, observandose una coincidencia perfecta con àcido gàlico. Sin embargo, los espectros de ionización a pH alcalino de un estàndar autêntico de àcido gàlico y el producto formado eran diferentes. Esta experiencia demostró que el uso de tres criterios analíticos independientes no es suficiente para determinar la identidad de un compuesto. Esta sólo puede establecerse en forma inequivoca mediante espectrometria de masas.

Se purificò el producto en cantidad suficiente y a pesar de aplicar diversas tècnicas analíticas sofisticadas, no fue posible proponer para èl una estructura satisfactoria. La estructura indicada es compatible con el peso molecular, el número de protones aromáticos, grupos carbonilo, metoxilo y la presencia de un grupo metilo. Sin embargo, el espectro de **C-NMR indica sòlo 17 carbonos y la estructura propuesta posee 18. Ademàs, aparece una señal de otro grupo carbonilo y una señal a 170 ppm que no son compatibles con la fòrmula propuesta. Los datos disponibles no comprueban en forma fehaciente que dicho compuesto es un producto directo de la acción del microorganismo sobre el àcido protocatecuico. Sin embargo, al incubar cultivos de S. viridosporus T7A en iguales condiciones pero en ausencia de àcido protocatecuico, no se obtuvieron ni trazas del producto. Desgraciadamente, no se dispone de àcido protocatecuico marcado en forma radiactiva para demostrar la relación sustrato-producto, o por el contrario, que la sintesis del metabolito es inducida de alguna manera por el àcido protocatecuico.

Se estudiò también la acción de S. viridosporus T7A sobre una serie de compuestos modelo de lignina dimèricos cuyos anillos aromàticos estàn unidos entre si mediante enlaces característicos de la lignina. En lineas generales se encontrò que la bacteria filamentosa en estudio tiene un efecto muy limitado sobre este tipo de compuestos.

Se han descrito algunas cepas bacterianas no filamentosas capaces de metabolizar compuestos de estructura diariletano o "F-1" (Gonzàlez y cols., 1986, 1988). De una de ellas se ha identificado y purificado la enzima que rompe el enlace intermonomèrico (Gonzâlez y Vicuña, 1989). A su vez, los compuestos f-1 de estructura diarilpropano sòlo son metabolizados por cultivos bacterianos mixtos (Katayama y Fukuzumi, 1979; Pellinen y cols., 1984). En la literatura no existen datos con respecto a la metabolización de compuestos modelo de lignina de estructura f-1 por actinomicetes. En este trabajo se estudiaron diversos compuestos de estructura diarilpropano encontrândose que ninguno de èstos era degradado o modificado por la bacteria (Ruttimann y cols., 1986). Por otra parte, los compuestos diariletano tampoco fueron degradados, aunque siempre se detectò una reducción a alcohol en todos los compuestos modelo que pose<mark>lan un grupo carbonilo en cualquiera de los dos carbonos</mark> alifàticos. Los compuestos reducidos se acumularon en el medio de cultivo y no sufrieron modificaciones posteriores, no importando la presencia de lignocelulosa en los cultivos (Rüttimann y cols.,

La metabolización bacteriana de compuestos modelo de lignina de estructura *P-O-4* ha sido descrita por diversos autores (Sundman, 1964; Samejima y cols., 1985; Vicuña y cols., 1987). En estos trabajos se usaron cultivos bacterianos puros, **aunque**

también se ha demostrado la metabolización de compuestos modelo de estructura 8-0-4 por cultivos mixtos (Fellinen y cols., 1984; Jokela y cols., 1987). En la mayor parte de los casos se produce la ruptura del enlace èter, aunque en algunos casos se descrito la ruptura de la molècula entre C_{α} y C_{β} (Rast y cols., 1980; Odier y Rolando, 1985). Con respecto a la capacidad de actinomicetes de metabolizar estos compuestos, se había reportado que S. viridosporus T7A rompe el enlace 8-0-4 del dimero VGGE (XXXIV) en presencia de lignocelulosa de maiz (Crawford y cols., 1983a). Evidencias preliminares de estos mismos autores sugirieron que la actividad enzimàtica descrita estaría asociada a la membrana. Utilizando el mismo compuesto modelo y condiciones experimentales idènticas, no se logrò detectar ni ruptura del enlace β-0-4 ni otras modificaciones. Tampoco se detectò consumo del sustrato, descartàndose la posibilidad de una metabolización sin acumulación de intermediarios estables en el medio de cultivo. Una posible explicación de esta controversia podría encontrarse en que se utilizaron lignocelulosas de distinto origen (maiz y trigo). Alternativamente, es posible que la cepa original haya tenido un plasmidio el cual se perdiò por traspasos sucesivos del cultivo en medio rico. Se ensayaron tambièn otros compuestos modelo del tipo arilglicerol-f-aril èter fenòlicos y no fenòlicos, obtenièndose idènticos resultados (Rüttimann cols., 1986). En todo caso, el grupo de D. Crawford no ha insistido despuès de su comunicación preliminar en la existencia de una "f-eterasa". Por otra parte, recientemente se ha publicado que S. cyaneus es capaz de metabolizar un dimero no fenòlico de estructura 6-0-4 (Zimmermann y cols., 1988). Los autores detectaron ruptura in vivo entre C_lpha y C_lpha por medio de la identificación de los intermediarios liberados, lo que sugiere un

mecanismo semejante a la ligninasa de hongos.

Se ha demostrado que un porcentaje significativo (10 %) de unidades aromàticas de la lignina estàn unidas entre si mediante enlaces bifenilicos. También se han encontrado bacterias capaces de metabolizar bifenilos, tales como pseudoalcaligenes (Furukawa y Miyazaki, 1986) y otras cepas anaeròbicas presentes en liquidos ruminales (Chen y cols., Chen y cols., 1987). Con respecto a actinomicetes, se ha descrito que S. viridosporus T7A oxida la dehidrodivanillina (DHDV) al àcido correspondiente, el cual aparentemente es metabolizado a travès de una ruta catabòlica desconocida (Crawford y cols., 1981). Los compuestos con enlaces bifenilo ensayados en esta tesis, ya sea en presencia o ausencia de lignocelulosa, no fueron degradados por la bacteria filamentosa (Rüttimann y cols., 1986). Es posible que la presencia en la DHDV de grupos laterales oxidables facilite su posterios catabolismo.

Acción de S. viridosporus T7A sobre lignina kraft.

Como se explicò en Resultados, los estudios de biodegradación de lignina kraft poseen un interès acadèmico y tambièn aplicado, puesto que la producción de este material por la industria de celulosa es enorme. Los únicos trabajos publicados en relación a la capacidad de bacterias filamentosas de degradar derivados industriales de la lignina se refieren a su efecto sobre lignosulfonatos (Haraguchi y Morohoshi, 1976; Haider y Trojanowski, 1981). En ambos casos, los autores observaron que los lignosulfonatos son bastante refractarios a la acción de las bacterias filamentosas.

Los experimentos realizados con lignina kraft se

diseñaron como una aproximación adicional al estudio del sistema ligninolítico de S. viridosporus T7A. Si bien èste es un sustrato quimicamente modificado con respecto a la lignina nativa, comûnmente se la ensaya en experimentos de degradación de lignina. Los resultados obtenidos indican que la lignina kraft no es metabolizada en forma eficiente por S. viridosporus T7A. Llama la atención el hecho que la fracción soluble en éter (FSE) resultara ser inhibitoria, ya que ensayos realizados por nuestro grupo han mostrado que pràcticamente todas las cepas de bacterias no filamentosas aisladas en diversos compuestos modelo de lignina de bajo peso molecular son capaces de crecer en FSE, aunque no en FIE (Gonzàlez y cols., 1986). Màs aun, sólo las cepas originalmente aisladas en FIE muestran un significativo en este sustrato, lo que puede deberse a su alto peso molecular promedio. Aparentemente existiria en la FSE un componente que es tóxico para Streptomyces e inocuo para numerosas bacterias Gram negativas.

Los experimentos realizados con Azul de Remazol son aŭn preliminares, pero permiten establecer que la actividad responsable de su descoloración no tiene la capacidad de alterar el color de la lignina kraft o de romper enlaces típicos de lignina. La descoloración podría deberse a la actividad de enzimas del tipo fenol oxidasa o peroxidasa. Actualmente se desconoce si S. viridosporus T7A secreta fenol oxidasas al medio de cultivo, pero posee una peroxidasa extracelular inducible por lignocelulosa (Ramachandra y cols., 1987). Se han descrito cuatro isoenzimas de esta peroxidasa que presentan especificidades diferentes y aparecen durante la fase logarítmica de crecimiento, permaneciendo dos de ellas activas durante la fase estacionaria (Ramachandra y cols., 1987). Es muy probable que una o más de

estas isoenzimas sea(n) la(s) responsable(s) de la descoloración observada. Hasta la fecha no se ha demostrado que alguna de dichas peroxidasas de *S. viridosporus* T7A posea la capacidad de modificar compuestos modelo de lignina en forma anàloga a la ligninasa descrita en *P. chrysosporium*.

En resumen, basàndose en las evidencias presentadas, parece ser que *S. viridosporus* T7A no posee una capacidad ligninolítica propiamente tal. Un ensayo adicional podría consistir en determinar si esta bacteria mineraliza significativamente DHP, un polimerizado sintètico de alcohol coniferílico. Curiosamente, nadie hasta la fecha lo ha intentado.

Acción de S. viridosporus T7A sobre lignocelulosa de trigo.

Independientemente de los resultados obtenidos, es un hecho establecido que *S. viridosporus* T7A ataca a la lignocelulosa, acción que conduce más bien a su solubilización que a su mineralización. Esta propiedad es común a otros actinomicetes, tales como *S. badius* (Borgmeyer y Crawford, 1985) y *Thermomonospora mesophila* (McCarthy y cols., 1986). Datos de otros investigadores (Crawford y cols., 1983) y también de nuestro grupo de trabajo, indican que tanto en medio líquido y como en medio sòlido, *S. viridosporus* T7A libera en forma más eficiente el producto soluble a partir de lignocelulosa de pastos que de madera. Por ejemplo, en medio sòlido *S. viridosporus* T7A produce sòlo 0,8 mg de APPL por gramo de aserrín de *Pinus radiata* (C. Rüttimann, comunicación personal), comparado con alrededor de 50 mg del polímero por gramo de lignocelulosa de trigo. Es probable que esta diferencia se deba justamente a la mayor

cantidad de lignina presente en el pino (25-35 % versus 15 % del trigo), la que dificultaria el acceso de las enzimas a sus correspondientes sitios de acción.

Como se puede verificar en la sección Materiales y Mètodos, la preparación de APPL incluye una esterilización finalizar el periòdo de incubación. Se observò que al hacerlo en condiciones más drásticas que las descritas, el rendimiento resultaba mayor. Por el contrario, si se suprime esta etapa, rendimientos disminuyen a un tercio aproximadamente (Ramachandra y cols., 1987). Ello indica que la acción de la bacteria se manifiesta no sòlo en la solubilización mineralización parciales del sustrato, sino que además afecta su estructura de tal forma que la hace màs fràgil frente a tratamientos físicos como el descrito. Con respecto a los mètodos de recuperación de APPL, es necesario aclarar que èstos pueden ser colectados por precipitación en medio àcido. Sin embargo, en estas condiciones sufren polimerizaciones inespecíficas que es preferible evitar (Crawford y cols., 1983) y es por ello que se prefiriò l a liofilización. El peso molecular de los APPL obtenidos es semejante al observado por Crawford con lignocelulosa de maiz (Crawford y cols., 1983). Tambièn existe coincidencia en propiedad con los APPL liberados por 7. mesophila actuando lignocelulosa de trigo (McCarthy y cols., 1986).

Tanto Broda (McCarthy y cols., 1986) como Crawford (Deobald y Crawford, 1987; Borgmeyer y Crawford, 1985) han hecho diversos anàlisis químicos comparando el producto soluble con el sustrato del cual se originan. En lo que concierne a la fracción glucídica, ambos grupos obtienen datos comparables, es decir, encuentran que el producto solubilizado en cada caso posee alrededor de un 10-20 % de carbohidratos, los cuales son

principalmente hemicelulosas. Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan plenamente con lo observado por los autores mencionados. Se demostrò ademàs que los cambios que sufre la lignocelulosa en la porción glucídica durante su solubilización se completan esencialmente en el transcurso de ocho dias de incubación. No se ha realizado un anàlisis cuali ni cuantitativo comparable con otras lignocelulosas. Se observa una disminución dràstica del contenido de glucosa que podría dar cuenta del menor contenido total de carbohidratos de los APFL con respecto a la lignocelulosa. Las variaciones en el contenido de los otros monosacàridos durante la formación de los APPL son menores, pero no menos interesantes. Se detectò un aumento importante en todos los azùcares que forman parte de las hemicelulosas. Aunque no fue posible hacer un anàlisis estadístico, parecen existir ademàs variaciones pequeñas de tendencias características para cada monosacàrido. Por ejemplo, entre 4 días y 2 semanas de incubación, el contenido de arabinosa y manosa permanece constante, el de galactosa disminuye ligeramente y el contenido de xilosa va en aumento. Se podría especular que dichas tendencias podrian tener relación con la facilidad con que estos carbohidratos son atacados por S. viridosporus durante el proceso de formación de los APPL; también podrían depender de la disposicion de los diversos carbohidratos en la estructura del polimero.

Desde otro punto de vista, es importante considerar que la xilosa fue el monosacàrido mayoritario encontrado en los APPL. Se ha descrito que un porcentaje alto de los xilanos naturales se encuentran acetilados (Biely, 1985). Los grupos carboxilos podrian contribuir en forma significativa a incrementar la solubilidad del polimero a pH neutro (y a disminuirla a pH bajo).

No existen datos con respecto al grado de acetilación de los AFPL, ni si las xilanasas de *S. viridosporus* T7A son capaces de romper xilanos acetilados o no. Sin pretender que la solubilización de la lignocelulosa se deba a esta circunstancia, està claro que es un factor que bien vale la pena investigar.

Para el anàlisis cuali y cuantitativo de los hidratos de carbono se prepararon acetatos de alditoles. Este mêtodo es cuantitativo y permite analizar muestras tan diversas como glicoproteinas, pared celular de vegetales, maderas, etc. (Sloneker, 1972). Su ventaja principal radica en que, debido a la derivatización que se utiliza, se evitan las isomerizaciones a nivel del carbono anomèrico (Sawardeker y cols., 1965) y del anillo (Turner y Cherniak, 1981), obtienendose un solo producto por aldosa. La tècnica es laboriosa, pero presenta la ventaja adicional que no se requiere trimetilsililar las muestras para la cromatografia de gases, puesto que èstas son volàtiles en las condiciones en que se lleva a cabo el anàlisis (Turner y Cherniak, 1981). Mās aŭn, se ha visto que los derivados trimetilsililados de azücares no se separan bien mediante cromatografia gaseosa por ser poco polares (Sawardeker y cols., 1965). Los acetatos de alditoles que son de caràcter polar se separan en diversas columnas recubiertas con cianoalquil siliconas (Blakeney y cols., 1982; Sawardeker y cols., 1965; Sloneker, 1972).

Se indicò que los AFPL contenian un porcentaje significativo de un carbohidrato que no se pudo identificar. Obviamente, este carbohidrato no fue incluido en los cálculos porcentuales, porque se desconoce su factor de respuesta en el detector del cromatògrafo. Utilizando una columna similar, y preparando acetatos de alditoles de monosacáridos estándares,

otros investigadores (Blakeney y cols., 1982) demostraron que cinco azúcares tienen un tiempo de retención menor que la arabinosa. Por orden de elución éstos son: eritrosa, desoxiribosa, ramnosa, fucosa y ribosa. Tanto en la columna utilizada por Blakeney como en la empleada en este trabajo, el orden de elución de los glúcidos cuantificados es el siguiente: arabinosa, xilosa, manosa, galactosa, glucosa e inositol (estàndar interno).

Con respecto al protocolo utilizado para obtener los derivados acetilados, es necesario recalcar que es muy importante ajustar las condiciones en que se realiza la hidròlisis àcida inicial, con el fin de evitar la degradación de los azúcares liberados. Estos son luego reducidos con NaBH4, alcalinizando previamente con CaCOs, puesto que esta reacción ocurre sólo a pH neutro o bàsico. Los iones borato formados en esta reacción se eliminan posteriormente acidificando el medio y agregando metanol, con lo cual el borato se pierde como èster de borato volàtil. La acetilación, que es la etapa siguiente, es ràpida sólo en ausencia de iones borato. (Sloneker, 1972).

Para el anàlisis de lignina existen una serie de mètodos, tales como la acidòlisis (Lundquist y Kirk, 1971), oxidación con nitrobenceno (Crawford, 1981), oxidación con permanganato (Kirk y Adler, 1970) y tioacidòlisis (Rolando y cols., 1989). Se descartò la oxidación con nitrobenceno porque los resultados pueden ser ambiguos, en el sentido que unidades aromàticas diferentes producen los mismos residuos, dificultando el anàlisis de los resultados (Lapierre y cols., 1988). A la vez, el mètodo de oxidación con permanganato ha sido utilizado para caracterizar APPL (Crawford y cols., 1983). Sin embargo, en esta ocasión se

descartò el uso de esta tècnica porque aparte de ser extremadamente lento y laborioso, sòlo permite el procesamiento de una muestra a la vez, lo cual era totalmente inadecuado para este trabajo. La acidòlisis, al igual que la tioacidòlisis, presenta la ventaja de preservar la estructura de los residuos fenilpropanoicos (CaCa), facilitando así el anàlisis de los resultados. Sin embargo, en la acidòlisis los rendimientos son màs bajos y los perfiles cromatogràficos son mucho màs complejos, lo cual dificulta su interpretación (Lapierre y cols., 1985). Por estos motivos, se eligió la tioacidòlisis para analizar la fracción aromàtica de la lignocelulosa y de los APPL derivados de ella.

La tioacidòlisis fue desarrollada recientemente por un grupo de investigadores franceses. Consiste en una solvòlisis àcida con BFs (àcido) y etanotiol (nucleòfilo), lo que permite romper en forma eficiente y específica los enlaces arilglicerol -6- arilèter. En esencia, este mètodo produce la ruptura de los enlaces 6-0-4 liberando las estructuras no condensadas de la lignina, es decir, a aquellas unidades que se encuentran unidas entre si exclusivamente por este tipo de enlace (Lapierre y cols., 1984). Se obtienen monòmeros sustituidos (tioetilados) que mantienen la estructura fenilpropanoica de la unidad original, permitiendo evaluar la abundancia relativa de residuos siringilos (S), guaiacilos (G) y p-hidroxifenilos (H) presentes en la lignina. Las proporciones relativas de los diasteroisòmeros correspondientes a estos residuos reflejan la composición monomèrica de las estructuras degradadas, la que a su vez es caracteristica de cada tipo de lignina. Por otra parte, su rendimiento es reflejo de la importancia relativa de las estructuras 8-0-4 no condensadas de la lignina en estudio.

(Lapierre y cols., 1986). La tioacidòlisis requiere muy poco material - del orden de µg de lignina - e incluso permite el anàlisis de muestras poco lignificadas (Rolando y cols., 1989; Lapierre y cols., 1988). Por esta razòn se ha empleado con èxito en el anàlisis de muestras de madera de conîferas o gimnospermas (softwood), de especies arbòreas de hojas caducas (hardwood) y de lignocelulosas de pastos (Rolando y cols., 1989; Lapierre y cols., 1988). La solvòlisis se realiza en medio anhidro utilizando dioxano como solvente, con lo cual se evita la formación de carbocationes que en la acidólisis catalizan condensaciones secundarias indeseables, disminuyendo el rendimiento de la reacción (Lapierre y cols., 1985). Otra ventaja de esta tècnica es que la recuperación relativa de residuos siringilo es màs alta que en la acidòlisis, permitiendo la obtención de resultados más exactos con respecto a la abundancia relativa de los distintos residuos H, G y S (Lapierre y cols., 1986a). Al igual que la acidòlisis, permite el anàlisis de varias (7-16) muestras en forma simultànea.

El uso de una columna capilar de CPSIL 5B, Chrompack, de 25 ò de 50 m de largo para cromatografía gaseosa es esencial para el anàlisis preciso de los monòmeros tioacidolizados. Los primeros trabajos publicados con esta tècnica mencionaron también la posibilidad de analizar dichos monòmeros mediante HPLC (Lapierre y cols., 1986a). En base a este antecedente y a la disponibilidad de cromatografía líquida en nuestro laboratorio, se intentò evaluar las muestras obtenidas mediante HPLC. Este intento no fue suficientemente informativo debido a la falta de resolución del sistema. Ninguno de los trabajos más recientes en que se utiliza la tècnica de tioacidòlisis mencionan el uso de HPLC para el anàlisis de las muestras. Debido a que con los

medios disponibles en el país no fue posible montar la tècnica, los anàlisis fueron realizados en colaboración con la Dra. C. Lapierre, de Grignon-Thiverval, Francia.

Los resultados obtenidos al analizar la lignocelulosa de trigo y su producto solubilizado por S. viridosporus T7A indican que ambos contienen una proporción relativa de los tres residuos característica de las lignocelulosas de pastos. Sin embargo, el porcentaje de residuos H, G y S es bajo comparado con valores de lignocelulosas de otras fuentes (Ver Tablas 2 y 3). Una posible explicacion para ello puede ser que la proporción de lignina de ambas muestras sea menor que la encontrada en otros vegetales equivalentes. Tambièn podria ser que la proporción de lignina condensada en la lignocelulosa y APPL es mayor que la de otras fuentes. Existen antecedentes que apoyan a ambas alternativas, al menos en el caso de los APFL. Un espectro infra-rojo de ellos muestra señales fuertes de carbohidratos y escasas de lignina (C. Lapierre, comunicación personal). Un anàlisis mediante NMR de protones de APPL mostrò también señales prominentes de hidratos de carbono y muy debiles de compuestos aromáticos, sin embargo, este resultado puede atribuirse parcialmente a la baja resolución del equipo empleado. Asi mismo, en los cromatogramas obtenidos en la tioacidòlisis, las señales de derivados de hidratos de carbono son muy significativas. For otra parte, parece ser que las lignocelulosas de pastos son más condensadas, o sea que contienen una proporción mayor de enlaces distintos a f-0-4 que son resistentes a la tioacidolisis (Lapierre y cols., 1986). Es necesario agregar que la lignocelulosa utilizada en este trabajo provino de la planta completa, exceptuando sòlo los granos y raices. En las publicaciones de otros autores no se indica si se empleò toda la planta o sòlo parte de ella, por ejemplo, el

tallo. Esto es un factor que incide en el grado de lignificación encontrado.

El resultado más relevante que muestran los estudios comparativos de lignocelulosa y APFL mediante la tècnica de la ticaciidòlisis es un menor contenido de residuos guaiacílicos (G) en el polimero soluble que en la lignocelulosa. Esta observación permite distintas interpretaciones. Una posibilidad es que dicha variación en G sería simplemente un reflejo de la heterogeneidad estructural de la lignina en la lignocelulosa. Los APPL se originarian mayoritariamente de la pared secundaria que presenta una lignina de estructura distinta a la lignina de la làmina media. Una alternativa, por cierto más atractiva, es que la disminución de residuos G se deba a una acción directa de la bacteria filamentosa sobre el sustrato. Se propone que S. viridosporus podria oxidar los $\mathbb{C} arpropto$ de los residuos aromáticos perifèricos de la lignina. Existen antecedentes en la literatura que el 40 % de los residuos 6, pero sòlo el 6 % de los residuos S, se encuentran en la periferia del polimero aromàtico (Lapierre y cols., 1988a). Por otra parte, la oxidación de los Cα afecta a la tioacidòlisis, de modo que en vez de recuperar derivados de estructura C3C6, se liberan residuos C2C6 (Lapierre y Rolando, 1988). Estos residuos modificados se detectan en el cromatograma mostrado en la Figura 21.

Al comparar las razones S/G obtenidas para las muestras de lignocelulosa y de APPL se advierte que ambos sustratos son significativamente diferentes y que estos últimos contienen menos residuos guaiacílicos que el sustrato del cual provienen. Esto significa que existirla un aumento relativo de grupos siringilo en los APPL y en consecuencia de anillos aromàticos metoxilados en el sustrato. Crawford encontrò que los APPL producidos por S.

viridosporus T7A a partir de lignocelulosa de maiz estan enriquecidos en grupos polifenòlicos (Crawford y cols., 1983). Este dato es opuesto a lo informado en este trabajo, sin embargo, es posible que las diferencias observadas se deban a las características específicas de cada sustrato. Desgraciadamente, aún no hay datos acerca de la composición de la lignocelulosa de maiz obtenidos mediante tioacidòlisis.

Las muestras tioacidolizadas de APPL fueron analizadas tambièn mediante cromatografia gaseosa acoplada a espectrometria de masas. El registro obtenido muestra una señal fuerte para residuos derivados de àcido ferúlico, como se comprobó por su patròn de fragmentación. Se ha visto que en lignocelulosas de pastos se encuentran àcidos fenòlicos como el àcido ferùlico y el àcido cumàrico (Higuchi, 1985; Lapierre y cols., 1988). El àcido cumàrico se encuentra unido en un 93 % mediante enlaces èster (Scalbert y cols., 1985). El àcido ferúlico en cambio mayoritariamente forma enlaces èter con la lignina y simultàneamente està esterificado a las hemicelulosas, produciendo entrecruzamientos entre ambos polimeros (Scalbert y cols., 1985, 1986). Aparentemente esta caracteristica del àcido ferúlico de unirse tanto a la lignina como a las hemicelulosas da cuenta de la alta solubilidad en àlcali de las lignocelulosas de gramîneas y tambiên de su baja biodigestibilidad (Scalbert y cols., 1985). El hallazgo de niveles importantes de àcido ferúlico en los APPL es interesante, puesto que su presencia podria contribuir en forma significativa a la propiedad de los APPL de ser solubles en àlcali y precipitar en medio àcido. En la sección 1.1. de Resultados se indicó que S. viridosporus T7A no metaboliza àcido ferùlico, lo que es compatible con la presencia de este compuesto en los APPL.

discutir su participación en este proceso a la luz de los resultados presentados aqui.

Tambièn es posible que los APPL se liberen en forma pasiva de la lignocelulosa, como consecuencia de la acción de las polisacaridasas. Se ha estudiado la correlación entre las actividades de celulasas y xilanasas, y la solubilización de lignocelulosas. Con mutantes de S. viridosporus T7A sobreproductoras de APPL se ha visto una correlación entre los niveles de celulasas y la producción de APPL (Crawford y cols., 1984; Deobald y Crawford, 1987), aunque este no es el caso de T. mesophila (McCarthy y cols., 1986; Mason y cols., 1988).

Experimentos recientes indican que la actividad solubilizadora de lignocelulosa en *S. cyaneus* corresponde a una sola proteina de peso molecular de alrededor de 20,000 D (Mason y cols., 1988). Este valor no coincide con el peso molecular de las celulasas y xilanasas de esa especie. No se conoce el peso molecular de las peroxidasas de *S. viridosporus*.

Acción de bacterias no filamentosas sobre compuestos aromáticos simples.

Como se describió al comienzo del capítulo 3 de Resultados, las cepas aisladas en fuentes de carbono distintas de APPL presentaron un crecimiento más discreto en este sustrato que las cepas aisladas directamente en este polímero. Esta observación es válida también para las dos cepas caracterizadas en el laboratorio que rompen dimeros de lignina. Nuevamente se llega a la conclusión que la fuente de carbono utilizada en el aislamiento inicial es determinante en cuanto a la versatilidad metabólica de las cepas seleccionadas. Trabajos sistemáticos

realizados por nuestro grupo de investigación ya habían demostrado que las propiedades de una determinada cepa guardan relación con la complejidad estructural de la fuente de carbono utilizada en su aislamiento original (González y cols., 1986).

Por otra parte, la capacidad de metabolizar polimeros ciertamente no se contrapone con la de degradar compuestos aromàticos simples. Por ejemplo, se ha descrito una cepa de Xanthomonas que mineraliza parcialmente DHPs y lignocelulosa de trigo marcada en la porción aromàtica, como también àcidos benzoicos y fenilpropanoicos (Kern, 1984).

Se ha planteado en numerosas oportunidades que los conocimientos básicos adquiridos en relación a la versatilidad metabòlica de las diferentes cepas bacterianas podría aplicarse en la construcción de cepas recombinantes que presenten una mayor eficiencia frente a uno o màs sustratos. Por esta razón importante establecer si las enzimas involucradas degradación de estos compuestos aromáticos simples relacionados y/o derivados de lignina son codificadas por genes cromosomales o plasmidiales. Como se sabe, los microorganismos procarióticos poseen un genoma relativamente pequeño y poco complejo si se compara con eucariontes, lo cual los hace muy atractivos para eventuales manipulaciones genèticas. Ademàs, estas tècnicas se han desarrollado principalmente para bacterias. La presencia de genes plasmidiales para dichas funciones metabòlicas facilitaria enormemente la manipulación génica de estas cepas.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran la existencia de plasmidios en algunas de las cepas estudiadas. A pesar de utilizar diversas estrategias experimentales, no fue posible establecer si dichos elementos extracromosomales están o no involucrados en la metabolización de los sustratos aromáticos.

Cabe hacer notar que las tècnicas de curación y conjugación se han desarrollado principalmente para £. coli y especies relacionadas. Su aplicación a Pseudomonas es aún relativamente dificil y no està bien estandarizada. Como se ha mencionado, sólo recientemente otros investigadores han logrado comprobar la existencia de plasmidios catabólicos que determinan la degradación de àcido cinàmico y ferúlico en cepas de Pseudomonas (Andreoni y Bestetti, 1986, 1988). Hasta la fecha no se ha utilizado tecnología de DNA recombinante para conferir un mayor potencial metabólico frente a compuestos relacionados con la lignina.

Metabolismo de APPL.

A comienzos de 1986 se publico un trabajo demostrando que los APPL producidos por *S. viridosporus* no son modificados sustancialmente al ser incubados en presencia de diferentes especies de *Streptomyces* y de *P. chrysosporium* (Pometto y Crawford, 1986). Puesto que los APPL deben ser degradados en la naturaleza, decidimos estudiar si existen bacterias no filamentosas capaces de utilizarlos como única fuente de carbono y energía. Se encontraron diversas cepas bacterianas con estas características. Como era de esperar, la mayoría de ellas pertenece a la familia de las *Pseudomonas*.

La degradación de un sustrato complejo y heterogêneo como son las lignocelulosas y también los APPL, exige la participación de una serie de actividades enzimàticas diferentes, las que no necesariamente deberían encontrarse en un mismo microorganismo. En este sentido, es sintomàtico que entre los cultivos encontrados, el que se desarrolla mejor en APPL sea un cultivo

mixto. Se han podido establecer distintos tipos de interacciones entre dos o más especies para la metabolización de compuestos tóxicos y/o muy difíciles de metabolizar (Slater y Lovatt, 1984; Omori y cols., 1987). Probablemente la asociación de especies diferentes para formar comunidades microbiológicas sea una estrategia general para degradar sustratos complejos en la naturaleza.

Se observò también que los diversos cultivos son muy sensibles a interrupciones de su agitación en el transcurso de la incubación. Es por esta razón que las densidades ópticas determinadas para las tres cepas en las curvas de crecimiento son bastante inferiores a las observadas en cultivos agitados en forma ininterrumpida. Los motivos que explican este comportamiento son a la fecha desconocidos.

Los anàlisis mediante tècnicas fisico-quimicas de los APFL recuperados despuês de ser incubados con las diversas cepas no mostraron cambios significativos con respecto a los controles sin inòculo. Como se describiò en el capitulo correspondiente, no se observaron despolimerizaciones, decoloraciones ni tampoco polimerizaciones del sustrato. Estos resultados en realidad no son sorprendentes, puesto que para que ocurran modificaciones de este tipo, las bacterias debieran poseer la capacidad de atacar un polimero tridimensional, estereoirregular y que contiene un gran nûmero de enlaces y anillos aromàticos diferentes. La peroxidasa de lignina de P. chrysosporium es capaz de actuar sobre la lignina porque posee justamente un mecanismo de acción inespecífico que permite atacar esta gran variedad de estructuras (Tien, 1987). Por el contrario, los trabajos realizados con bacterias muestran en general que su acción es relativamente especifica (Vicuña, 1988; González y cols., 1986). Por ejemplo,

la enzima de *P. fluorescens* Biovar I A: que rompe el enlace \$-1 en determinados compuestos modelo de lignina es intracelular y muy específica en cuanto a los requerimientos estructurales del sustrato (Gonzàlez, 1988; Gonzàlez y Vicuña, 1989).

En este trabajo se decidiò analizar los espectros de fluorescencia de los APPL para determinar posibles modificaciones introducidas en el sustrato por acción bacteriana. Este tipo de espectro generalmente es más sensible y específico que otros mètodos espectroscòpicos, porque en mùltiples casos presenta picos pequeños (fine-structure) que puede dar información acerca de la estructura del compuesto en estudio (Guilbault, 1973). Ademàs, como se mencionò en Resultados, la mayoría de los compuestos aromáticos fluorescen, y cambios en los sustituyentes del anillo afectan su fluorescencia (Guilbault, 1973). En este caso no se detectaron cambios en los espectros de emisión luego de incubar con las diferentes bacterias, lo cual probablemente significa que los cambios a nivel de sustituyentes del anillo no fueron masivos. Los espectros de emisión se registraron en presencia y ausencia de oxigeno, porque està descrito que en muchos compuestos el oxigeno hace disminuir la fluorescencia (Guilbault, 1973).

A pesar que las cepas bacterianas mencionadas no despolimerizan o consumen cuantitativamente a los APPL, el crecimiento observado involucra necesariamente modificaciones de algún componente del sustrato. Como se demostro mediante los análisis de hidratos de carbono, dos de las cepas aisladas en APPL consumen algunos azúcares en el sustrato, según un patron específico para cada especie. Otras cepas producen variaciones en la porción aromática que son estadísticamente significativas con respecto al control sin inòculo. Por ejemplo, la cepa *Pseudomonas*

E21 y el cultivo mixto V12 consumen uno o màs azùcares de las hemicelulosas, pero no producen variaciones apreciables en la porciòn aromàtica del sustrato. En cambio la cepa Pseudomonas B23 no degrada los componentes glucídicos de los APPL, pero sí se observan cambios a nivel de la composición de residuos aromàticos. La cepa de referencia P. fluorescens Biovar I A_1 , que metaboliza compuestos modelo de estructura P-1 y P-0-4, produce también cambios significativos en la porción aromàtica del sustrato. Estos resultados permiten concluir entonces que en lineas generales, las cepas seleccionadas en APPL consumen uno u otro componente del sustrato, según sus capacidades metabólicas individuales. Llama la atención que ninguna cepa produjo simultàneamente modificaciones estadísticamente significativas en ambos componentes del sustrato.

Las características de los diversos cultivos con respecto capacidad de metabolizar monosacàridos, hemicelulosas, celulosa, compuestos aromàticos simples y diversos modelos dimèricos de lignina incluidos en este trabajo se complementan relativamente bien con los resultados obtenidos de las mediciones directas en los APPL incubados con las diversas cepas. Ninguno de los cultivos es capaz de crecer en las diferentes preparaciones de celulosa, lo cual es concordante con los niveles de glucosa encontrados en los APPL al tèrmino de las incubaciones con consumo de monosacâridos y las diversas baterias. El hemicelulosas por parte de las cepas que muestran un mejor crecimiento en APPL es consistente con los resultados obtenidos mediante el anàlisis de los acetatos de alditoles (Pseudomonas E21 y el consorcio V12). La correlación no es clara en el caso de *Pseudomonas* Bes, que no consume significativamente azücares de los APPL, ni metaboliza monosacàridos, pero aparentemente si

podría modificar hemicelulosas, aún cuando no las utilice como fuente de carbono. Las diferencias encontradas entre lo observado en APPL y en las hemicelulosas pueden deberse a las propiedades de cada preparación comercial de éstas, que provienen de diferentes especies vegetales. Puesto que no se dispone de más conocimientos de la estructura de las hemicelulosas en los APPL, es muy difícil profundizar en este análisis o proyectar resultados obtenidos con un sustrato de estructura desconocida. Por ejemplo, la accesibilidad de un mismo tipo de residuos puede ser muy variable en cada uno de los diferentes sustratos, dependiendo entre otros factores, del grado de ramificación que presenten. Por otra parte, se desconoce el largo de cadena de los polisacáridos presentes en los APPL, lo cual también podría influir en forma importante.

Los anàlisis de la porción aromàtica de los sobrenadantes de los cultivos con APPL también muestran efectos bacterianos interesantes. El número de casos analizados de cada muestra permite hacer un buen anàlisis estadístico. Sin embargo, los valores obtenidos para los distintos residuos (G y S) son menores a los observados por los APPL sin incubar. Aparentemente, èsto se debe al gran contenido de sales de dichas muestras, las que provienen del medio de cultivo bacteriano. Debido a la posible liberación de oligómeros aromáticos al medio en el transcurso de la incubación, no es recomendable dializar estas muestras antes de someterlas al proceso de liofilización. Actualmente se desconoce el efecto de altas concentraciones de sal sobre la tioacidòlisis. Ademàs, la trimetilsililación de muestras tipacidolizadas parece ser menor o más dificultosa en presencia de sales. Cualquiera de estos dos factores o la combinación de ambos serian los responsables de los bajos valores obtenidos.

La tioacidòlisis muestra que los cultivos de V12 y Pseudomonas E2: no alteran la porción aromàtica de los APPL, lo que està de acuerdo con la incapacidad de estas cepas de romper dimeros. Sin embargo, la cepa *Pseudomonas* Bes produce una disminución significativa de residuos G y S de los APPL a pesar de que no metaboliza compuestos dimèricos. Por su parte, la cepa P. fluorescens Biovar I A: presenta una gran versatilidad para metabolizar compuestos modelo de lignina, lo cual se ve reflejado en los resultados de tioacidòlisis. No se obtuvieron cambios estadisticamente significativos en los porcentajes de residuos. G y S recuperados despues de una incubación con la cepa P. acidovorans Da, a pesar de que esta cepa rompe eficientemente los enlaces de estructura f-0-4. Sin embargo, hay diversos factores adicionales que considerar. Por ejemplo, es lògico pensar que cambios a nivel de sustituyentes del anillo también puedan reflejarse en los porcentajes recuperados de cada tipo de residuo. De este modo podrian explicarse cambios en la composición aromàtica aún cuando no exista ruptura de enlaces intermonomèricos. Tambièn podrian ocurrir modificaciones de la cadena alifàtica de los residuos, alterando la susceptibilidad de la estructura fenilpropanoica a la ruptura por tioacidòlisis. Ademàs, es necesario tener en cuenta que todos los compuestos aromàticos se ensayaron como única fuente de carbono en el medio de cultivo. Podria darse el caso de una cepa capaz de modificar un compuesto de este tipo, pero que no pudiera utilizarlo para su desarrollo. En resumen, los resultados obtenidos indican que la versatilidad de las diversas cepas para metabolizar dimeros, monômeros, monosacàridos y polisacàridos poseen un valor indicativo, aunque no absoluto, del efecto de cada una de estas cepas sobre los APPL.

En este contexto es oportuno mencionar que en el rumen de ovejas y bovinos alimentados con pastos se han encontrado polimeros solubles formados por material polifenólico unido covalentemente a carbohidratos (Conchie y cols., 1988). Aparentemente estos complejos solubles son refractarios al ataque de los microorganismos ruminales (Conchie y cols., 1988). Estos polimeros ruminales poseen propiedades semejantes a los APPL. Por ejemplo, también son insolubles a pH bajo. Al igual que los APPL, los complejos ruminales solubles son de peso molecular heterogêneo y presentan una distribución bimodal, siendo parcialmente excluidos en una columna de Sephadex 6-50. La composición de carbohidratos (5,5 % promedio) varia en subfracciones separadas por peso molecular, siendo glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa y fucosa sus componentes mayoritarios. Ademàs contienen un porcentaje de nitrògeno comparable al encontrado en APPL (4,33 y 2,02 %, respectivamente). Los datos presentados son muy sugerentes, en el sentido que existiria también en este sistema un residuo importante de lignocelulosa de pastos resistente a biodegradación bacteriana. Ambos complejos son quimicamente heterogèneos y presentan características físico-quimicas similares.

Acción de 6. applanatum y de peroxidasa de lignina sobre APPL.

Por último, nos interesò investigar la capacidad de los hongos y de sus enzimas de modificar los APPL.

En base a mediciones espectrofotomètricas y de cromatografia de exclusión en gel, se pudo comprobar que G. applanatum no modifica sustancialmente los APPL adicionados a

cultivos con micelios desarrollados. En las mismas condiciones de cultivo se observò decoloración de Azul de Remazol, lo que es indicativo de que el hongo excreta oxidasas al fluido extracelular. Otros investigadores han detectado lacasa en cultivos de G. applanatum (E. Agosin y M. Cotoràs, comunicacion personal). En forma posterior a los experimentos aqui presentados, ellos han encontrado que la lacasa es secretada durante los primeros días de crecimiento del microorganismo y luego disminuye hasta desaparecer al sèptimo dia. En las incubaciones con APPL se buscò lacasa y peroxidasa sin detectarse actividad. Cabe mencionar que si bien los cultivos con APPL se iniciaban cuando el hongo ya llevaba ocho dias de crecimiento, la masa miceliar continuaba aumentando por varios días más. La actividad de ligninasa en esta especie ha sido buscada insistentemente por dos grupos de investigación la han (E. Agosin y A. Gonzàlez, comunicación personal). Recientemente, luego de finalizar el trabajo experimental de esta tesis, se logrò detectar Mn-peroxidasa en G. applanatum (M. Cotoras y E. Agosin, comunicación personal).

Datos preliminares de experimentos equivalentes con *P. chrysosporium* que no se incluyeron en esta tesis, mostraron que se produce una polimerización de los APPL. Estos se adicionaron al medio durante la etapa de metabolismo secundario del hongo, es decir, luego de haberse detectado experimentalmente la presencia de ligninasa. En cultivos a los cuales se agregó APPL desde el comienzo se observó polimerización de ellos a partir del cuarto día. En estas condiciones se comprobó un efecto marcado de alcohol veratrilico sobre el grado de polimerización del sustrato. Es llamativo que los APPL no sean degradados totalmente por este basidiomicete, que se considera el

microorganismo ligninolítico por excelencia.

Utilizando preparaciones concentradas de peroxidasa de lignina de *P. chrysosporium* se encontrò que en presencia de peròxido de hidrògeno la ligninasa no afecta a los APPL *in vitro*. Esta observación se repitiò aún al prolongar las incubaciones durante una hora o màs, y coincide con resultados no publicados de otros autores (R. Crawford, comunicación personal). Tampoco se detectò algún cambio al variar la concentración de H₂O₂. Recientemente se publicò que el alcohol veratrílico posee un efecto protector sobre la actividad de la enzima (Tonon y Odier, 1988). Los ensayos descritos en este trabajo se realizaron en ausencia de dicho metabolito y es posible que la ligninasa se inactive en el medio de cultivo por esta causa.

Los datos presentados aqui y los antecedentes publicados por otros autores indican que los APPL son muy refractarios al ataque de microorganismos. La hipòtesis planteada con respecto a una degradación de APPL por acción de bacterias no filamentosas ha resultado cumplirse sólo parcialmente. Una fracción importante del sustrato aparentemente sigue intacta. Asimismo, los datos mostrados en relación a hongos sugieren que tampoco ocurre una despolimerización del material soluble derivado de lignocelulosa. El hecho que los APPL sean fundamentalmente refractarios a hongos y bacterias otorga una mayor importancia relativa a las bacterias en la lenta disgregación de residuos derivados de lignocelulosa. El conjunto de estos resultados nos vuelve a enfrentar a la pregunta inicial respecto al destino final de los APPL.

Como ya se mencionò en la Introducción, los actinomicetes estàn involucrados en la formación de humus. Este componente de difícil definición de los suelos està formado principalmente por

àcidos húmicos y polisacáridos. Los ácidos húmicos a su vez son complejos polímeros de fenoles y ácidos benzoicos unidos a péptidos, azúcares y otros compuestos alifáticos y aromáticos (Martin y Haider, 1980). Sugerentemente, el polímero solubilizado por acción de *T. mesophila* sobre lignocelulosa de trigo presenta una gran similitud con los ácidos húmicos, especialmente en lo que respecta a análisis elemental y su caracter insoluble en medio ácido (McCarthy y cols., 1986). Aunque no hay evidencias concretas, se podría especular que el destino final de los APPL sería formar parte del humus propiamente tal. Una forma de comprobar esta hipótesis consistiría en preparar APPL marcados con un isótopo radiactivo, incubarlos con muestras de suelos (o en experimentos en terreno) y cuantificar su recuperación en la fracción de ácidos húmicos al término de incubaciones prolongadas, del orden de semanas o meses.

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis, se pueden plantear algunas consideraciones acerca de la estrategia que debe adoptarse para continuar con el estudio de la biodegradación de los APPL. En primer lugar, es útil tener presente que es muy posible que sean varios los microorganismos que actúen sobre el sustrato en estudio, ya sea en forma simultànea o alternada. De ser èste el caso, el efecto individual de cada cepa sobre el sustrato puede ser minimo. Cada uno de los integrantes del sistema actúa sólo en una etapa específica, realizando modificaciones limitadas difíciles de detectar. En segundo lugar, el caràcter refractario de los APPL generados (y de la lignina en general) hace recomendable pensar en la dimensión temporal del proceso de su biodegradación. Algunas etapas pueden ocurrir en forma ràpida, mientras que otras podrían

requerir un perlodo de tiempo que difiere en ôrdenes de magnitud de las primeras.

Un enfoque experimental factible consistiría en aislar una comunidad microbiològica estable en un quimiostato utilizando suelos ricos en materia orgànica como fuente de cepas. Este sistema resulta apropiado puesto que permite incubaciones mucho màs prolongadas (del orden de semanas o meses) con un control preciso de paràmetros importantes para la fisiología del cultivo. La comunidad microbiològica hipotètica probablemente pueda en conjunto ejercer un efecto mayor (sinèrgico) sobre el sustrato con respecto a aquel logrado por cada cepa individual o combinaciones entre ellas. En favor de esta proposición existe el antecedente que se han logrado co-cultivos de microorganismos aeròbicos y anaeròbicos que en conjunto degradan lignocelulosa y fijan nitrògeno (Veal y Lynch, 1984).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- Adler, E., Lindgren, B.O. y Saeden, U. (1952). The beta-guaiacyl ether of alpha-veratrylglycerol as a lignin model. Svensk Papperstidn. **15**, 245-253.
- Andreoni, V. y Bestetti. G. (1986). Comparative analysis of different *Pseudomonas* strains that degrade cinnamic acid. Appl. Environ. Microbiol. **52**, 930-934.
- Andreoni, V. y Bestetti, G. (1988). Ferulic acid degradation encoded by a catabolic plasmid. FEMS Microbiol. Ecology 53, 129-132.
- Antai, S.P. y Crawford, D.L. (1981). Degradation of softwood, hardwood and grass lignocellulose by two *Streptomyces* strains. Appl. Environ. Microbiol. **42**, 378-380.
- Antai, S.P. y Crawford, D.L. (1988). Degradation of phenol by Streptomyces setonii. Can. J. Microbiol. 29, 142-143.
- Barder, M.J. y Crawford, D.L. (1981). Effects of carbon and nitrogen supplementation on lignin and cellulose decomposition by a Streptomyces. Can. J. Microbiol. 27, 859-863.
- Bayly, R.C. y Barbour, M.G. (1984). The degradation of aromatic compounds by the meta and gentisate pathways: Biochemistry and regulation. En: "Microbial degradation of organic compounds". D.T. Gibson (ed.). Marcel Dekker, Inc. N.Y. pp 253-294.
- Benner, R., Moran, M.A. y Hodson, R.E. (1986). Biochemical cycling of lignocellulosic carbon in marine and freshwater ecosystems: Relative contributions of procaryotes and eucaryotes. Limnol. Oceanogr. 31, 89-100.
- Bezanson, G.S., Desaty, D., Emes, A.V. y Vining, L.C. (1970). Biosynthesis of cinnamamide and detection of phenylalanine ammonia-lyase in *Streptomyces verticillatus*. Can. J. Microbiol. 16, 147-151.
- Biely, P. (1985). Microbial xylanolytic systems. Trends in Biotech. 3, 286-290.
- Blakeney, A.B., Harris, P.J., Henry, R.J. y Stone, B.A. (1982). Gas chromatography of alditol acetates on a high-polarity bonded-phase vitreous-silica column. J. Chrom. **249**, 180-182.
- Borgmeyer, J.R. y Crawford, D.L. (1985). Production and characterization of polymeric lignin degradation intermediates from two different *Streptomyces* spp. Appl. Environ. Microbiol. 49, 273-278.
- Bouanchaud, D., Scavizzi, M.R. y Chabbert, Y.A. (1969). Elimination by ethidium bromide of antibiotic resistance in enterobacteria and staphylococci. J. Gen. Microbiol. **54**, 417-425.
- Chakrabarty, A.M. (1972). Genetic basis of the biodegradation of salicylate in *Pseudomonas*. J. Bact. 112, 815-823.

- Chen, W., Ohmiya, K. y Shimizu, S. (1986). Protoplast formation and regeneration of dehydrodivanillin-degrading strains of Fusarium varium and Enterococcus faecium. Appl. Environ. Microbiol. **52**, 612-616.
- Chen, W., Ohmiya, K. y Shimizu, S. (1987). Intergeneric protoplast fusion between *fusarium varium* and *Enterococcus faecium* for enhancing dehydrodivanillin degradation. Appl. Environ. Microbiol. **53**, 542-548.
- Clarke, P.H. y Ornston, L.N. (1975). Metabolic pathways and regulation.I. En: "Genetics and biochemistry of *Pseudomonas*". P.H. Clarke y M.H. Richmond (eds.). John Wiley and Sons, London, pp 191-261.
- Collendavelloo, J., Legrand, M. y Fritig, B. (1983). Plant diseases and the regulation of enzymes involved in lignification. Plant Physiol. 73, 550-554.
- Conchie, J., Hay, A.J. y Lomax, J.A. (1988). Soluble lignin-carbohydrate complexes from sheep rumen fluid: Their composition and structural features. Carbohydrate Res. 177, 127-151.
- Crawford, D.L. y Crawford, R.L. (1976). Microbial degradation of lignocellulose: The lignin component. Appl. Environ. Microbial. 31, 714-717.
- Crawford, D.L. (1978). Lignocellulose decomposition by selected Streptomyces strains. Appl. Environ. Microbiol. 36, 1041-1045.
- Crawford, R.L. (1981). Lignin biodegradation and transformation. John Wiley and Sons, Inc. N.Y.
- Crawford, R.L., Bromley, J.W. y Perkins-Olson, P.E. (1979). Catabolism of protocatechuate by *Bacillus macerans*. Appl. Environ. Microbiol. **37**, 614-618.
- Crawford, R.L., Crawford, D.L. y Dizikes, G.J. (1981). Catabolism of the lignin substructure model compound dehydrodivanillin by a lignin-degrading Streptomyces. Arch. Microbiol. 129, 204-209.
- Crawford, D.L., Sutherland, J.B., Pometto, A.L. III y Miller, J.M. (1982). Production of aromatic aldehyde oxidase by Streptomyces viridosporus. Arch. Microbiol. 131, 351-355.
- Crawford, D.L., Pometto, A.L. III y Crawford, R.L. (1983). Lignin degradation by Streptomyces viridosporus: Isolation and characterization of a new polymeric lignin degradation intermediate. Appl. Environ. Microbiol. 45, 898-904.
- Crawford, D.L., Pometto, A.L. III y Deobald, L.A. (1983a). The pathway of lignin degradation by Streptomyces: Chemistry and enzymology. En: "Recent Advances in lignin biodegradation research". T. Higuchi, H.-m. Chang y T.K. Kirk (eds.). Unipublishers, Co. Ltd. Tokio, pp 78-95.
- Crawford, D.L., Pettey, T.M., Thede, B.M. y Deobald, D. (1984). Genetic manipulation of ligninolytic *Streptomyces* and generation of improved lignin-to-chemical bioconversion strains. Biotechnol. Bioeng. Symp. N° 14, 241-256.

- Daniel, G., Nilsson, T. y Singh, A.P. (1987). Degradation of lignocellulosics by unique tunnel-forming bacteria. Can. J. Microbiol. 33, 943-948.
- Deobald, L.A. y Crawford, D.L. (1987). Activities of cellulase and other extracellular enzymes during lignin solubilization by Streptomyces viridosporus. Appl. Microbiol. Biotechnol. 26, 158-163.
- Deschamps, A.M., Mahoudeau, G. y Lebeault, J.M. (1980). Fast degradation of kraft lignin by bacteria. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 9, 45-51.
- Dill, I. y Kraepelin, G. (1986). Palo podrido: Model for extensive delignification of wood by *Ganoderma applanatum*. Appl. Environ. Microbiol. **52**, 1305-1312.
- Eaton, D., Chang, H.-m. y Kirk, T.K. (1980). Fungal decolorization of kraft bleach plant effluents. Tappi J. 63, 103-109.
- Faison, B.D. y Kirk, T.K. (1985). Factors involved in the regulation of a ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. **49**, 299-304.
- Faison, B.D., Kirk, T.K. y Farrell, R.L. (1986). Role of veratryl alcohol in regulating ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. **52**, 251-254.
- Farrell, R.L., Belew, M.E., Maione, T.E. y Sadownick, B.A. (1988). Cloning ligninolytic enzymes. En: "Biochemistry and genetics of cellulose degradation." Proceedings of the Federation of Microbiological Societies (J.P. Aubert, P. Beguin y J. Millet, eds.). Simposio N°43, 7-9 de septiembre, 1987, pp 349-364.
- Fenn, P. y 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.
- Franklin, F.C.H., Bagdasarian, M., Bagdasarian, M.M. y Timmis, K.N. (1981). Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWWO from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated ring meta cleavage pathway. Froc. Nat. Acad. Sci. USA 78, 7458-7462.
- Fukuzumi, T. (1980). Microbial decolorization and defoaming of pulp waste liquors. En: "Lignin biodegradation: Microbiology, chemistry and potential applications". T.K. Kirk, T. Higuchi y H.-m. Chang (eds.). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, pp 161-177.
- Furukawa, K. y Miyazaki, T. (1986). Cloning of a gene cluster encoding biphenyl and chlorobiphenyl degradation in *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. J. Bact. **166**, 392-398.
- Gibson, D.T. y Subramanian, V. (1984). Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. En: "Microbial degradation of organic compounds". D.T. Gibson (ed.). Marcel Dekker, Inc. N.Y. pp 181-252.

Glenn, J.K. y Gold, M.H. (1983). Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. **45**, 1741-1747.

Gonzàlez, A., Grinbergs, J. y Griva, E. (1986). Biologische Umwandlung von Holz in Rinderfutter - "Palo podrido". Zentralbl. Mikrobiol. **141**, 181-186.

Gonzàlez, B. (1988). Degradación bacteriana de lignina: Acción de bacterías aisladas de la naturaleza sobre compuestos dimèricos modelo de lignina. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biològicas con mención en Biología Celular.

Gonzàlez, B., Merino, A., Almeida, M. y Vicuña, R. (1986). Comparative growth of natural bacterial isolates on various lignin-related compounds. Appl. Environ. Microbiol. **52**, 1428-1432.

González, B., Olave, I., Calderòn, I. y Vicuña, R. (1988). Degradation of diarylethane structures by *Pseudomonas fluorescens* biovar I. Arch. Microbiol. **149**, 389-394.

Gonzàlez, B. y Vicuña, R. (1989). Benzaldehyde lyase from *Pseudomonas fluorescens* Biovar I: A novel thiamine pyrophosphate-requiring enzyme. J. Bact. En prensa.

Goodfellow, M. y Williams, S.T. (1983). Ecology of Actinomycetes. Ann. Rev. Microbiol. 37, 189-216.

Goycoolea, M., Seelenfreund, D., Rüttimann, C., González, B. y Vicuña, R. (1986). Monitoring bacterial consumption of low molecular weight lignin derivatives by high performance liquid chromatography. Enzyme Microb. Technol. 8, 213-216.

Guibault, G.G. (1973). Practical fluorescence, theory, methods and techniques. Marcel Dekker, Inc., N.Y. pp 9-87.

Haas, D. (1983). Genetic aspects of biodegradation by pseudomonads. Experientia **39**, 1199-1213.

Haemmerli, S.D., Leisola, M.S.A. y Fiechter, A. (1986). Polymerization of lignins by ligninases from *Phanerochaete chrysosporium*. FEMS Microbiol. Lett. **35**, 33-36.

Haider, K., Trojanowski, J. y Sundman, V. (1978). Screening for lignin degrading bacteria by means of **C-labelled lignins. Arch. Microbiol. 119, 103-106.

Haider, K. y Trojanowski, J. (1981). Mikrobieller Abbau von **Cund ³⁵8- markierten Ligninsulfonsäuren durch Pilze, Bakterien oder Mischkulturen. Holzforschung **35**, 33-38.

Hammel, K.E., Kalyanaraman, B. y Kirk, T.K. (1986). Substrate free radicals are intermediates in ligninase catalysis. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 83, 3702-3712.

Haraguchi, T. y Morohoshi, N. (1976). Degradation of lignosulfonate by *Streptomyces* (S-5). Bull. Exp. Forests, Tokyo University of Agriculture and Technology, N° 13, 45-53.

Higuchi, T. (1985). Biosynthesis of lignin. En: "Biosynthesis and

biodegradation of wood components". T. Higuchi (ed.). Academic Press, Inc., Orlando, Florida, pp 141-160.

Higuchi, T. (1985a). Degradative pathways of lignin model compounds. En: "Biosynthesis and biodegradation of wood components". T. Higuchi (ed.). Academic Press, Inc., Orlando, Florida, pp 557-578.

Hosoya, H. y Tomikuza, N. (1984). An improved transformation method of *Pseudomonas aeruginosa*. Report of the Fermentation Research Inst. Japan Nº 61, 53-57.

Janshekar, H., Brown, C., Haltmeier, T., Leisola, M.S.A. y Fiechter, A. (1982). Bioalteration of kraft pine lignin by *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Microbiol. **132**, 14-21.

Janshekar, H. y Fiechter, A. (1983). Lignin: Biosynthesis, applications and biodegradation. En: "Advances in biochemical engineering / biotechnology". A. Fiechter y T.W. Jeffries (eds.). Springer Verlag, Berlin, 27, 119-178.

Jeffries, T.W., Choi, S. y Kirk, T.K. (1981). Nutritional regulation of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. **42**, 290-296.

Johnson, P. y Grossman, L. (1977). Electrophoresis of DNA in agarose gels. Optimizing separations of conformational isomers of double- and single stranded DNAs. Biochemistry 16, 4217-4225.

Jokela, J., Pellinen, J., Salkinoja-Salonen, M. y Brunow, G. (1985). Biodegradation of two tetrameric lignin model compounds by a mixed bacterial culture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23, 38-46.

Jokela, J., Pellinen, J. y Salkinoja-Salonen, M. (1987). Initial steps in the pathway for bacterial degradation of two tetrameric lignin model compounds. Appl. Environ. Microbiol. 53, 2642-2649.

Kado, C. y Liu, S. (1981). Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J. Bact. **145**, 1365-1373.

Kaplan, D.L. y Hartenstein, R. (1980). Decomposition of lignins by microorgnisms. Soil Biol. Biochem. 12,65-75.

Katayama, Y. y Fukuzumi, T. (1979). Bacterial degradation of dimers structurally related to lignin. III. Metabolism of -veratryl -\rho\-guaiacylpropionic acid and D.L- pinoresinol by Pseudomonas putida. Mokuzai Gakkaishi 25, 67-76.

Katayama, Y., Nikishawa, S., Murayama, A., Yamasaki, M., Morohoshi, N. y Haraguchi, T. (1988). The metabolism of biphenyl structures in lignin by the soil bacterium *Pseudomonas paucimobilis* SYK-6. FEBS Letts. **233**, 129-133.

Kawakami, H. y Ohyama, T. (1980). Bacterial degradation of lignin. II. Deegradation of kraft lignin by pseudomonads isolated from natural wastes. Mokuzai Gakkaishi **26**, 564-570.

Kelley, R.L. y Reddy, C.A. (1986). Purification and characterization of glucose oxidase from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. J. Bact. **166**, 269-274.

- Kern, H.W. (1984). Bacterial degradation of dehydropolymers of coniferyl alcohol. Arch. Microbiol. 138, 18-25.
- Kern, H.W. y Kirk, T.K. (1987). Influence of molecular size and ligninase pretreatment on degradation of lignins by *Xanthomonas* sp. strain 99. Appl. Environ. Microbiol. **53**, 2242-2246.
- Kersten, P.J., Tien, M. Kalyanaraman y Kirk, T.K. (1985). The ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* generates cation radicals from methoxybenzenes. J. Biol. Chem. **260**, 2609-2612.
- Kersten, P.J. y Kirk, T.K. (1987). Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase in extracellular HaO2 production by Phanerochaete chrysosporium. J. Bact. 169, 2195-2201.
- Kirk, T.K. (1984). Degradation of lignin. En: Microbial degradation of organic compounds". D.T. Gibson (ed.). Marcel Dekker, Inc., N.Y. pp 399-437.
- Kirk, T.K. (1987). Lignin degrading enzymes.Phil. Trans. R. Soc. Lond. A 321, 461-474.
- Kirk, T.K. y Adler, E. (1970). Methoxy-deficient structural elements in lignin of sweetgum decayed by a brown-rot fungus. Acta Chem. Scand. 24, 3379-3390.
- Kirk, T.K., Schulz, E., Connors, W.J., Lorenz, L.F. y Zeikus, J.G. (1978). Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Microbiol. **117**, 277-285.
- Kirk, T.K. y Shimada, M. (1985). Lignin biodegradation: The microorganisms involved and the physiology and biochemistry of degradation by white rot fungi. En: "Biosynthesis and biodegradation of wood components". T. Higuchi (ed.). Academic Press, Inc., Orlando, Florida, pp 579-605.
- Kirk, T.K., Croan, S., Tien, M., Murtagh, K.E. y Farrell, R.L. (1986). Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: Effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. Enzyme and Microb. Technol. **8**,27-32.
- Kirk, T.K. y Farrell, R.L. (1987). Enzymic "combustion": The microbial degradation of lignin. Ann. Rev. Microbiol. 41, 465-505.
- Kuwahara, M., Glenn, J.K., Morgan, M. y Gold, M.H. (1984). Separation and characterization of two extracellular H2O2-dependent oxidases from ligninolytic cultures of Phanerochaete chrysosporium. FEBS Lett. 169, 247-250.
- Landucci, L.L., Geddes, S.A. y Kirk, K.T. (1981). Synthesis of **C-labelled 3-methoxy-4-hydroxy- - (2 methoxyphenoxy) -\$\begin{align*} -\beta-\text{hydroxypropiophenone}, a lignin model compound. Holzforschung 35, 67-70.
- Lapierre, C., Monties, B. y Rolando, C. (1984). Structure des lignines: évaluation des liaisons arylglycérol-aryléthers par thioacidolyse. C. R. Acad. Sc. Paris, t299, Sèrie III, 11, 441-444.

Lapierre, C., Monties, B. y Rolando, C. (1985). Thioacidolysis of lignin: Comparison with acidolysis. J. Wood Chem. Technol. 5, 277-299.

Lapierre, C., Scalbert, A., Monties, B. y Rolando, C. (1986). La thioacidolyse, une nouvelle methode de caracterisation des lignines: application aux lignines de paille de blè. Journeès internationales d'ètude du groupe polyphènols. Bull. Liaison Groupe Polyphènols 13, 128-135.

Lapierre, C., Monties, B. y Rolando, C. (1986a). Thioacidolysis of poplar lignins: Identification of monomeric syringyl products and characterization of guaiacyl-syringyl lignin fractions. Holzforschung 40, 113-118.

Lapierre, C. y Rolando, C. (1988). Thioacidolyses of pre-methylated lignin samples from pine compression and poplar woods. Holzforschung 42, 1-4.

Lapierre, C., Jouin, D. y Monties, B. (1988). Lignin characterization of wheat straw samples as determined by chemical degradation procedures. Workshop Rowett Res. Inst., Bucksburn, Aberdeen, 21-23 de junio.

Lapierre, C., Monties, B. y Rolando, C. (1988). Thioacidolyses of diazomethane-methylated pine compression wood and wheat straw in situ lignins. Holzforschung. En prensa.

Leisola, M.S.A., Thanei-Wyss, U. y Fiechter, A. (1985). Strategies for production of high ligninase activities by *Phanerochaete chrysosporium*. J. Biotechnol. 3, 97-107.

Leisola, M.S.A., Kozulic, B., Muessdoerfer, F. y Fiechter, A. (1987). Homology among multiple extracellular peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. J. Biol. Chem. **262**, 419-424.

Leonowicz, A. y Grzywnowicz, K. (1981). Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using siringaldazine as a substrate. Enzyme Microb. Technol. 3, 55-58.

Livernoche, D., Jurasek, L., Desrochers, M. y Veliky, I.A. (1981). Decolorization of a kraft mill effluent with fungal mycelium immobilized in calcium alginate gel. Biotechnol. Lett. 3, 701-705.

Lundquist, K. y Kirk, K.T. (1971). Acid degradation of lignin. IV. Analysis of lignin acidolysis products by gas chromatography using trimethylsilyl derivatives. Acta Chem. Scand. **25**, 889-894.

Lundquist, K. y Kirk, K.T. (1978). *De novo* synthesis and decomposition of veratryl alcohol by a lignin-degrading basidiomycete. Phytochemistry **17**, 1676.

Lundquist, K. y Kirk, K.T. (1980). Fractionation-purification of an industrial kraft lignin. Tappi J. 63, 80-82.

Mason, J.C., Richards, M., Zimmermann, W. y Broda, P. (1988). Identification of extracellular proteins from actinomycetes responsible for the solubilization of lignocellulose. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28, 276-280.

Mateles, R.I., Barvah, J.N. y Tannenbaum, S.R. (1967). Growth of

thermophilic bacterium on hydrocarbons: A new source of single cell protein. Science 157, 1322-1323.

McCarthy, A.J. (1987). Lignocellulose-degrading actinomycetes. FEMS Microbiol. Rev. **46**, 145-163.

McCarthy, A.J. y Broda, P. (1984). Screening for lignin-degrading actinomycetes and characterization of their activity against C¹⁴ lignin-labelled wheat lignocellulose. J. Gen. Microbiol. 130, 2905-2913.

McCarthy, A.J., Paterson, A. y Broda, P. (1986). Lignin solubilization by *Thermomonospora mesophila*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **24**, 347-352.

Methods of analysis of the AOAC. (1980). Mětodo de Kjehldahl mejorado. N° 2058, 13era ed.

Nambudiri, A.M.D., Bhat, J.V. y Subba-Rao, P.V. (1972). Conversion of p-coumarate into caffeate by *Streptomyces nigrifaciens*. Biochem. J. **130**, 425-433.

Nelson, N. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. J. Biol. Biochem. **153**, 375-380.

Nilsson, T. y Singh, A.P. (1983). Cavitation bacteria. Int. Res. Group on Wood Preservation. Working group I. Biological problems IRG/WP/1235, 14.

Nilsson, T. y Daniel, G. (1983). Tunneling bacteria. Int. Res. Group on Wood Preservation. Working group I. Biological problems IRG/WP/1186. 19.

Nishida, A. y Eriksson, K.E. (1987). Formation, purification and partial characterization of methanol oxidase, a H2O2-producing enzyme in *Phanerochaete chrysosporium*. Biotech. Appl. Biochem. 9, 325-338.

Odier, E. y Rolando, C. (1985). Catabolism of arylglycerol-f-arylethers lignin model compounds by *Pseudomonas cepacia* 122. Biochimie **67**, 191-197.

Omori, T., Kimura, T. y Kodama, T. (1987). Bacterial cometabolic degradation of chlorinated paraffins. Appl. Microbiol. Biotechnol. **25**, 553-557.

Paszczyński, A., Huynh, V.-B. y Crawford, R.L. (1986). Comparison of ligninase I and peroxidase M2 from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Biochem. Biophys. **224**, 750-765.

Pellinen, J., Väisänen, E., Salkinoja-Salonen, M. y Brunow, G. (1984). Appl. Microbiol. Biotechnol. 20, 77-82.

Pettey, T.M. y Crawford, D.L. (1984). Enhancement of lignin degradation in *Streptomyces* spp by protoplast fusion. Appl. Environ. Microbiol. **47**, 439-440.

Phelan, M.B., Crawford, D.L. y Pometto, A.L.III (1979). Isolation of lignocellulose-decomposing actinomycetes and degradation of specifically C**-labelled lignocelluloses by six selected Streptomyces strains. Can. J. Microbiol. 25, 1270-1276.

Pometto, A.L.III, Sutherland, J.B. y Crawford, D.L. (1981). Streptomyces setonii: Catabolism of vanillic acid via guaiacol and catechol. Can. J. Microbiol. 27, 636-638.

Pometto, A.L.III y Crawford, D.L. (1986). Catabolic fate of Streptomyces viridosporus T7A -produced Acid Precipitable Polymeric Lignin upon incubation with ligninolytic Streptomyces species and Phanerochaete chrysosporium. Appl. Environ. Microbiol. 51, 171-179.

Pometto, A.L.III y Crawford, D.L. (1986a). Effects of pH on lignin and cellulose degradation of Streptomyces viridosporus. Appl. Environ. Microbiol. **52**, 246-250.

Provisional Method (1975). Carbohydrate composition of extractive-free wood and wood pulp by gas-liquid chromatography. Jappi J. T249.

Rast, H.G., Engelhardt, G., Ziegler, W. y Wallnöfer, P.R. (1980). Bacterial degradation of model compounds for lignin and chlorophenol derived lignin bound residues. FEMS Microbiol. Lett. 8, 259-263.

Reineke,W. (1984). Microbial degradation of halogenated aromatic compounds. En: "Microbial degradation of organic compounds". D.T. Gibson (ed.). Marcel Dekker, Inc., N.Y. pp 319-360.

Rimington, C. (1940). Seromucoid and the bound carbohydrate of the serum protein. Biochem. J. 33, 931-939.

Robinson, L.E. y Crawford, R.L. (19789) Degradation of ¹⁴C-labelled lignins by *Bacillus megaterium*. FEMS Microbiol. Lett. **4**, 301-302.

Rolando, C., Lapierre, C. y Monties, B. (1989). Thioacidolysis (revisión). Methods in Lignin Chemistry. En prensa.

Ruttimann, C., Seelenfreund, D. y Vicuña, R. (1987). Metabolism of low molecular weight lignin-related compounds by *Streptomyces viridosporus* T7A. Enzyme Microb. Technol. **9**, 526-530.

Salkinoja-Salonen, M. y Sundman, V. (1981). Regulation and genetics of the biodegradation of lignin derivatives in pulp mill efluents. En: "Lignin biodegradation: Microbiology, chemistry and potential applications". K.T. Kirk, T. Higuchi y H.-m. Chang (eds.). CRC Press, Florida, Vol. II, pp 179-198.

Salkinoja-Salonen, M., Vaisanen, E. y Paterson, A. (1979). Involvement of plasmids in the bacterial degradation of lignin derived compounds. En: "Plasmids of medical, environmental and commercial importance. K.N. Timmis y A. Pühler (eds.). Elsevier/North Holland Biomedical Press, pp 301-314.

Samejima, M., Saburi, Y., Yoshimoto, T., Fukuzumi, T. y Nakazawa, T. (1985). Cattabolic pathway of guaiacylglycerol -*P*- guaiacylether by *Pseudomonas* sp TMY 1009. Mokuzai Gakkaishi **31**, 956-958.

Sawardeker, J.S., Sloneker, J.H. y Jeanes, A. (1965). Quantitative determination of monosaccarides as their alditol acetates by gas liquid chromatography. Anal. Chem. 37, 1602-1604.

* Romathinara M, Granford DL of Poncho, A L. (1887) Extracation any and air sites during Expectation depresentation by Shippingua gar a comparation strong of wilding to and questioning time pulated strong April Environ Morre To 1971 2454 - 2760

Scalbert, A., Monties, B., Lallemand, J.-Y., Guittet, E. y Rolando, C. (1985). Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw. Phytochemistry **24**, 1359-1362.

Scalbert, A., Monties, B., Rolando, C. y Sierra-Escudero, A. (1986). Formation of ether linkage between phenolic acids and Gramineae lignin: A possible mechanism involving quinone methides. Holzforschung 40, 191-195.

Seelenfreund, D. y Vicuña, R. (1989). Effect of *S. viridosporus* T7A on kraft lignin. J. Ind. Microbiol. En prensa.

Shimada, M. y Gold, M.H. (1983). Direct cleavage of the vicinial diol linkage of the lignin model compound dihydroanisoin by the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Microbiol. 134, 299-302.

Shimada, M., Nakatsubo, F., Kirk, K.T. y Higuchi, T. (1981). Biosynthesis of the secondary metabolite veratryl alcohol in relation to lignin degradation in *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Microbiol. **129**, 321-324.

Sjöström, E. (1981). Wood chemistry, fundamentals and applications. Academic Press, N.Y., pp 124-145.

Slater, J.H. y Lovatt, D. (1984). Biodegradation and the significance of microbial communities. En: "Microbial degradation of organic compounds". D.T. Gibson (ed.). Marcel Dekker, Inc., N.Y. pp 439-485.

Sloneker, J.H. (1972). Gas-liquid chromatography of alditol acetates. Methods in Carbohydrate Chem. 6, 20-24.

Smith, T.L., Schalch, H., Gaskell, J., Covert, S. y Cullen, D. (1988). Nucleotide sequence of a ligninase gene from *Phanerochaete chrysosporium*. Nucl. Ac. Res. **16**, 1219.

Sutherland, J.B. (1986). Demethyation of veratrole by cytochrome P-450 in Streptomyces setonii. Appl. Environ. Microbiol. 52, 98-100.

Sutherland, J.B., Crawford, D.L. y Pometto, A.L.III (1981). Catabolism of substituted benzoic acids by *Streptomyces* species. Appl. Environ. Microbiol. **41**, 442-448.

Sutherland, J.B., Crawford, D.L. y Pometto, A.L.III (1983). Metabolism of cinnamic, p-coumaric and ferulic acids by Streptomyces setonii. Can. J. Microbiol. **29**, 1253-1257.

Sundman, V. (1964). The ability of a -conidendrin-decomposing Agrobacterium strain to utilize other lignans and lignin-related compounds. J. Gen. Microbiol. 36, 185-201.

Tien, M. (1987). Properties of ligninase from *Phanerochaete* chrysosporium and their possible applications. CRC Critical Rev. J. in Microbiol. **15**, 141-168.

Tien, M. y Kirk, K.T. (1983). Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* burds. Science **221**, 661-663.

Tien, M. y Kirk, K.T. (1984). Lignin-degrading system from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. Proc.Nat. Acad. Sci. USA **81**, 2280-2284.

Tien, M., Kersten, P.J. y Kirk, K.T. (1987). A potential strategy for selecting and improving lignin-degrading microbes based on lignin model aminoacid adducts. Appl Environ. Microbiol. 53, 242-245.

Tien, M. y Tu, C.-P.D. (1987). Cloning and sequencing of a cDNA for a ligninase from *Phanerochaete chrysosporium*. Nature **324**, 520-523.

Toms, A. y Wood, J.M. (1970). The degradation of trans-ferulic acid by *Pseudomonas acidovorans*. Biochemistry **9**, 337-343.

Tonon, F. y 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.

Trojanowski, J., Haider, K. y Sundman, V. (1977). Decomposition of **C-labelled lignin and phenols by a *Mocardia* sp. Arch. Microbiol. **114**, 149-153.

Troller, J., Smit, J.D.G., Leisola, M.S.A., Kallen, J., Winterhalter, K.-H. y Fiechter, A. (1988). Crystallization of a lignin peroxidase from the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Biotechnology **6**, 571-573.

Turner, S. y Cherniak, R. (1981). Total characterization of polysaccharides by gas-liquid chromatography. Carbohydrate Research **95**, 137-144.

Valentine, R.C., Shapiro, B.M. y Stadtman, E.R. (1968). Regulation of glutamine synthetase. XII. Electron microscopy of the enzyme of $\it E.~coli$. Biochemistry $\it 7$, 2143-2152.

Veal, D.A. y Lynch, J.M. (1984). Asociative cellulolysis and dinitrogen fixation by co-cultures of *Trichoderma harzianum* and *Clostridium butyricum*. Nature **310**, 695-697.

Vicuña, R. (1988). Bacterial degradation of lignin. Enzyme Microb. Technol. 10, 646-655.

Vicuña, R., Gonzàlez, B., Mozuch, M. y Kirk, K.T. (1987). Metabolism of lignin model compounds of the arylglycerol- ρ -aryl ether type by Pseudomonas acidovorans Ds. Appl. Environ. Microbiol. 53, 2605-2609.

Vicuña, R., Gonzàlez, B., Rüttimann, C., Sapag, A. y Seelenfreund, D. (1988). Biochemical and genetic studies of bacteria metabolizing lignin-related compounds. Arch. Biol. Med. Exp. 21, 247-255.

Whalen, D.M. (1975). A simple method for precipitating easily filtrable acid lignin from kraft bleach liquor. Tappi J. **58**, 110-112.

Williams, P.A. y Worsey, M.J. (1976). Ubiquity of plasmids in coding for toluene and xylene metabolism in soil bacteria:

Evidence for the existence of a new TOL plasmid. J. Bact. 125, 818-828.

Wolfson, J.S., Hooper, D.C., Schwartz, M.N., Schwartz, M.D. y McHugh, G.L. (1983). Novobiocin-induced elimination of F' lac and mini-F plasmids from $Escherichia\ coli.$ J. Bact. **156**, 1165-1170.

Yen, K.M. y Gunsalus, I.C. (1982). Plasmid gene organization: Naphtalene/salicylate oxidation. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79. 874-878.

Zadražil, F., Grinbergs, J. y Gonzālez, A. (1982). "Palo podrido" - Decomposed wood used as feed. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. **15**, 167-171.

Zimmermann, W., Umezawa, T., Broda, P. e Higuchi, T. (1988). Degradation of a non-phenolic arylglycerol $-\beta-$ aryl ether by Streptomyces cyaneus (FEB 06407). FEBS Lett. 239, 5-7.



