UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Microbiología III

ESTUDIO DE LOS COMPUESTOS LIPÍDICOS DURANTE LA DEGRADACIÓN DE LA MADERA DE EUCALIPTO POR DIFERENTES HONGOS: TRANSFORMACIÓN DE LOS EXTRÍBLES LIPOFÍLICOS Y SÍNTESIS DE NUEVOS METABOLITOS FÚNGICOS

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Isabel Valles Alberdi

Bajo la dirección de los doctores
Ana Gutiérrez Suárez, José Carlos del Río Andrade y Ángel T. Martínez Ferrer

Madrid, 2007

ESTUDIO DE LOS COMPUESTOS LIPÍDICOS DURANTE LA DEGRADACIÓN DE LA MADERA DE EUCALIPTO POR DIFERENTES HONGOS: TRANSFORMACIÓN DE LOS EXTRAÍBLES LIPOFÍLICOS Y SÍNTESIS DE NUEVOS METABOLITOS FÚNGICOS

Isabel Valles Alberdi

TESIS DOCTORAL

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Biológicas
2006

Portada: Basidiomiceto de podredumbre parda creciendo sobre frondosa en "Chillida-leku", Hernani (Guipúzcoa). Agosto de 2005.

ESTUDIO DE LOS COMPUESTOS LIPÍDICOS DURANTE LA DEGRADACIÓN DE LA MADERA DE EUCALIPTO POR DIFERENTES HONGOS: TRANSFORMACIÓN DE LOS EXTRAÍBLES LIPOFÍLICOS Y SÍNTESIS DE NUEVOS METABOLITOS FÚNGICOS

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR ISABEL VALLES ALBERDI
PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR POR LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Biológicas
Madrid, 2006

Directores

Dra. Ana Gutiérrez Suárez
(Científico Titular, CSIC)

Dr. José Carlos del Río Andrade
(Investigador Científico, CSIC)

Dr. Ángel T. Martínez Ferrer
(Profesor de Investigación, CSIC)

Papá, Mamá… por vosotros…

"…Desde el barco nada parece peligroso, pero aquí con el agua bajo los pies, el fondo está muy oscuro y hace falta ser muy bueno para no hundirse…"
Ray Loriga "Héroes"

Agradecimientos

El presente trabajo, desarrollado en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología (Sevilla) y en el Centro de Investigaciones Biológicas (Madrid), ambos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, se realizó con la financiación de los proyectos AGL2002-00393 del Programa Nacional de Recursos y Tecnologías Agroalimentarias y QLK5-1999-01357 del V Programa marco de la Unión Europea.

Y ahora la parte más difícil como agradecer a todos aquéllos que de una forma directa o indirecta han participado en esta Tesis, a todos…gracias!!.

Al Prof. Ángel T. Martínez, al Dr. José Carlos del Río y a la Dra. Ana Gutiérrez, directores de esta Tesis, por darme la posibilidad de participar en sus respectivos grupos de investigación, lo que ha supuesto una gran experiencia a nivel profesional.

A la Dra. María Jesús Martínez, por sus lecciones sobre microbiología que tanto me ayudaron en mis comienzos, por su complicidad y su apoyo con el que sé que cuento.

Al Prof. Jesús Jiménez-Barbero y a la Dra. Mª Ángeles Canales del CIB, CSIC, por los análisis de NMR. A la Dra. Alicia Prieto del CIB, CSIC, por los análisis de los polisacáridos y cómo no, por su ánimo y comprensión. Al Dr. Kenneth Hammel del Forest Products Laboratory (Madison, Wisconsin), agradecerle las interesantes discusiones sobre los ácidos alquilitacónicos y los ensayos con el dímero de lignina. A Javier Romero (ENCE), por suministrarme la madera de eucalipto utilizada en esta Tesis. A los Drs. F. Javier Hidalgo y Rosario Zamora del Instituto de la Grasa, CSIC por sus consejos sobre TBARS.

A la Dra. Josefina Rodríguez, tutora de esta Tesis, por su ayuda con la parte burocrática.

A mis compañeros del CIB, agradecerles su gran ayuda, tanto dentro como fuera del laboratorio, a lo largo de estos cuatro años. Agradecerles también, aquellas cañas, cenas y demás eventos que hicieron que todo esto fuera más llevadero. A los de antes y a los de ahora, a Víctor, Ana, María José, Víctor GT, Ana Aguilar. A Paco por las entretenidas discusiones

sobre TBARS, peroxidaciones y radicales; a Quique por sus clases magistrales sobre HPLC; a María por cederme aquellas unidades de VP cuando ya no me quedaba tiempo para nada; a Javi por amenizarnos las largas tardes con la magia del nitrógeno líquido; a Marta y Mariela por aquellos divertidos aquelarres en la calle Méjico; a mi "mami" Susana por su preocupación tanto dentro como fuera del laboratorio y por sus buenos consejos sobre hongos, labores domésticas y otras cuestiones. A Patricia por su sentido práctico y porque me he reído mucho con ella. A Elvira por su sonrisa. A David por despertar mi faceta como psicoanalista y por ayudarme a ordenar mi desordenada cabeza y finalmente a Olga por su confianza, su sinceridad y porque siempre está "ahí". Agradecer también a mis compañeros del IRNAS especialmente a Isa, por su imprescindible ayuda y porque sé que tengo una buena amiga en Sevilla.

A mis amigos con los que he pasado muy buenos momentos y me han ayudado a superar los malos, a los de toda la vida, los de Ponferrada, porque año tras año siguen ahí dispuestos a "echarme un cable" en cualquier momento. A los de León, especialmente al abuelo y a las "Mejores" porque formamos una gran y divertida familia. A Ruth, María y Antonio, mis "compis" de piso, porque sin duda son los que más me han sufrido con esta Tesis. Al Broncas por soportar estoicamente las largas y aburridas charlas sobre "Tesis". A Asun y Víctor por esos días de playa, brandy y "choco plancha" y sin dudarlo, a Asun por su optimismo contagioso !!.

A mi familia de Sevilla por su acogida en mis múltiples y largas visitas.

A Quique porque casi sin darme cuenta pasó a ser una de las personas más importantes de mi vida. Gracias por ayudarme a superar mis limitaciones, por darme ánimos cuando ya no me quedaban fuerzas para terminar esta Tesis y porque contigo todo es más fácil y divertido!!.

A mi familia, mi padre por inculcarme su sentido común que tanto me ha ayudado, a mi madre por apoyarme en todos los momentos de mi vida, y por enseñarme a utilizar la poca paciencia que tengo, a mi hermano porque le adoro, a mi "abueli" por su ilusión, y a la hermana que nunca tuve, Cuca, persona a la que le debo agradecer demasiadas cosas.

Abreviaturas

AAD	aril-aldehído deshidrogenasa
AAO	aril-alcohol oxidasa
ABTS	2,2´-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
AAI	ácido alquilitacónico
AI	ácido itacónico
ATCC	colección de cultivos tipo de los EEUU (*American Type Culture Collection*)
BSTFA	bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida
CBS	colección de cultivos de hongos de los Países Bajos (*Centraalbureau voor Schimmelcultures*)
DMP	2,6-dimetoxifenol
ECF	secuencia de blanqueo libre de cloro elemental (*Elemental Chlorine Free*)
ε	coeficiente de extinción molar
FID	detector de ionización de llama (*Flame Ionization Detector*)
GC	cromatografía de gases (*Gas Chromatography*)
GC/MS	cromatografía de gases/espectrometría de masas (*Gas Chromatography/Mass Spectrometry*)
HBT	1-hidroxibenzotriazol
HMBC	correlación heteronuclear a múltiples enlaces (*Heteronuclear Multiple Bond Connectivity*)
HPLC	cromatografía líquida de altas prestaciones (*High Performance Liquid Chromatography*)
HSQC	correlación heteronuclear a un enlace (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*)
IJFM	colección de cultivos de hongos del Centro de Investigaciones Biológicas, del CSIC, procedente del antiguo Instituto Jaime Ferrán de Microbiología
ITD	detector de trampa de iones (*Ion Trap Detector*)
L$^{\bullet}$	radical acilo
L.A.S.	lignina ácido soluble
LiP	lignina peroxidasa
LO$^{\bullet}$	radical alcoxilo
LOO$^{\bullet}$	radical peroxilo
LOOH	hidroperóxido
MDA	malondialdehído

MnP	manganeso peroxidasa
NMR	resonancia magnética nuclear (*Nuclear Magnetic Resonance*)
rpm	revoluciones por minuto
SPE	extracción en fase sólida (*Solid Phase Extraction*)
SSF	fermentación en estado sólido
TAPPI	Technical Association for the worldwide Pulp, Paper, and converting Industry
TBARS	especies reactivas al ácido tiobarbitúrico
TCF	secuencia de blanqueo totalmente libre de cloro (*Totally Chlorine Free*)
TMSi	grupo trimetilsililo
U	unidad enzimática
VP	peroxidasa versátil

Contenido

CAPÍTULO 1
INTRODUCCIÓN: COMPOSICIÓN QUÍMICA Y DEGRADACIÓN BIOLÓGICA DE LA LIGNOCELULOSA 1

1. COMPOSICIÓN DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO 3
   1.1. Polisacáridos 3
   1.2. Lignina 4
   1.3 Fracción extraíble de la madera 6

2. HONGOS DE LA MADERA 8
   2.1. Hongos de podredumbre blanca 9
   2.2. Hongos de podredumbre parda 9
   2.3. Hongos de podredumbre blanda 9
   2.4. Hongos que tiñen la madera 10

3. SISTEMA LIGNINOLÍTICO DE LOS HONGOS 10
   3.1. Enzimas ligninolíticas 10
   3.2. Agentes de bajo peso molecular 12
   3.3. Biodegradación de lignina: Un sistema multienzimático 13

4. BIOTECNOLOGÍA EN LA INDUSTRIA PAPELERA 13
   4.1. Fabricación de pasta de papel 13
   4.2. Eliminación de lignina y extraíbles de la madera 15

5. OBJETIVOS GENERALES DE ESTE TRABAJO 17

CAPÍTULO 2
PATRONES DE TRANSFORMACIÓN DE LOS LÍPIDOS DE LA MADERA DE EUCALIPTO POR DIFERENTES HONGOS: DEGRADACIÓN DE ESTEROLES Y FORMACIÓN DE OXODERIVADOS 19

1. INTRODUCCIÓN 21

2. RESULTADOS 23
   2.1. Degradación de esteroles libres y esterificados por hongos de podredumbre blanca y parda 23
   2.2. Evolución de las cetonas esteroidales en madera de *E. globulus* tratada con hongos de podredumbre blanca y parda 30

2.3. Síntesis de nuevos compuestos lipídicos por hongos de podredumbre blanca y parda 38

3. DISCUSIÓN 41
3.1. Degradación de los esteroles libres y esterificados 41
3.2. Síntesis y degradación de cetonas esteroidales 42
3.3. Rutas de transformación de esteroides por hongos de podredumbre blanca y parda 44
3.4. Síntesis de ácidos/anhídridos di-tricarboxílicos 47

CAPÍTULO 3
NUEVOS METABOLITOS FÚNGICOS DURANTE LA DEGRADACIÓN DE MADERA DE EUCALIPTO: IDENTIFICACIÓN POR GC/MS Y 2D-NMR 49

1. INTRODUCCIÓN 51

2. RESULTADOS 52
2.1. Identificación de nuevos lípidos alquil-di/tri-carboxílicos en cultivos de hongos sobre madera de eucalipto en condiciones de SSF 52
2.2. Identificación de ácidos alquilitacónicos en cultivos de *C. subvermispora* 52
2.2.1. Determinación de la posición del doble enlace en el ácido 7-hexadecenilitacónico 59
2.2.2. Serie de ácidos alquilitacónicos en cultivos de *C. subvermispora* 61
2.2.3. Identificación de ácido norcaperático y ácido agarícico en cultivos de *P. placenta* 62
2.2.4. Identificación de anhídridos alquilitacónicos en cultivos de *L. sulphureus* 67
2.3. Purificación de los ácidos alquil-di/tri-carboxílicos 74
2.4. Identificación de los ácidos alquil-di/tri-carboxílicos por resonancia magnética nuclear (NMR) 76
2.4.1. NMR de los ácidos alquilitacónicos 76
2.4.1.1. NMR del ácido tetradecilitacónico 77
2.4.1.2. NMR del ácido 7-hexadecenilitacónico 81
2.4.2. NMR del ácido agarícico 84

3. DISCUSIÓN 88

3.1. Los ácidos alquilitacónicos 88
3.2. Los ácidos alquilcítricos 89
3.3. Los anhídridos aquilitacónicos 90
3.4. ¿Anhídridos ó diácidos? 91
3.5. Isomerización entre los ácidos/anhídridos alquilitacónicos y alquilcitracónicos 92
3.6. Posible ruta de biosíntesis de los ácidos alquil-di/tri-carboxílicos 93

CAPÍTULO 4
ESTUDIO DE LAS POSIBLES FUNCIONES DE LOS ÁCIDOS ALQUILITACÓNICOS EN LA BIODEGRADACIÓN DE LA MADERA 97

1. INTRODUCCIÓN 99

2. RESULTADOS 101
2.1. Degradación de la fracción lipídica de la madera de eucalipto por *C. subvermispora* en condiciones de SSF 101
2.2. Producción de ácidos alquilitacónicos 105
2.2.1. Optimización de la producción de ácidos alquilitacónicos. 106
2.3. Participación de los ácidos alquilitacónicos en la degradación de lignina 108
2.3.1. Degradación de la madera de *E. globulus* por *C. subvermispora* en condiciones de SSF 108
2.3.2. Evolución de las actividades enzimáticas a lo largo del cultivo de *C. subvermispora* 111
2.3.3. Ensayos de peroxidación de lípidos 112
2.3.3.1 Reacciones de peroxidación en cultivos de *C. subvermispora* 112
2.3.3.2. Estudios de peroxidación de los ácidos alquilitacónicos 113
2.3.4. Ensayos de degradación de compuestos lipídicos 115
2.3.5. Ensayos de degradación de un dímero modelo de lignina . 118

3. DISCUSIÓN 120

CAPÍTULO 5
MATERIAL Y MÉTODOS 127

1. ORIGEN Y MANTENIMIENTO DE CEPAS 129

2. MEDIOS DE CULTIVO 129
2.1. Medios de cultivo para basidiomicetos 129
2.1.1. Medio sólido 129
2.1.2. Medio líquido 129
2.2. Medios de cultivo para deuteromicetos 130
2.2.1. Medio sólido 130
2.2.2. Medio líquido 131

3. FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO 131
3.1. Fermentación en estado sólido para basidiomicetos 131
3.1.1. Medio de cultivo 131
3.1.2. Obtención del inóculo 132
3.1.3. Condiciones de cultivo 132
3.2. Escalado en fermentador 133
3.2.1. Medio de cultivo 133
3.2.2. Obtención del inóculo 133
3.2.3. Condiciones de cultivo 133
3.3. Fermentación en estado sólido para deuteromicetos 133
3.3.1. Medio de cultivo 133
3.3.2. Obtención del inóculo 134
3.3.4. Obtención del extracto lipídico de cultivos de deuteromicetos 134

4. DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS 134
4.1. Obtención del crudo enzimático 134
4.2. Actividad manganeso peroxidasa (MnP) 135
4.3. Actividad lacasa 135
4.4. Actividad peroxidasa versátil (VP) 135

5. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA GENERAL 136
5.1. Análisis químico de la madera 136
5.1.1. Porcentaje de humedad y pérdida de peso 136
5.1.2. Obtención del extracto lipídico 136
5.1.3. Fracción hidrosoluble 136
5.1.4. Lignina Klason 137
5.1.5. Lignina ácido-soluble 137
5.1.6. Composición de polisacáridos 137
5.1.7. Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) 138

5.2. Ensayos de peroxidación de ácidos alquilitacónicos 139
5.2.1. Determinación de reacciones de peroxidación mediante la formación de TBARS 139
5.2.2. Determinación de reacciones de peroxidación mediante la producción de hexanal 139
5.3. Ensayos de degradación en presencia de ácidos alquilitacónicos 140
5.3.1 Ensayos de degradación de un dímero de lignina 140
5.3.2. Degradación de ácidos alquilitacónicos por la VP y la lacasa 140
5.3.3. Degradación de lípidos en presencia de ácidos alquilitacónicos 141

6. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS 141
6.1. Extracción en fase sólida 141
6.2. Cromatografía líquida de altas prestaciones (HPLC) 141
6.2.1. Purificación de ácidos alquilitacónicos 141
6.2.2. Purificación del ácido agarícico 142
6.2.3. Determinación de hexanal 142
6.2.4. Análisis de la oxidación del dímero arilglicerol-β-aril éter 142
6.3. Cromatografía de gases (GC) 143
6.3.1. Análisis de lípidos 143
6.3.2. Análisis de la composición de polisacáridos 143
6.4. Cromatografia de gases/espectrometría de masas (GC/MS) 143
6.4.1. Identificación de compuestos 144
6.4.2. Localización de la posición de dobles enlaces de los ácidos alquilitacónicos 144
6.4.3. Cuantificación de los compuestos lipofílicos 144
6.4.4. Metodología de derivatización 145

7. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (NMR) 146

CONCLUSIONES 147

BIBLIOGRAFÍA 151

Capítulo 1

Introducción: Composición química y degradación biológica de la lignocelulosa

Resumen. En este Capítulo se introducen brevemente los distintos estudios realizados en los Capítulos siguientes. Se inicia con la composición del material lignocelulósico seguida de una descripción de los hongos de la madera, el sistema ligninolítico de estos hongos y la aplicación biotecnológica de los mismos. El Capítulo finaliza con los objetivos generales de esta Tesis.

1. COMPOSICIÓN DEL MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

En nuestro planeta las plantas son las encargadas de fijar el CO_2 atmosférico, que se acumula mayoritariamente en las paredes vegetales de naturaleza lignocelulósica. La celulosa, la lignina y la hemicelulosa son los tres componentes principales de la pared celular vegetal. En la Figura 1 se muestra la estructura anatómica de la madera y el papel de la lignina como cemento entre las fibras formando la lámina media. La lignina, tras la celulosa es el compuesto orgánico más abundante de la Tierra y supone alrededor del 20 % del peso de la madera. Su degradación es esencial para el reciclaje del carbono en los ecosistemas terrestres ya que la lignina protege a los polisacáridos del ataque microbiano.

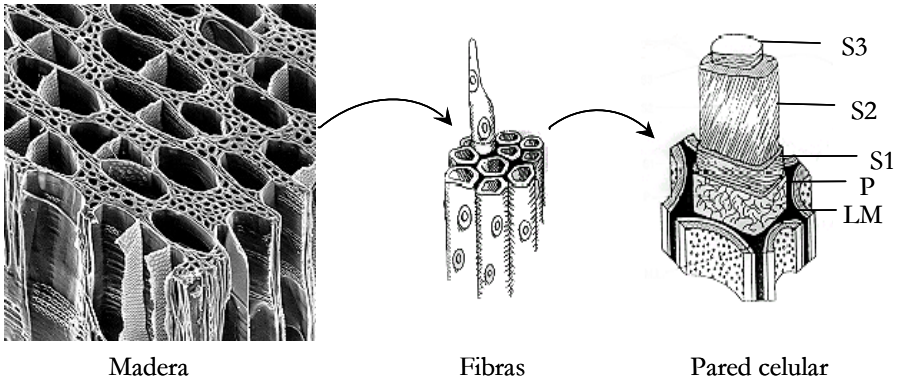

Figura 1. Estructura anatómica de la madera, formada por fibras y vasos entre otros elementos y detalle de las fibras con la lignina en la lámina media (color negro) y las microfibrillas de celulosa con distintas orientaciones en las diferentes capas de la pared secundaria (P: pared primaria, S1-S3: capas de la pared secundaria y LM: lámina media).

1.1. Polisacáridos

La celulosa es un polímero lineal de unidades de D-glucosa unidas por enlaces glicosídicos β (1→4), que forman largas cadenas. Éstas se unen entre sí por puentes de hidrógeno dando lugar a las llamadas fibrillas elementales, que a su vez se unen formando las microfibrillas, que se encuentran inmersas en una matriz de hemicelulosa y lignina (Fujita y Harada, 1991). La celulosa representa alrededor del 50 % del peso de la madera.

Las hemicelulosas son un conjunto de polisacáridos formados por

diversos azúcares unidos por enlaces β (1→4) y en ocasiones β (1→3), cuya longitud de cadena es inferior a la de la celulosa. A diferencia de ésta, las hemicelulosas presentan ramificaciones laterales. Los principales azúcares que forman las hemicelulosas son D-xilosa, D-manosa, D-galactosa, L-arabinosa y los ácidos 4-*O*-metilglucurónico y D-galacturónico. Mientras que la celulosa presenta una estructura constante en los diferentes vegetales, la estructura de las hemicelulosas varía entre las diferentes especies. Las angiospermas son ricas en xilanos, mientras que las gimnospermas lo son en mananos (Fengel y Wegener, 1984).

1.2. Lignina

La lignina es un polímero aromático, heterogéneo y amorfo. Tras la celulosa, es la macromolécula natural más abundante de la Tierra y una de las más recalcitrantes. Debido a ello y a su compleja estructura tridimensional, cumple funciones esenciales para la planta incluyendo sostén, impermeabilidad, resistencia al estrés mecánico y protección de los carbohidratos frente al ataque de diferentes microorganismos. La lignina se localiza principalmente en la lámina media y en la pared secundaria de las células vegetales.

La lignina deriva de los aminoácidos L-fenilalanina y L-tirosina, a partir de los cuales se originan los ácidos 4-hidroxicinámicos (Higuchi, 1997). De ellos derivan los alcoholes cinamílicos: 4-hidroxicinamílico (alcohol *p*-cumarílico), 4-hidroxi-3-metoxicinamílico (alcohol coniferílico) y 4-hidroxi-3,5-dimetoxicinamílico (alcohol sinapílico). Mediante reacciones de polimerización por deshidrogenación oxidativa se forman las tres unidades fenilpropano de lignina: 4-hidroxifenilpropano (H), guayacilpropano (G) y siringilpropano (S). Recientemente, se ha descrito la existencia de otro tipo de monómeros no convencionales, tales como los alcoholes *p*-hidroxicinamílicos acetilados en el carbono-γ de la cadena lateral (Lu y Ralph, 2002; del Río *et al.*, 2004).

Las diversas unidades H, G y S se unen entre sí principalmente mediante enlaces aril-éter β-O-4, entre el C_4 del anillo bencénico y el C_β de la cadena lateral (más del 50 % del total de enlaces) dando lugar a unidades no fenólicas de muy difícil degradación (Fig. 2, subestructura 1). Las ligninas presentan además otros enlaces éter y C-C entre los carbonos de los anillos o las cadenas laterales tales como β-β, β-5, 5-5 o 4-O-5, entre otros (Higuchi, 1990).

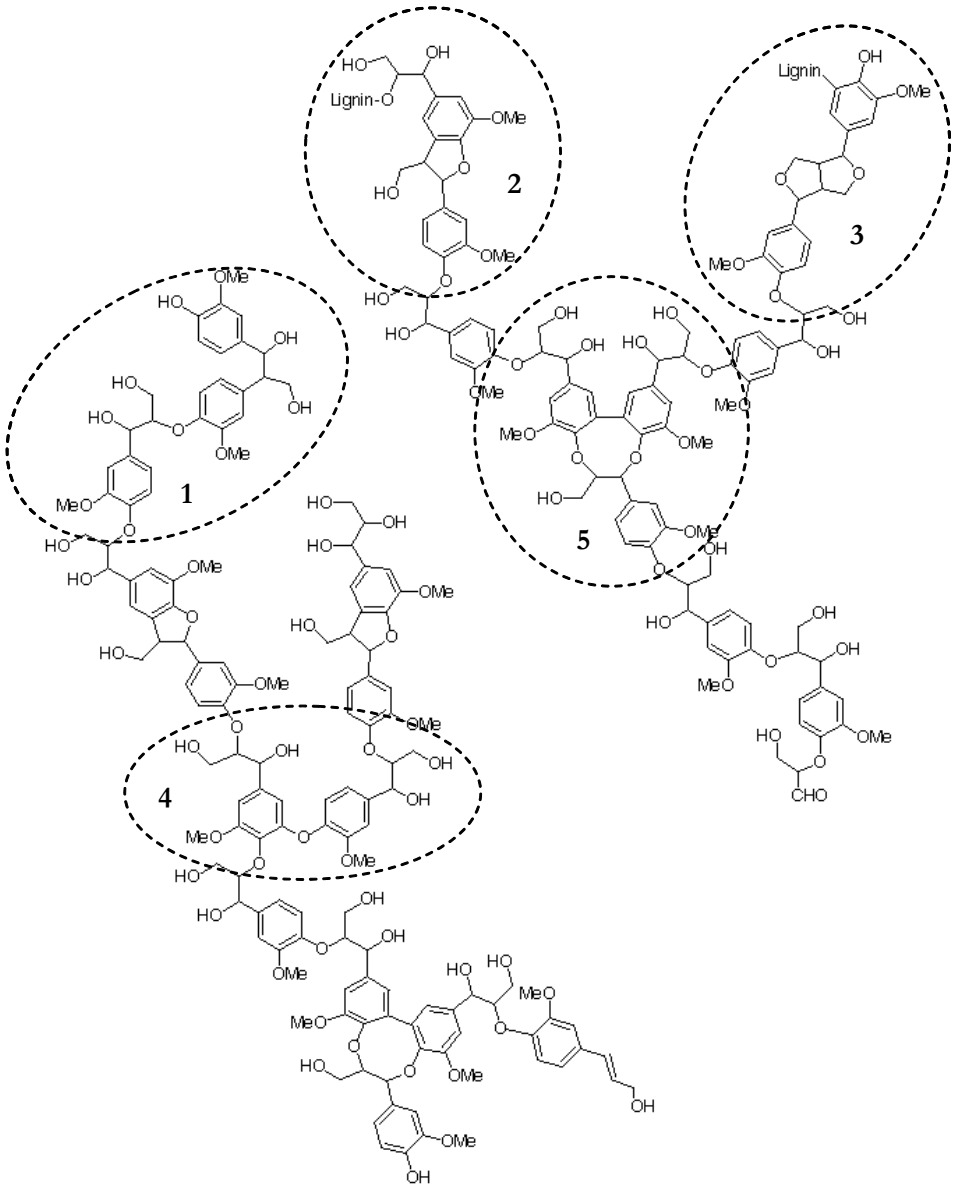

Figura 2. Estructura química de la lignina. Modelo de lignina de coníferas formada por polimerización deshidrogenativa del alcohol coniferílico en el que se muestran las unidades G en diferentes subestructuras: 1) éter guayacilglicerol-β-arílico, 2) fenilcumarano, 3) pinorresinol, 4) éter difenílico y 5) dibenzodioxocina. (www.helsinki.fi/~orgkm_ww/lignin_structure.html).

Existe una expresión diferencial de las enzimas que participan en la síntesis de los ácidos cinámicos, así como una gran variabilidad en las reacciones de polimerización, lo que hace que la lignina varíe tanto entre diferentes organismos, como entre diferentes tejidos de un mismo organismo (Baucher *et al.*, 1998; Donaldson *et al.*, 2001). En el caso de las gimnospermas la lignina está constituida por unidades de tipo G, mientras que en angiospermas leñosas las unidades son de tipo G y S con predominio de estas últimas y en las angiospermas herbáceas existen los tres tipos de unidades, H, G y S (Betts *et al.*, 1991).

La Figura 2 representa un modelo esquemático y actualizado de la estructura de lignina de coníferas, formada exclusivamente por unidades G. Las subestructuras 1-4 (β-O-4, β-5, β-β y 4-O-5, respectivamente), descritas ya en los primeros modelos de lignina de coníferas, son diméricas (Adler, 1977), mientras que la 5, subestructura de dibenzodioxocina recientemente descrita, es una estructura trimérica (enlaces 5-5/β-O-4/α-O-4) (Karhunen *et al.*, 1995).

Una vez que los árboles y plantas leñosas mueren y su biomasa es incorporada al suelo, la lignina es degradada por diversos microorganismos permitiendo el ataque a los polisacáridos y el reciclado del carbono vegetal. Los organismos encargados de la degradación del material lignocelulósico son principalmente los hongos filamentosos tal y como se describe en el apartado 2 (Crawford, 1981; Eriksson *et al.*, 1990).

1.3. Fracción extraíble de la madera

La fracción extraíble de la madera engloba a los compuestos susceptibles de extraerse con disolventes orgánicos. Esta fracción se compone de una parte polar y otra parte lipofílica. La parte polar está compuesta por lignanos y otros fenoles (Chen, 1994). La fracción lipofílica se compone de ácidos grasos libres, ácidos resínicos, esteroles libres y esterificados, ceras, terpenos y glicéridos (Hillis, 1962; Fengel y Wegener, 1984; Allen, 2000). La composición y abundancia de la fracción extraíble varía entre las diferentes especies de plantas. Los esteroles libres y esterificados constituyen la parte mayoritaria de la fracción lipofílica de la madera de algunas especies de frondosas como el *Eucalyptus globulus* (Fig. 3) y la más problemática en cuanto a su degradación (Swan y Åkerblom, 1967; Gutiérrez *et al.*, 1999a; 2001).

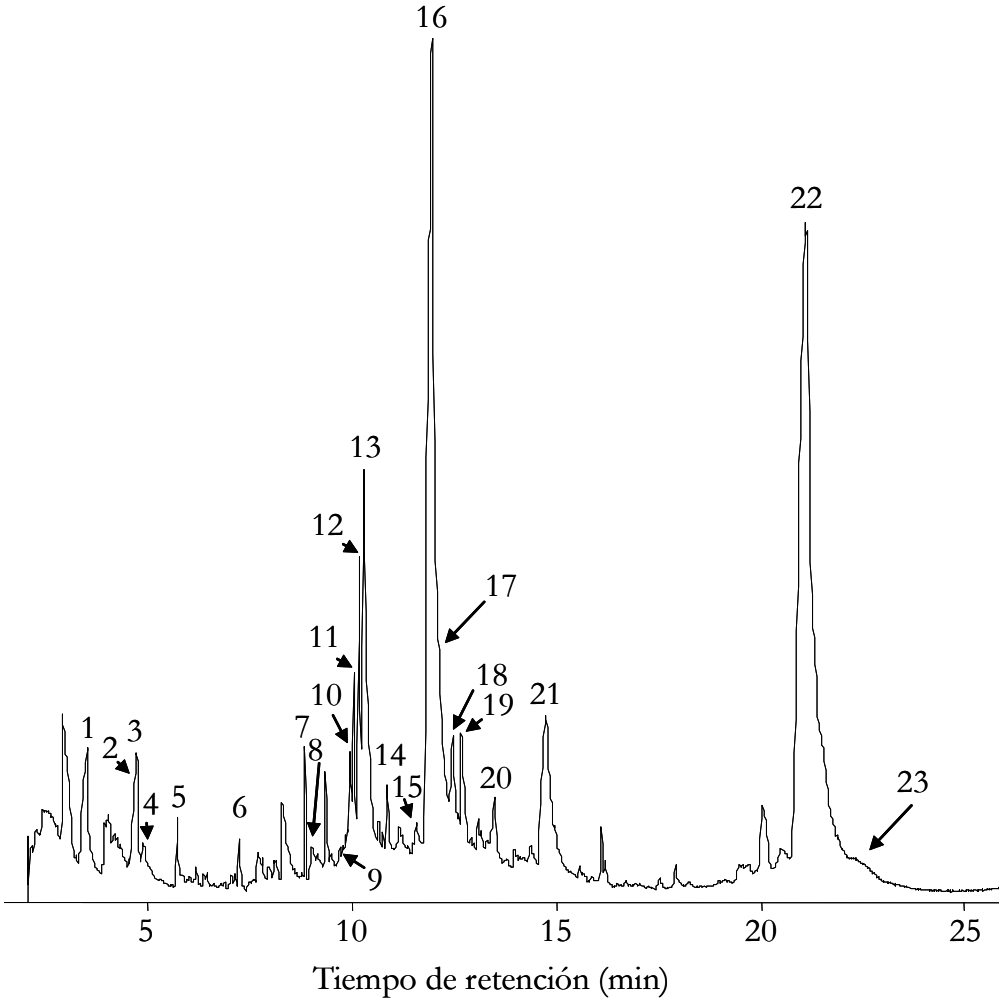

Figura 3. Cromatograma de gases de la fracción lipofílica de los extraíbles de la madera de *E. globulus*, mostrando los diferentes tipos de compuestos: Ácidos grasos libres incluyendo $C_{16:0}$ (1), $C_{18:2}^{9c12c}$ (2), $C_{18:1}^{9c}$ (3), $C_{18:0}$ (4), $C_{20:0}$ (5), $C_{22:0}$ (6), $C_{24:0}$ (8) y $C_{26:0}$ (9); Escualeno (7); Hidrocarburos esteroidales incluyendo estigmasteno (10), estigmastadieno (11), estigmasta-3,5,7-trieno (12) y estigmasta-3,5-dieno (13); α-tocoferol (14); Esteroles libres incluyendo campesterol (15) y sitosterol (mayoritario) + estigmastanol + fucosterol (16); Cetonas esteroidales incluyendo estigmastan-3-ona (17), estigmasta-3,5-dien-7-ona (18), estigmast-4-en-3-ona (19) y estigmast-4-en-3,6-diona + estigmasta-3,6-diona (20); Lignanos como la yangambina (21); Ésteres de esteroles incluyendo sitosteril linoleato (mayoritario) + sitosteril y estigmastanil palmitato, estearato y oleato (22); y Triglicéridos (23). Para más detalle ver Capítulo 2.

En maderas de gimnospermas, los triglicéridos junto con los ácidos resínicos, son los compuestos mayoritarios (Fengel y Wegener, 1984).

La fracción lipofílica de los extraíbles de la madera provoca serios problemas durante la fabricación de la pasta de papel, como los denominados depósitos de "pitch". Éstos se forman a lo largo de toda la cadena de producción, originando roturas, paradas técnicas y una disminución en la calidad del producto final que suponen grandes pérdidas económicas para las industrias papeleras (Hillis y Sumimoto, 1989). El problema del "pitch" depende tanto de la cantidad y composición de lípidos que contenga la madera como de las reacciones que experimenten durante los procesos de pasteado y blanqueo (Jansson *et al.*, 1995). Además de estos problemas, hay que tener en cuenta que los extraíbles de la madera pasan a las aguas a través de los efluentes y que alguno de sus componentes, como los ácidos resínicos y los esteroides, presentan cierta toxicidad (Leach y Thakore, 1976; MacLatchy y van der Kraak, 1995; Liss *et al.*, 1997; Mattsson *et al.*, 2001).

2. HONGOS DE LA MADERA

Los hongos son organismos heterótrofos que se alimentan por absorción. Para la obtención de nutrientes liberan al medio enzimas extracelulares, hidrolíticas y oxidativas, que degradan parcialmente los diferentes constituyentes de la lignocelulosa para ser incorporados al interior de las células y metabolizados. Poseen una organización hifal, y un sistema de translocación intrahifal que les permite explorar una gran área en busca de nutrientes.

Los hongos ligninolíticos son los únicos organismos capaces de despolimerizar y mineralizar el polímero de lignina (Crawford, 1981; Hammel, 1997). Además, tienen capacidad de crecer con muy baja concentración de nitrógeno (Rayner, 1977). Estas características les permiten colonizar la madera. Dado que la lignina no puede ser utilizada como única fuente de carbono, los hongos degradan este material utilizando otras fuentes de carbono, como la glucosa u otros carbohidratos (Kirk *et al.*, 1976). Factores como el pH, la concentración de oxígeno molecular y la disponibilidad de nitrógeno en el medio, así como la presencia de metabolitos secundarios afectan a este proceso degradativo (Kirk *et al.*, 1978; Leisola *et al.*, 1983).

Los hongos lignícolas se clasifican en cuatro grupos diferentes

atendiendo al tipo de degradación que ejercen sobre el sustrato colonizado incluyendo hongos de podredumbre blanca, hongos de podredumbre parda, hongos de podredumbre blanda y hongos que tiñen la madera (Zabel y Morrell, 1992; Schwarze *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2005).

2.1. Hongos de podredumbre blanca

Este tipo de podredumbre es la más frecuente en la degradación de la madera y es llevada a cabo por hongos basidiomicetos y algunos ascomicetos. Estos hongos se caracterizan por su habilidad para degradar la lignina, la celulosa y la hemicelulosa. Dentro de los hongos de podredumbre blanca existen dos patrones de degradación diferentes, según degraden la lignina de forma selectiva o simultáneamente con la celulosa (Otjen y Blanchette, 1986). La degradación selectiva de la lignina se produce en diferentes tipos de maderas, mientras que la degradación simultánea con la celulosa es más frecuente en maderas de angiospermas. Estos hongos son los únicos organismos capaces de degradar la lignina hasta mineralizarla, adquiriendo la madera una coloración blanquecina y aspecto fibroso.

2.2. Hongos de podredumbre parda

Este grupo representa alrededor de un 7 % del total de hongos descomponedores de la madera, y está integrado por basidiomicetos. Degradan principalmente madera de coníferas, que adquiere un aspecto cuarteado (cúbico) desde los primeros estadios de degradación. Estos hongos atacan principalmente los polisacáridos de la madera con una mínima degradación de la lignina. La madera adquiere un color marrón debido a la presencia de lignina oxidada.

2.3. Hongos de podredumbre blanda

Este grupo está formado principalmente por ascomicetos y deuteromicetos[1], que colonizan y degradan la madera en contacto con el suelo, en procesos a menudo asociados a bacterias. Colonizan la madera en condiciones extremas de alto o bajo potencial hídrico, en las que otros

[1] Hongos deuteromicetos: forma asexuada de los hongos ascomicetos y, aunque menos frecuentemente, de basidiomicetos.

hongos no pueden desarrollarse. Degradan principalmente los polisacáridos con una alteración mínima de la lignina. Aunque tradicionalmente este grupo se asociaba a ascomicetos, recientemente se ha comprobado que ciertos basidiomicetos son capaces de degradar la madera con este tipo de podredumbre.

2.4. Hongos que tiñen la madera

Este grupo de hongos está integrado por una serie de ascomicetos (pertenecientes a los géneros *Ophiostoma* y *Ceratocystis*, entre otros) y deuteromicetos (pertenecientes a los géneros *Aureobasidium, Phialophora* y *Trichoderma*, entre otros) que degradan principalmente los lípidos, los azúcares y el almidón de la madera, con una mínima degradación de la lignina. Estos hongos sintetizan pigmentos oscuros (melaninas) que protegen a las hifas de la radiación. La madera degradada adquiere diferentes colores, normalmente negro en maderas de angiospermas y azul en el caso de gimnospermas.

3. SISTEMA LIGNINOLÍTICO DE LOS HONGOS

La degradación o eliminación de la lignina es la clave para la degradación natural de la biomasa vegetal, así como para diferentes aplicaciones industriales incluyendo la fabricación de pasta de papel y la obtención de bio-alcohol.

El sistema de biodegradación de la lignina es complejo e inespecífico. En él intervienen varios tipos de enzimas extracelulares, metabolitos de bajo peso molecular, especies activas de oxígeno e iones metálicos, capaces de atacar al polímero de lignina. La degradación se inicia con un ataque extracelular que provoca la despolimerización de la lignina y liberación de compuestos de bajo peso molecular. Estos compuestos en ocasiones actúan como mediadores redox y finalmente son degradados intracelularmente. El proceso de degradación de la lignina es un proceso oxidativo.

3.1. Enzimas ligninolíticas

Las enzimas implicadas en la biodegradación de la lignina son enzimas extracelulares de tipo oxidorreductasa, incluyendo lacasas, peroxidasas y oxidasas productoras de H_2O_2 (Buswell y Odier, 1987; Higuchi, 1990).

Inicialmente las lacasas se consideraron esenciales en la degradación de lignina, ya que son sintetizadas por todos los hongos de podredumbre blanca, pero pasaron a un segundo plano con el descubrimiento de las peroxidasas ligninolíticas. Las lacasas son metaloenzimas de tipo fenoloxidasa (EC 1.10.3.2), que contienen cobre en su centro activo y utilizan el oxígeno como aceptor final de electrones reduciéndolo a agua. Presentan especifidad de sustrato sobre fenoles y aminas aromáticas sustituidos. Estas enzimas sólo son capaces de oxidar directamente las unidades de tipo fenólico, que constituyen sólo un 20 % del total de la lignina (Kawai *et al.*, 1987a; 1987b). Sin embargo, se ha descrito que en presencia de mediadores naturales o sintéticos, como 2,2´-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS) o 1-hidroxi-benzotriazol (HBT), son capaces de oxidar también las unidades no fenólicas (Bourbonnais y Paice, 1990). Las lacasas pueden participar también en la formación de especies activas de oxígeno, como el radical hidroxilo, a partir de la oxidación de hidroquinonas. Los productos de esta reacción pueden reducir el hierro férrico a ferroso, que en presencia de H_2O_2 da lugar a la reacción de Fenton[2] (Guillén *et al.*, 2000). La síntesis de estas enzimas es característica de hongos de podredumbre blanca (Käärik, 1965) pero recientemente se ha conocido que algunos hongos de podredumbre parda, como *Coniophora puteana*, son capaces de sintetizarlas en medio líquido (Lee *et al.*, 2004).

La lignina peroxidasa (LiP) fue la primera peroxidasa ligninolítica descrita, y se identificó en *Phanerochaete chrysosporium* (Tien y Kirk, 1983; Glenn *et al.*, 1983). Esta enzima es capaz de oxidar unidades tanto fenólicas como no fenólicas, debido a su alto potencial redox. Sin embargo, no todos los hongos capaces de degradar la lignina, sintetizan esta enzima. Por otro lado, la manganeso peroxidasa (MnP) oxida unidades fenólicas, pero necesita la presencia de Mn^{2+}. La MnP oxida el Mn^{2+} a Mn^{3+}, el cual, una vez estabilizado en forma de quelato, oxida la lignina fenólica. Se ha comprobado que la MnP también es capaz de oxidar unidades no fenólicas a través de la peroxidación de lípidos insaturados, iniciada por el Mn^{3+} (Bao *et al.*, 1994). Recientemente, se ha descrito una nueva peroxidasa en *Pleurotus eryngii*, denominada peroxidasa versátil (VP) (Martínez *et al.*, 1996; Ruiz-Dueñas *et al.*, 1999; Camarero *et al.*, 1999), que comparte características catalíticas con la LiP y la MnP. La

[2] Reacción de Fenton: $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\bullet}$

VP es capaz de oxidar eficientemente el Mn^{2+} así como compuestos aromáticos fenólicos y no fenólicos. Esta enzima también la producen otras especies de los géneros *Pleurotus* y *Bjerkandera* (Martínez, 2002).

Las reacciones llevadas a cabo por las peroxidasas requieren la presencia de H_2O_2, que es generado por oxidasas como la glioxal oxidasa caracterizada en *P. chrysosporium* (Kersten y Kirk, 1987), y la aril-alcohol oxidasa (AAO) caracterizada en *P. eryngii* (Guillén *et al.*, 1992). El H_2O_2 además de actuar como co-sustrato de las peroxidasas puede generar especies activas de oxígeno y de esta manera participar en la degradación de la lignina.

La producción de estas enzimas no es un factor común a todos los hongos ligninolíticos, depende de las especies, de la composición del medio de cultivo y de las condiciones de crecimiento (Hatakka *et al.*, 1994).

3.2. Agentes de bajo peso molecular

En los primeros estadios de la biodegradación de la lignina el papel de las enzimas es indirecto ya que el alto grado de compactación del material lignocelulósico hace imposible que éstas accedan a su interior por impedimentos estéricos. Se han propuesto ciertos metabolitos e iones metálicos generados por el propio hongo como responsables de un primer ataque a la lignina (Evans *et al.*, 1991; Joseleau *et al.*, 1994). Entre los metabolitos fúngicos estudiados en relación con la degradación de la lignina se encuentra el alcohol veratrílico, que favorece la oxidación de compuestos aromáticos no fenólicos y colorantes por la LiP. Por otra parte, en el primer ataque intervienen especies activas de oxígeno como el radical hidroxilo, que debido a su alto potencial redox es capaz de atacar a la lignina. Este fuerte oxidante se considera también implicado en la degradación del material lignocelulósico en hongos de podredumbre parda (Koenigs, 1974). El radical hidroxilo es producido por la reacción de Fenton. La reducción del Fe^{3+} se lleva a cabo durante la oxidación de quinonas sintetizadas por los hongos (Guillén *et al.*, 1997; Jensen *et al.*, 2001).

Otra fuente de radicales libres es la peroxidación lipídica, iniciada por el Mn^{3+} formado por la MnP y la VP. Durante la peroxidación de lípidos insaturados se generan radicales como el alcoxilo y peroxilo.

Las enzimas ligninolíticas serían responsables de la oxidación de metabolitos de bajo peso molecular y alto potencial redox como el alcohol veratrílico, de la formación de especies activas de oxígeno como el radical

hidroxilo, de la formación de radicales derivados de los lípidos y de la oxidación de iones metálicos como el Mn^{2+} (Evans *et al.*, 1994; Guillén *et al.*, 2000). Estos agentes de bajo peso molecular iniciarían el ataque al polímero de la lignina dentro de un sistema multienzimático descrito en el apartado siguiente.

3.3. Biodegradación de lignina: Un sistema multienzimático

En la Figura 4 se muestra un esquema general del mecanismo propuesto para la degradación de lignina por especies del género *Pleurotus*. Este esquema incluye diferentes reacciones: a) oxidación de unidades no fenólicas de lignina por VP y sistema lacasa-mediador, b) formación del radical fenoxilo por la rotura del enlace éter en el C_4, c) apertura del anillo aromático, d) rotura del enlace C_α-C_β de la cadena lateral de la lignina, con la formación de un grupo carbonilo, e) reacción de desmetoxilación, f) repolimerización de radicales aromáticos, g) reducción de radicales fenoxilo, h-i) formación de quinonas, j) reducción de aldehídos aromáticos por la aril-alcohol deshidrogenasa, k) oxidación de alcoholes aromáticos por la AAO con producción de H_2O_2, l) reducción de quinonas por deshidrogenasas miceliares, m) oxidación de hidroquinonas a quinonas por lacasa y VP con la reducción del oxígeno al radical superóxido, n) generación del radical hidroxilo mediante la reacción de Fenton, y o) ataque no-enzimático de las unidades de lignina por el radical hidroxilo.

4. BIOTECNOLOGÍA EN LA INDUSTRIA PAPELERA

4.1. Fabricación de pasta de papel

El principal uso no alimenticio de la biomasa vegetal es la fabricación de pasta de papel, que supone a escala mundial unos 190 millones de toneladas anuales. Uno de los mayores problemas en este tipo de industrias es el impacto negativo sobre el medio ambiente provocado por los reactivos empleados y los residuos generados durante la fabricación de pasta blanqueada, que pasan a través de los efluentes al ecosistema, alterando su equilibrio y suponiendo un riesgo para la salud.

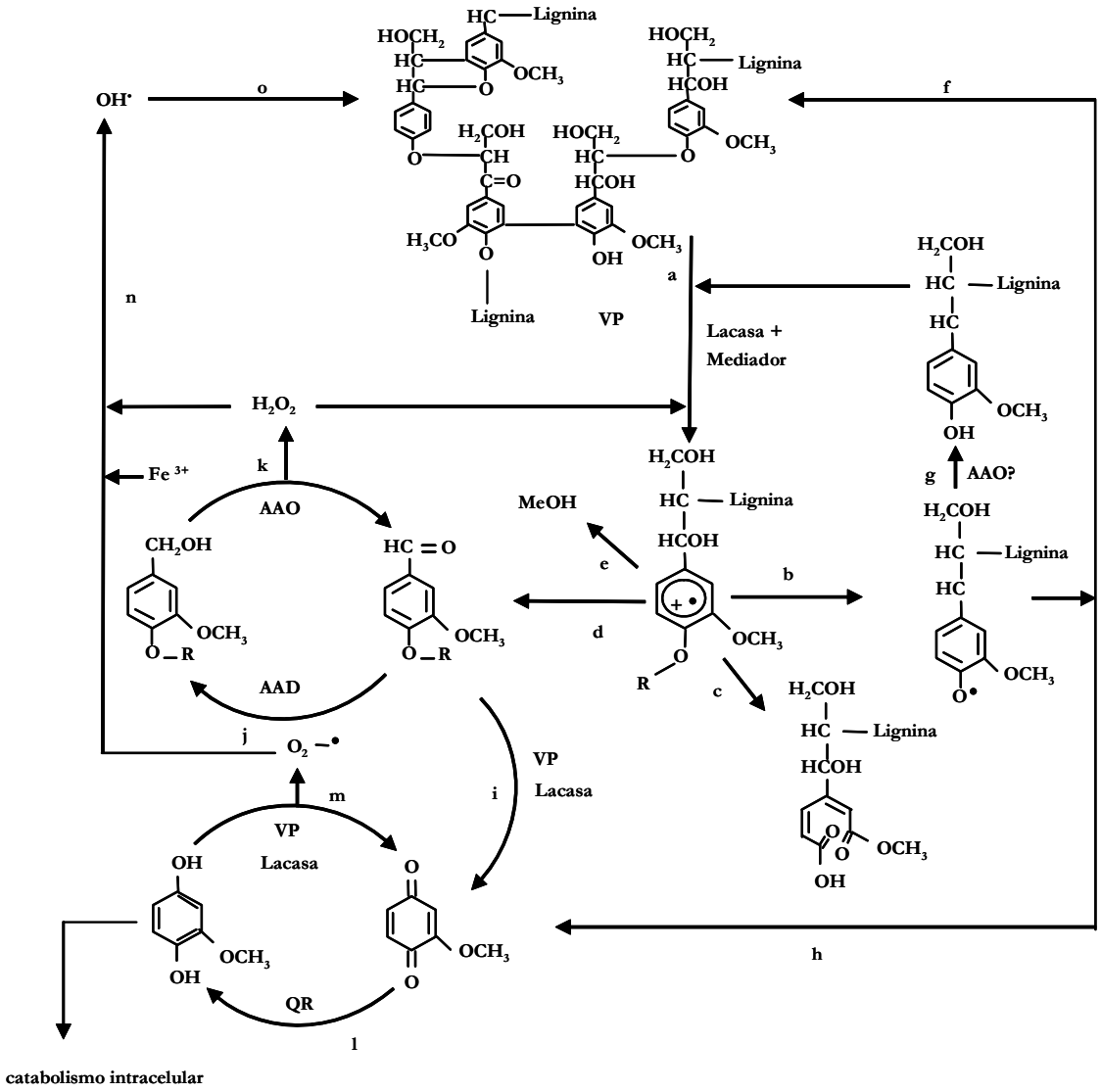

Figura 4. Esquema general de la biodegradación de lignina por especies del género *Pleurotus,* como un sistema multienzimático (ver texto) (Gutiérrez y Martínez, 1996).

El proceso de fabricación de pasta de papel implica la separación de las fibras de celulosa que forman la mayor parte del tejido de la madera. Puesto que la lignina se encuentra cementando dichas fibras a nivel de la lámina media, su eliminación es un paso clave para la obtención de la pasta de celulosa (Kirk, 1983).

La fabricación de pasta de papel puede llevarse a cabo por tres tipos de procedimientos: mecánico, químico o semiquímico (Fengel y Wegener, 1984). Los procesos mecánicos separan las fibras por fragmentación mecánica mediante el uso de molinos, lo que conlleva un gran gasto

energético. Los procesos químicos emplean reactivos que disuelven y extraen la lignina, siendo los más usados: el proceso al sulfato, que da lugar a la llamada pasta "kraft" (un 75 % de la pasta de papel producida a nivel mundial es de este tipo por su buena resistencia), el proceso al sulfito, y el proceso a la sosa (más utilizado con plantas herbáceas). Los procesos semiquímicos constan de una acción química y una homogenización mecánica.

Tras la obtención de la pasta de papel (pasteado) se procede al blanqueo. Tradicionalmente, el blanqueo se realizaba con cloro, lo que suponía un gran riesgo ambiental porque originaba compuestos cloroaromáticos de alta toxicidad que pasaban al medio ambiente a través de los efluentes. Actualmente, en la mayoría de países desarrollados las normativas ambientales prohíben el uso de cloro elemental, que ha sido sustituido por secuencias de blanqueo libres de cloro elemental, blanqueo ECF, que emplea dióxido de cloro que forma menor proporción de compuestos cloroaromáticos, o bien la eliminación total de cloro o de sus derivados en el blanqueo TCF, que emplea oxígeno, peróxido de hidrógeno u ozono. La imposición de estas normativas ha supuesto modificaciones en el proceso de fabricación de pasta de papel así como la aparición de nuevos problemas relacionados con la fracción extraíble de la madera y con la lignina residual de las pastas.

4.2. Eliminación de lignina y extraíbles de la madera

El interés por desarrollar tecnologías industriales respetuosas con el medio ambiente ha impulsado, en los últimos 20 años, desarrollos biotecnológicos basados en el empleo de hongos ligninolíticos capaces de degradar la lignina, así como los extraíbles de la madera, y sus enzimas como alternativa al uso de compuestos químicos en los procesos de blanqueo (Eriksson, 1990; Kurek, 1992; Messner y Srebotnik, 1994; Paice *et al.*, 1995). Dentro de los hongos ligninolíticos, algunos hongos de podredumbre blanca han sido seleccionados para su aplicación en la industria papelera por su capacidad para degradar la lignina con una mínima pérdida de celulosa.

Una de las aplicaciones de los hongos de podredumbre blanca en la industria papelera es el tratamiento de la madera previo al pasteado. Por la acción degradadora de los hongos el contenido de lignina disminuye, facilitándose la separación de las fibras de celulosa durante la fabricación de

pasta de papel, reduciéndose la energía y/o el consumo de reactivos. El tiempo de tratamiento debe de ser suficiente para reducir el contenido en lignina sin ser excesivo, y así evitar la pérdida de celulosa. La utilización de hongos como *Ceriporiopsis subvermispora* supone un ahorro de hasta un 40 % de energía en el refino y una disminución de la toxicidad de los efluentes durante el tratamiento de maderas de coníferas y frondosas (Blanchette *et al.*, 1990; Akhtar *et al.*, 1993). Por otro lado, las xilanasas se utilizan para limitar el uso de cloro en los procesos de blanqueo de la pasta (Viikari *et al.*, 1994). Sin embargo, las enzimas ligninolíticas son más prometedoras para el bioblanqueo, incluyendo el denominado sistema lacasa-mediador (Bourbonnais y Paice, 1990; Paice *et al.*, 1995; Call y Mücke, 1997).

Las secuencias TCF que utilizan oxígeno y peróxido de hidrógeno, a diferencia del blanqueo con cloro y derivados, no afectan prácticamente a la fracción lipídica de la madera. Ésta se deposita a lo largo de la cadena de producción originando los depósitos de "pitch". El "pitch" constituye un problema que aumentará en el futuro con la aplicación de las nuevas legislaciones que implican menores vertidos y menor gasto de agua. Esto supone una mayor recirculación del agua que provoca mayor concentración del "pitch" y mayor probabilidad de deposición.

Los principales organismos utilizados hasta ahora para el control del "pitch" pertenecen al grupo de los hongos que tiñen la madera. El Cartapip™ está constituido por suspensiones de esporas de una cepa albina de *Ophiostoma pilliferum*, un hongo ascomiceto que ha conseguido reducir en un 40 % el contenido de la fracción lipídica en dos semanas de incubación en madera de pino (Farrell, 1994). El Cartapip™ es efectivo en pastas mecánicas de maderas de gimnospermas con alto contenido en triglicéridos, pero no lo es para la degradación de esteroles libres y esterificados, que son los lípidos mayoritarios en otras maderas, como el eucalipto (Martínez *et al.*, 1999; Gutiérrez *et al.*, 1999b). Su aplicación es por tanto limitada, ya que la pasta más utilizada a nivel mundial es la pasta "kraft", cuyas condiciones de cocción hidrolizan los triglicéridos.

La Resinase™ es una lipasa recombinante expresada en *Aspergillus oryzae* (Matsukura *et al.*, 1990; Fujita *et al.*, 1991). Su aplicación, al igual que el Cartapip™, es limitada ya que únicamente hidroliza los triglicéridos sin degradar ningún otro tipo de lípidos.

Debido a que los productos anteriores presentan una aplicación limitada, se ha sugerido el empleo de hongos ligninolíticos no sólo para la eliminación de la lignina, tal como se ha comentado anteriormente, sino

también para la eliminación de los extraíbles lipofílicos de la madera y el biocontrol del "pitch" (Gutiérrez *et al.*, 2000; 2001). Recientemente, se ha demostrado la gran eficacia del sistema lacasa-mediador en la eliminación de los distintos tipos de lípidos de pastas de papel (Gutiérrez *et al.*, 2006a; 2006b).

5. OBJETIVOS GENERALES DE ESTE TRABAJO

Los objetivos del presente trabajo incluyen: I) El estudio de los diferentes patrones de degradación de la fracción extraíble de la madera de *E. globulus*, en condiciones de fermentación en estado sólido, por hongos de podredumbre blanca y parda; II) La producción, aislamiento y caracterización química mediante GC/MS y 2D-(^{1}H-^{13}C)-NMR de metabolitos lipídicos producidos durante la degradación de la madera de *E. globulus* por diferentes hongos de podredumbre blanca y parda; y III) El estudio de la posible implicación de estos metabolitos en la degradación de la lignina y la fracción extraíble de la madera de eucalipto a través de reacciones de peroxidación de lípidos con participación de distintas enzimas.

Capítulo 2

Patrones de transformación de los lípidos de la madera de eucalipto por diferentes hongos: Degradación de esteroles y formación de oxoderivados

Resumen. En este Capítulo se estudia la capacidad de diferentes hongos de podredumbre blanca y parda para degradar los extraíbles lipofílicos de la madera de *Eucalyptus globulus*, en condiciones de SSF. Se observan distintos patrones de degradación de esteroles por hongos de podredumbre blanca y parda, caracterizados por la aparición de diferentes productos de degradación oxidativa en las fases intermedias de degradación y su eventual acumulación al final de cultivo. Durante la degradación de la madera se observa la síntesis de nuevos lípidos por algunos de estos hongos, que son caracterizados químicamente en el Capítulo 3.

1. INTRODUCCIÓN

Los esteroides son compuestos policíclicos con esqueleto de esterano (ciclopentanoperhidrofenantreno) (Fig. 1). Estos compuestos cumplen diferentes funciones, estructural en el caso del colesterol y ergosterol, y hormonal, en el caso de los corticoides, las hormonas sexuales masculinas y femeninas.

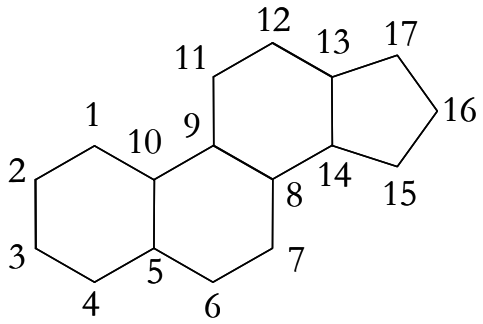

Figura 1. Estructura química del esterano.

Diversos microorganismos son capaces de transformar esteroides generando derivados, como en la síntesis de estrona a partir del colesterol por la bacteria *Nocardia restrictus*. La síntesis química completa de los esteroides es costosa y los pasos clave pueden llevarse a cabo más eficientemente por microorganismos (Madigan *et al.*, 1997). La aplicación de los microorganismos en la transformación de esteroides tiene por tanto gran importancia a nivel industrial (Charney y Herzog, 1967).

Los esteroles (Fig. 2) son esteroides de 27 a 29 átomos de carbono con una cadena lateral de 8 o más carbonos unidos al C_{17} y un grupo hidroxilo unido al C_3. Normalmente presentan una insaturación en el C_5 y sus derivados saturados son los llamados estanoles (Chasles, 1964). El esterol más frecuente en células animales es el colesterol, en células vegetales los más abundantes son el sitosterol, estigmasterol y campesterol mientras que el ergosterol es característico de las células fúngicas (Capek *et al.*, 1966).

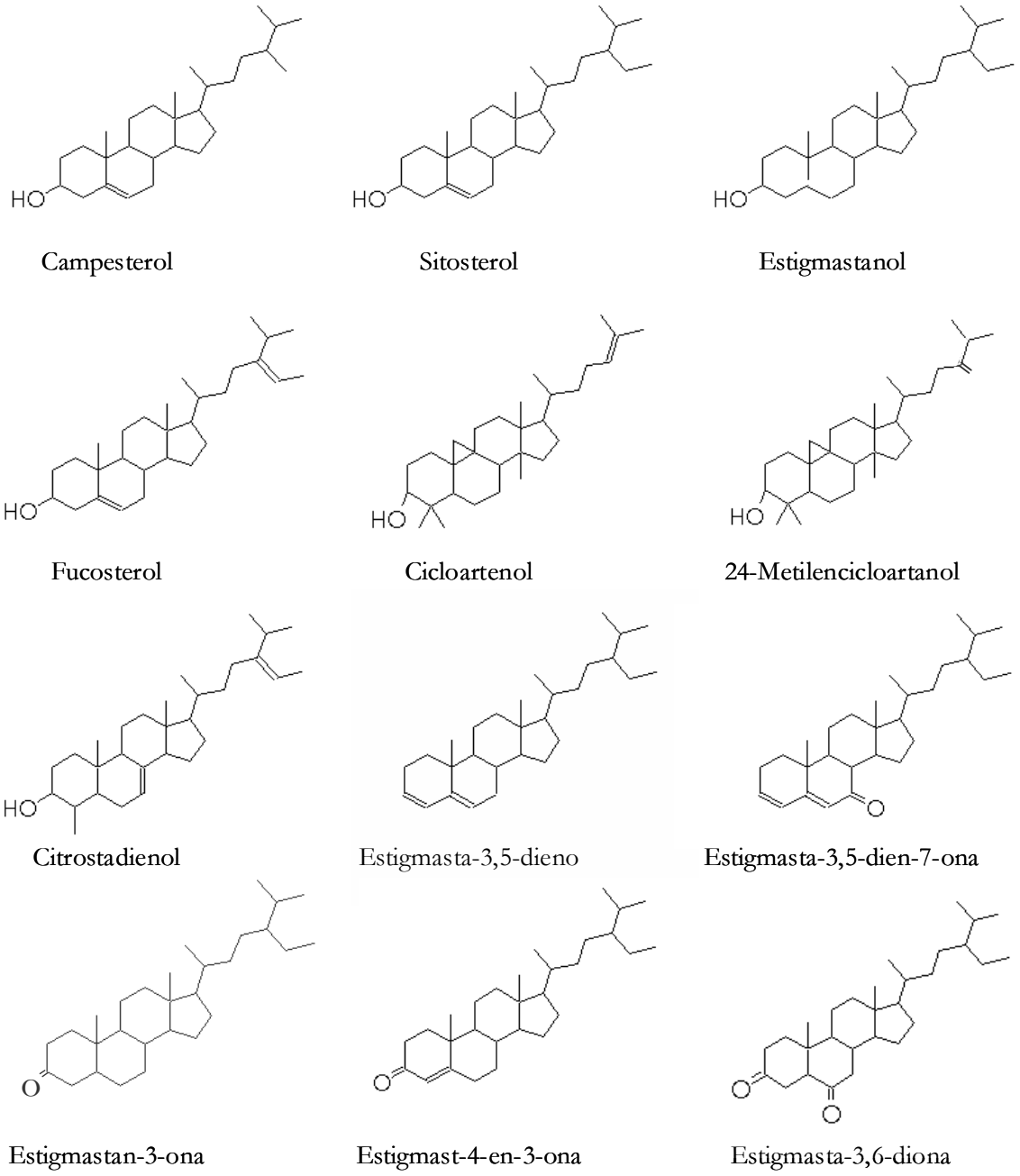

Figura 2. Estructura química de los principales compuestos esteroidales presentes en la madera de *E. globulus*. Los esteroles se encuentran en la madera en forma libre y esterificada con ácidos grasos.

Los esteroles, tanto libres como esterificados, constituyen la parte mayoritaria del extracto lipofílico de la madera de *E. globulus*, representando el 70 % del total de lípidos. El sitosterol, libre y esterificado, es el esterol más abundante, aunque en la madera de eucalipto existen esteroles minoritarios como el campesterol, estigmastanol, fucosterol, cicloartenol y 24-metilencicloartanol (Fig. 2) (Gutiérrez *et al.*, 1999a).

Como se describe en el Capítulo 1, los esteroles libres y esterificados son compuestos problemáticos durante la producción industrial de pasta de papel ya que son de difícil degradación y dan lugar a depósitos de "pitch". Existen estudios sobre la posible aplicación de hongos capaces de degradar la fracción lipofílica de la madera en la industria papelera (Gutiérrez *et al.*, 2001).

2. RESULTADOS

2.1. Degradación de esteroles libres y esterificados por hongos de podredumbre blanca y parda

En este trabajo se estudió la capacidad de 8 hongos de podredumbre blanca (*Ceriporiopsis subvermispora*, *Phlebia radiata*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Ganoderma australe*, *Pleurotus eryngii*, *Bjerkandera adusta, Pleurotus pulmonarius* y *Trametes versicolor*) y 7 de podredumbre parda (*Postia placenta*, *Laetiporus sulphureus*, *Coniophora puteana*, *Coniophora olivacea*, *Gloeophyllum trabeum, Lentinus degener* y *Fomitopsis palustris*) para degradar los esteroides presentes en la madera de *E. globulus*, durante 120 días de cultivo en condiciones de SSF, tomándose muestras a los 60, 90 y 120 días. En la Figuras 3 y 4 se muestran los análisis de GC/MS de los compuestos lipofílicos encontrados durante el tratamiento de la madera con los hongos de podredumbre blanca y parda seleccionados para este estudio. A continuación se realizó un seguimiento a lo largo del tiempo de la degradación de los esteroles más abundantes en la madera de *E. globulus*, el sitosterol libre y los ésteres de sitosterol (sitosteril linoleato y oleato).

En la Figura 5 se muestra la degradación de sitosterol por los diferentes hongos. Los hongos de podredumbre blanca degradaron el sitosterol con un porcentaje superior al 70 %, excepto *P. pulmonarius* (62 %) y *P. eryngii* (38 %). Los mayores porcentajes de degradación fueron de un 100 % con *T. versicolor*, un 99 % con *C. subvermispora* y un 98 % con *P. radiata*. En el caso de los hongos de podredumbre parda, todos presentaron un porcentaje de

degradación de sitosterol entre el 75 % y 99 %. Los hongos que más degradación causaron fueron *P. placenta* y *F. palustris* con un 96 % y 99 % respectivamente. Los hongos de podredumbre parda degradaron de forma más rápida el sitosterol que algunos de podredumbre blanca, ya que a los 60 días de cultivo todos presentaron un porcentaje de degradación superior a un 75 %, excepto *G. trabeum* (60 %). Por el contrario, entre los hongos de podredumbre blanca sólo *C. subvermispora*, *P. chrysosporium*, *P. radiata* y *T. versicolor,* presentaron un porcentaje de degradación superior al 75 % a los 60 días.

La degradación de los ésteres de sitosterol se muestra en la Figura 6. Todos los hongos de podredumbre blanca y parda presentaron un porcentaje de degradación superior al 65 %, salvo *P. eryngii* y *L. sulphureus* (con 19 % y 13 %, respectivamente). Los hongos de podredumbre blanca *C. subvermispora*, *P. radiata* y *T. versicolor* fueron los que degradaron de forma más eficaz los ésteres de sitosterol, con un porcentaje de degradación entre 98 % y 100 %. Entre los hongos de podredumbre parda, *G. trabeum* presentó el mayor porcentaje de degradación (99 %).

La pérdida de peso de la madera de *E. globulus* al final del tratamiento con los diferentes hongos ensayados se muestra en la Figura 7. Entre los hongos de podredumbre blanca, *T. versicolor* causó la mayor pérdida de peso (40 %) y un porcentaje de degradación de sitosterol libre y esterificado del 100 %. La pérdida de peso menor la causó *P. eryngii* (2,5 %), que degradó muy poco los esteroles libres y esterificados (38 % y 20 % respectivamente). *C. subvermispora* causó una pérdida de peso del 21 % y degradó de forma muy eficaz los esteroles (99 % de sitosterol libre y 97 % los ésteres de sitosterol).

Dentro de los hongos de podredumbre parda destaca la baja pérdida de peso (3 %) causada por *L. degener*, que sin embargo dio lugar a unos porcentajes muy altos de degradación de esteroles (94 % y 75 % para el sitosterol libre y los ésteres de sitosterol respectivamente). Los hongos de podredumbre parda que causaron mayores pérdidas de peso fueron *F. palustris* y *P. placenta* y (25 % y 20 %, respectivamente), que a su vez fueron los que produjeron una mayor degradación de sitosterol (96 % y 99 % respectivamente).

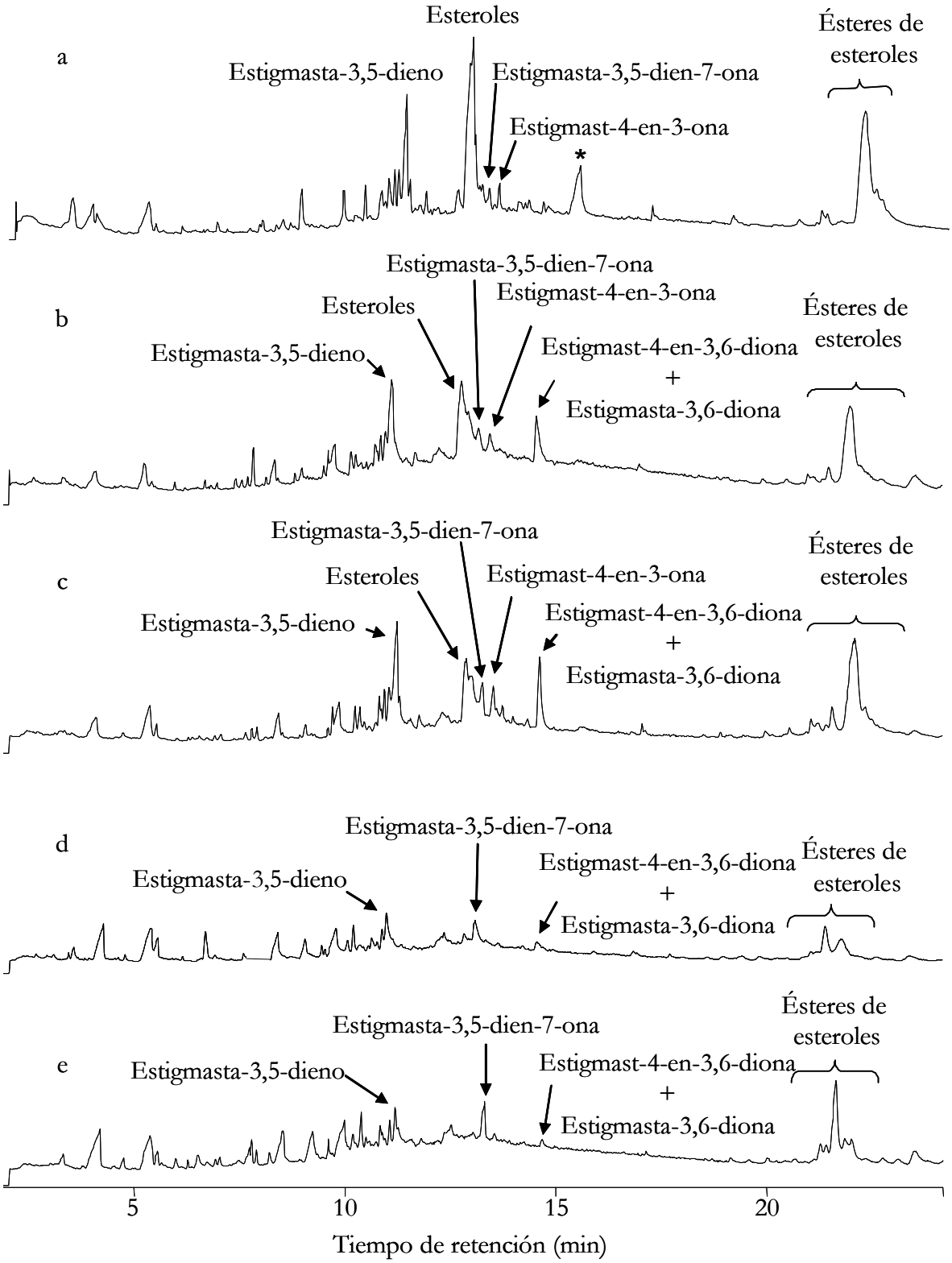

Figura 3. Cromatogramas de gases mostrando los diferentes compuestos lipídicos de la madera de *E. globulus*, durante el tratamiento en condiciones de SSF con hongos de podredumbre blanca (a: control, b: *B. adusta* 60 días, c: *B. adusta* 90 días, d: *T. versicolor* 60 días y e: *T. versicolor* 90 días) (* yangambina).

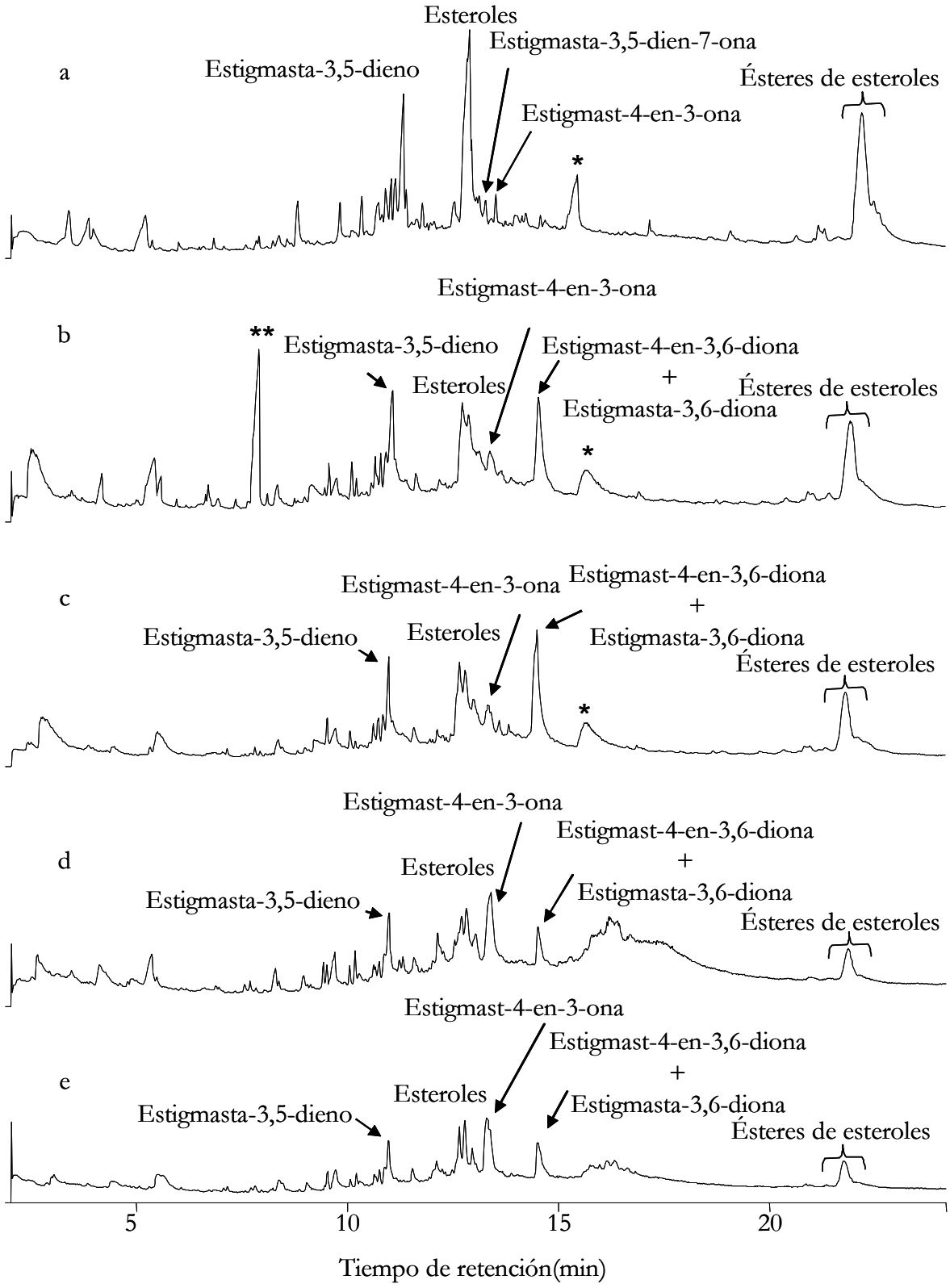

Figura 4. Cromatogramas mostrando los diferentes compuestos lipídicos de la madera de *E. globulus*, durante el tratamiento en condiciones de SSF con hongos de podredumbre parda (a: control, b: *C. olivacea* 60 días, c: *C. olivacea* 90 días, d: *F. palustris* 60 días, y e: *F. palustris* 90 días) (* yangambina y ** ftalato).

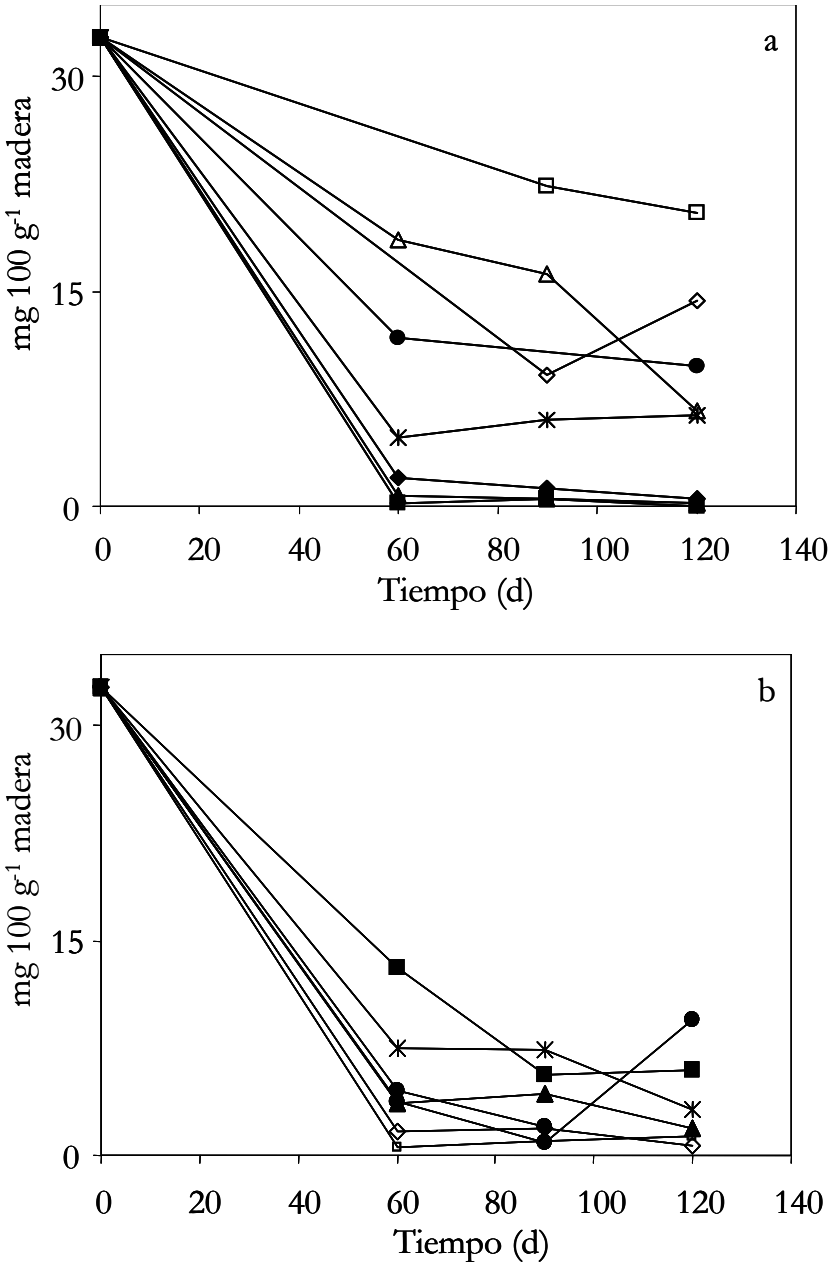

Figura 5. Evolución del sitosterol presente en la madera de *E. globulus* tratada, en condiciones de SSF, con los hongos de podredumbre blanca (a) *P. pulmonarius* (◊), *P. eryngii* (□), *B. adusta* (Δ), *C. subvermispora* (▲), *P. chrysosporium* (*), *G. australe* (●), *P. radiata* (♦) y *T. versicolor* (■), y de podredumbre parda (b) *L. sulphureus* (●), *L. degener* (▲), *G. trabeum* (■), *P. placenta* (□), *F. palustris* (◊), *C. olivacea* (*) y *C. puteana* (♦).

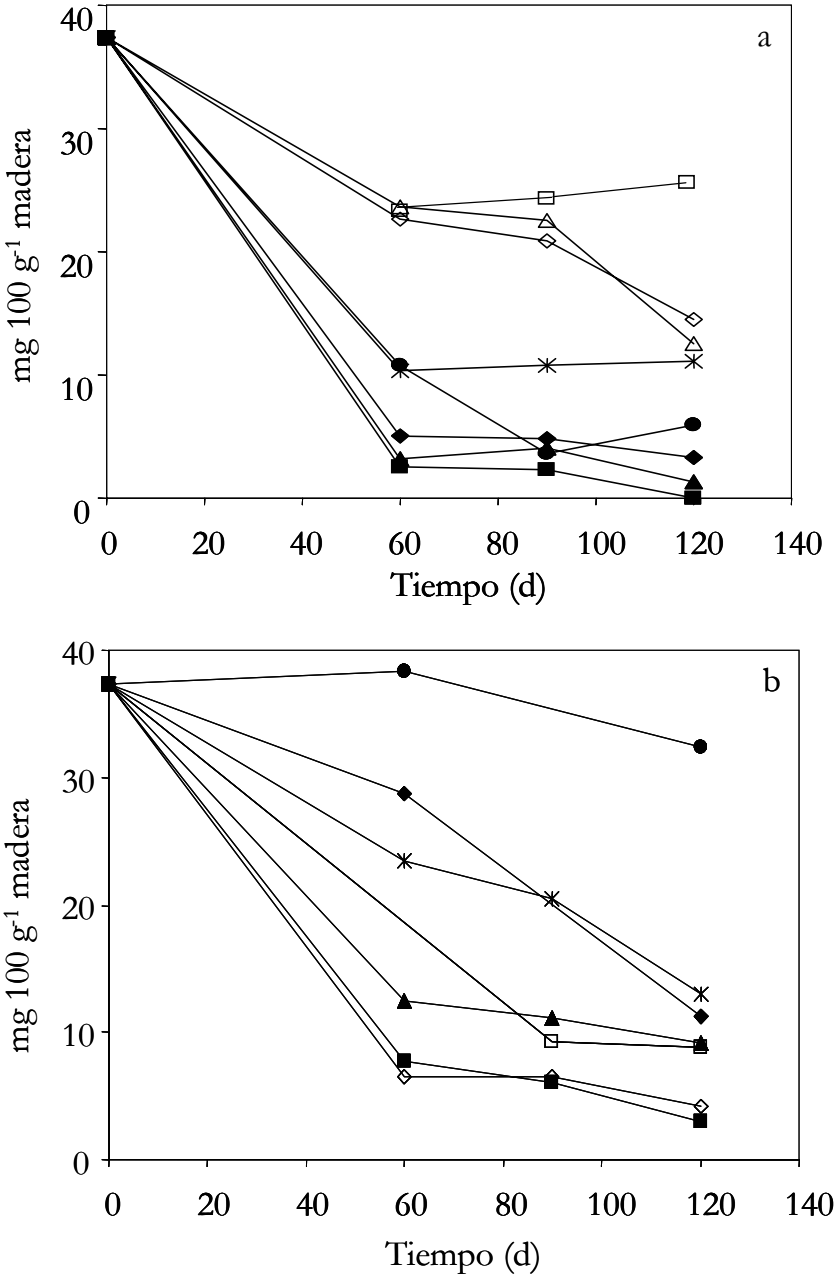

Figura 6. Evolución de los ésteres de sitosterol (sitosteril linoleato y oleato) presente en la madera de *E. globulus* tratada en condiciones de SSF, con los hongos de podredumbre blanca (a) *P. pulmonarius* (◊), *P. eryngii* (□), *B. adusta* (Δ), *C. subvermispora* (▲), *P. chrysosporium* (*), *G. australe* (●), *P. radiata* (♦) y *T. versicolor* (■), y de podredumbre parda (b) *L. sulphureus* (●), *L. degener* (▲), *G. trabeum* (■), *P. placenta* (□), *F. palustris* (◊), *C. olivacea* (*) y *C. puteana* (♦).

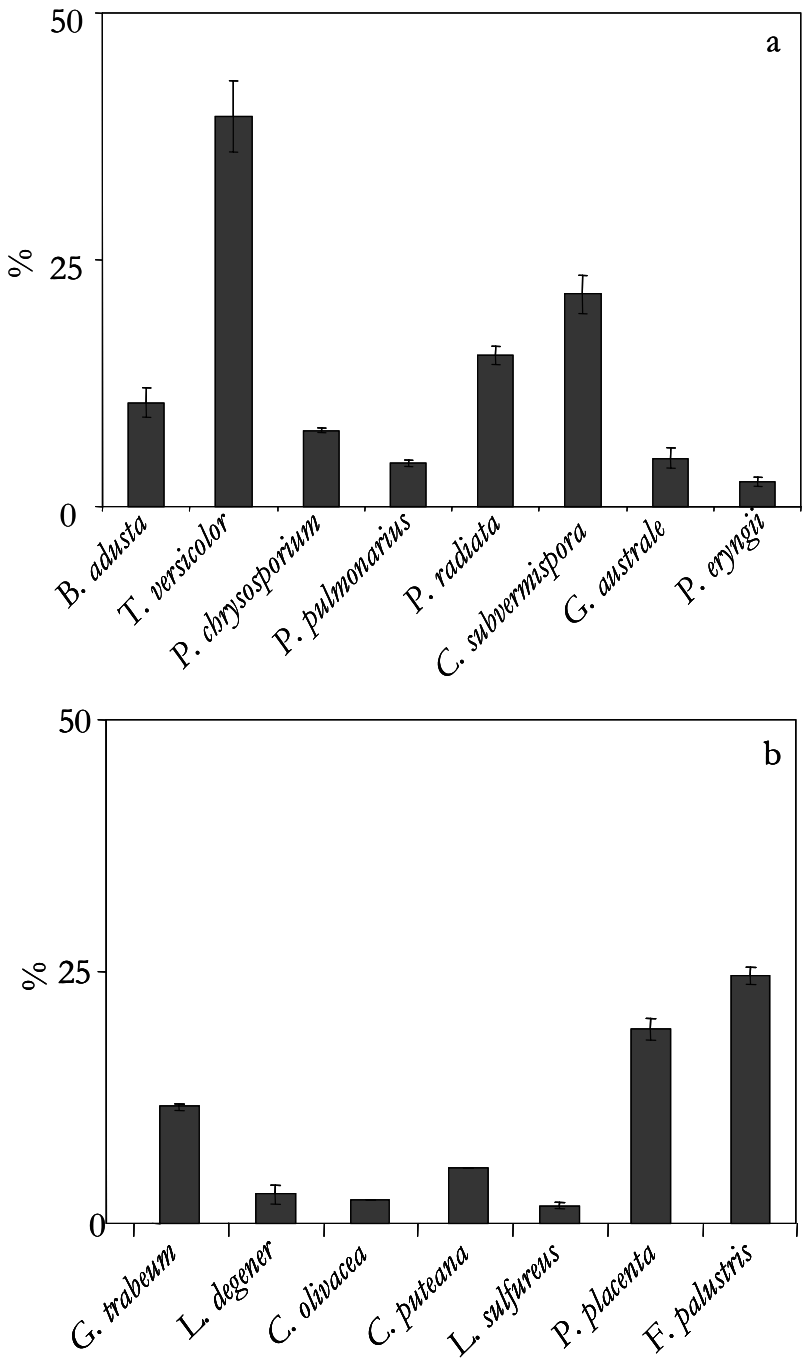

Figura 7. Pérdida de peso de la madera de *E. globulus* tras el tratamiento con hongos de podredumbre blanca (a) y parda (b), en condiciones de SSF durante 120 días de cultivo.

2.2. Evolución de las cetonas esteroidales en madera de *E. globulus* tratada con hongos de podredumbre blanca y parda

Durante el análisis de los lípidos de la madera se observaron importantes diferencias en la abundancia de las cetonas esteroidales según la madera se tratase con hongos de podredumbre blanca o parda (Figs. 8-13).

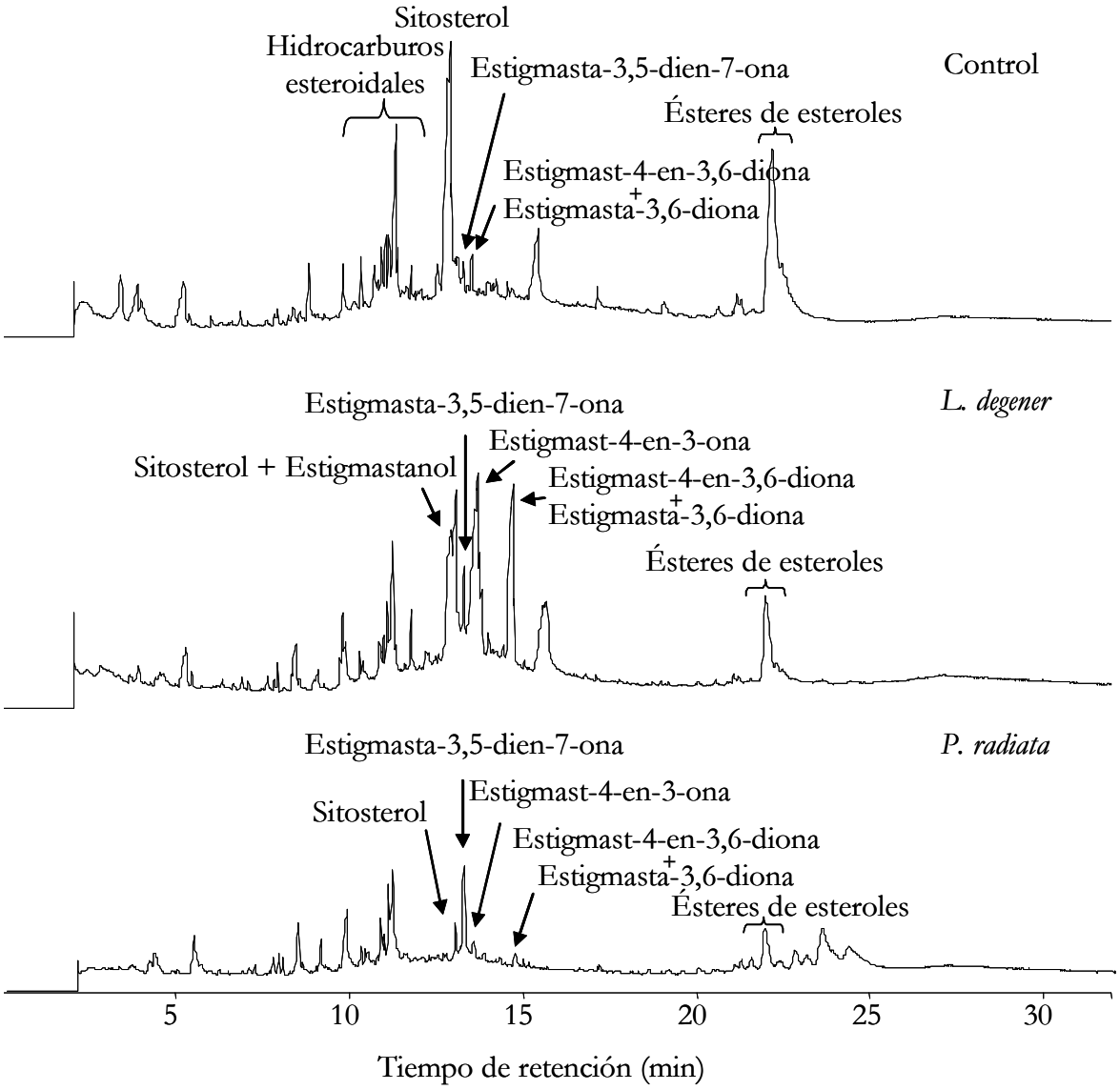

Figura 8. Cetonas esteroidales presentes en la madera de *E. globulus*, sin inocular y tratada con el hongo de podredumbre parda *L. degener* y el hongo de podredumbre blanca *P. radiata,* en condiciones de SSF, tras 120 días de cultivo durante 120 días de cultivo.

En general, en la mayoría de las muestras de madera tratadas, las cetonas esteroidales presentaron una concentración final superior a la concentración en el control sin inocular (la concentración de las cetonas se calculó teniendo en cuenta la pérdida de peso en cada caso).

En la Figura 9 se muestra la evolución de la estigmasta-3,5-dien-7-ona durante la degradación de madera de eucalipto por los diferentes hongos. En la madera tratada con hongos de podredumbre blanca, esta cetona aumentó hasta los 90 días para disminuir ligeramente a los 120 días. Las muestras que presentaron una mayor concentración de esta cetona fueron las maderas de eucalipto tratadas con *P. radiata*, *G. australe*, *P. chrysosporium* y *P. pulmonarius*. Su concentración fue entre 6,5 y 9 veces superior a la del control sin inocular.

En la madera tratada con hongos de podredumbre parda, el aumento de la estigmasta-3,5-dien-7-ona fue bastante menor y sólo evidente a partir de los 90 días de cultivo. En todos los casos se observó un ligero aumento a partir de los 90 días de cultivo salvo en las muestras tratadas con *G. trabeum* y *F. palustris*.

Por otro lado, la evolución de la estigmast-4-en-3-ona, durante la degradación de la madera tratada con los hongos, se muestra en la Figura 10. Esta cetona está presente en la madera control en muy baja concentración. Todos los hongos de podredumbre blanca, salvo *P. eryngii* y *B. adusta,* degradaron prácticamente toda la estigmast-4-en-3-ona, aunque fue perceptible un ligero aumento en su concentración durante las fases intermedias del cultivo (60 y 90 días).

Sin embargo, en la madera tratada con hongos de podredumbre parda, esta última cetona aumentó muy significativamente en la mayoría de los casos. Las concentraciones se incrementaron respecto al control sin inocular entre 3 veces en el caso de *C. olivacea* y hasta 23 veces en el caso de *L. degener*.

La evolución de la estigmast-4-en-3,6-diona a lo largo del periodo de degradación por los diversos hongos se muestra en la Figura 11. La concentración de esta cetona aumentó ligeramente en la madera tratada con algunos de los hongos de podredumbre blanca hasta los 90 días para luego disminuir.

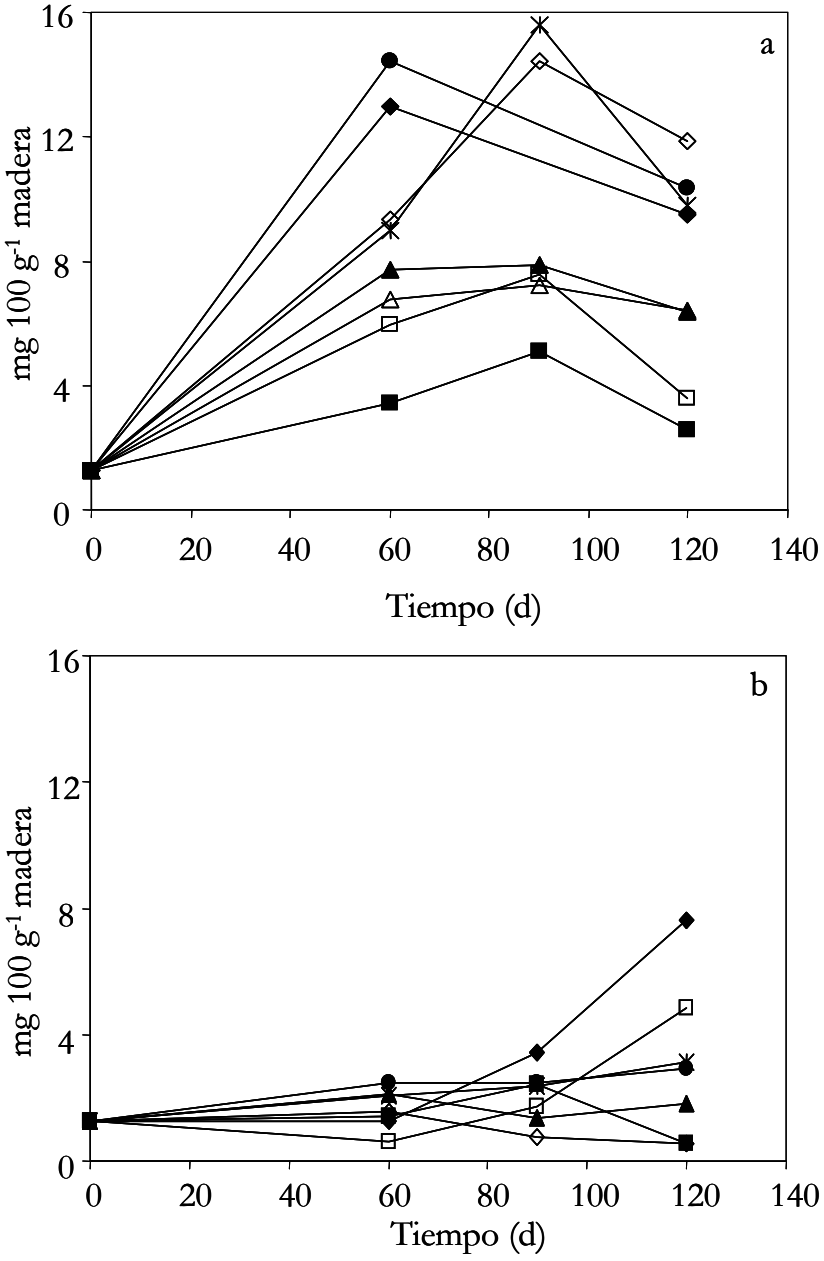

Figura 9. Evolución de la estigmasta-3,5-dien-7-ona en la madera de *E. globulus* tratada, en condiciones de SSF, con los hongos de podredumbre blanca (a) *P. pulmonarius* (◊), *P. eryngii* (□), *B. adusta* (Δ), *C. subvermispora* (▲), *P. chrysosporium* (*), *G. australe* (●), *P. radiata* (♦) y *T. versicolor* (■), y los hongos de podredumbre parda (b) *L. sulphureus* (●), *L. degener* (▲), *G. trabeum* (■), *P. placenta* (□), *F. palustris* (◊), *C. olivacea* (*) y *C. puteana* (♦).

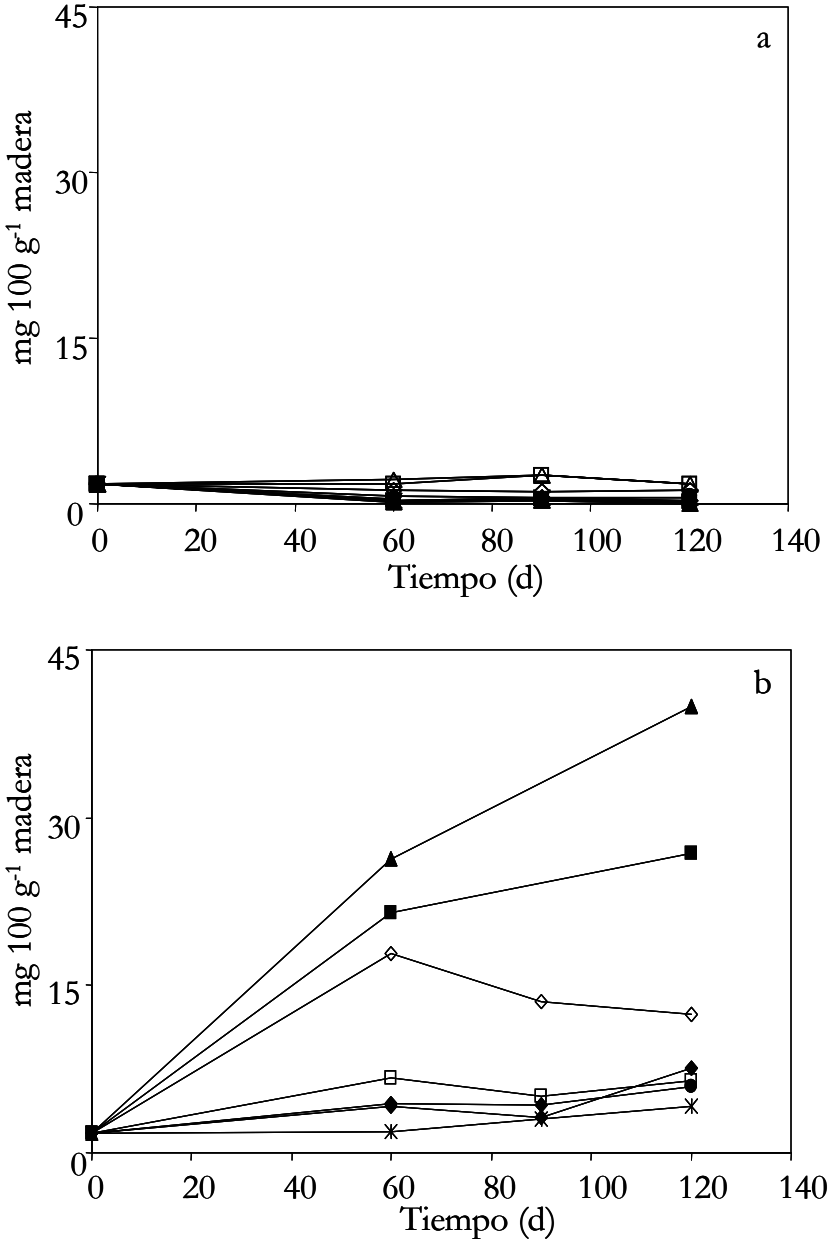

Figura 10. Evolución de la estigmast-4-en-3-ona en la madera de *E. globulus* tratada, en condiciones de SSF, con los hongos de podredumbre blanca (a) *P. pulmonarius* (◊), *P. eryngii* (□), *B. adusta* (Δ), *C. subvermispora* (▲), *P. chrysosporium* (*), *G. australe* (●), *P. radiata* (♦) y *T. versicolor* (■), y los hongos de podredumbre parda (b) *L. sulphureus* (●), *L. degener* (▲), *G. trabeum* (■), *P. placenta* (□), *F. palustris* (◊), *C. olivacea* (*) y *C. puteana* (♦).

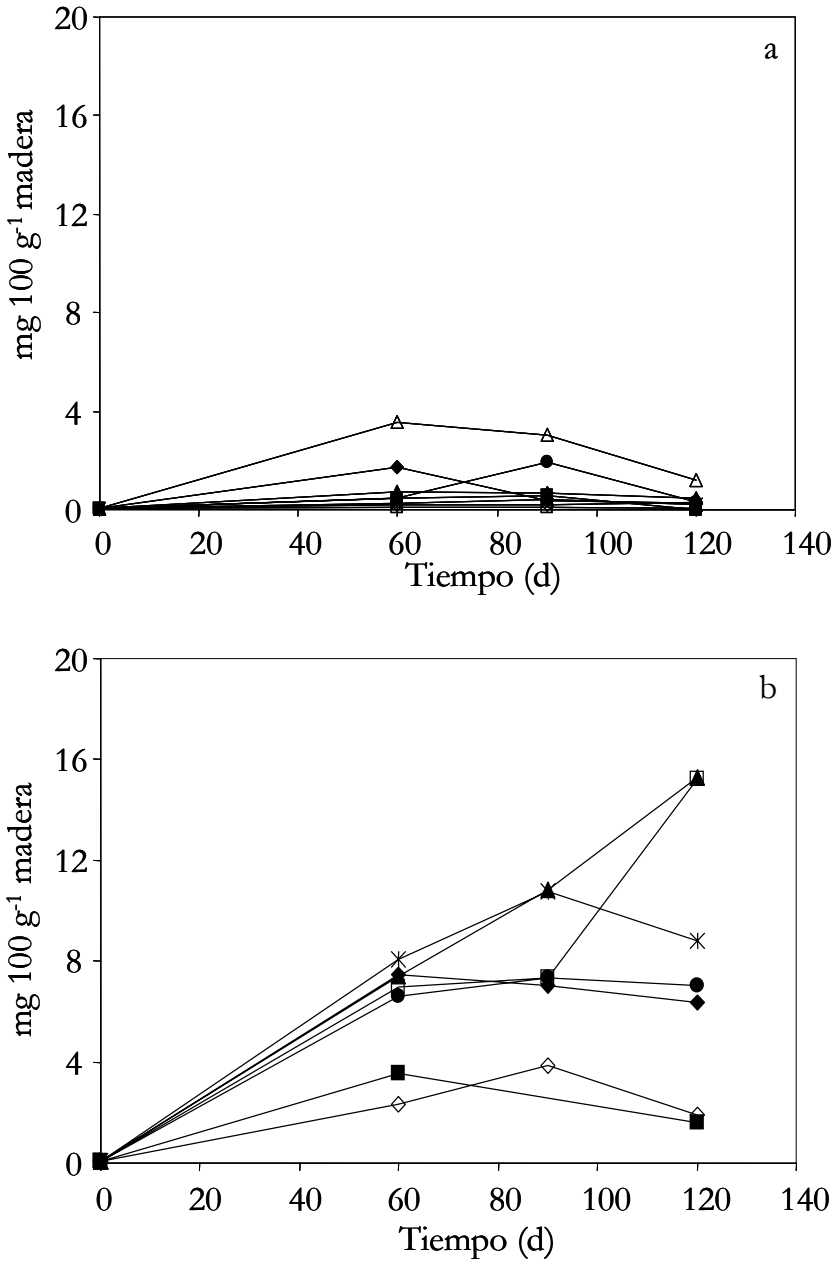

Figura 11. Evolución de la estigmast-4-en-3,6-diona en la madera de *E. globulus* tratada, en condiciones de SSF, con los hongos de podredumbre blanca (a) *P. pulmonarius* (◊), *P. eryngii* (□), *B. adusta* (Δ), *C. subvermispora* (▲), *P. chrysosporium* (*), *G. australe* (●), *P. radiata* (♦) y *T. versicolor* (■), y de podredumbre parda (b) *L. sulphureus* (●), *L. degener* (▲), *G. trabeum* (■), *P. placenta* (□), *F. palustris* (◊), *C. olivacea* (*) y *C. puteana* (♦).

En la madera tratada con los hongos de podredumbre parda el aumento fue mayor. En los casos de *P. placenta* y *L. degener* este aumento continuó hasta el final del cultivo (120 días) alcanzándose concentraciones de estigmast-4-en-3,6-diona de hasta 15 mg por 100 g de madera. En los casos de *C. puteana, L. sulphureus* y *C. olivacea*, las concentraciones finales fueron ligeramente inferiores. Finalmente, las muestras de madera tratadas con *F. palustris* y *G. trabeum* presentaron esta cetona en concentraciones semejantes a los hongos de podredumbre blanca (con una concentración final de 1,1-1,6 mg por 100 g de madera).

La evolución de la estigmasta-3,6-diona en las maderas de eucalipto tratadas con los diferentes hongos se muestra en la Figura 12. Este perfil fue similar al de la estigmast-4-en-3,6-diona descrita anteriormente. En la madera tratada con los diferentes hongos de podredumbre blanca, la estigmasta-3,6-diona fue degradada completamente, salvo en el caso de *B. adusta*.

Las maderas tratadas con hongos de podredumbre parda presentaron altos contenidos de estigmasta-3,6-diona. *P. placenta* y *L. degener* continuaron la producción de la cetona a lo largo de todo el cultivo, alcanzando concentraciones de 26-27 mg por 100 g de madera. En las maderas tratadas con estos dos hongos la suma de la estigmasta-3,6-diona y la estigmast-4-en-3,6-diona representó el porcentaje mayoritario de lípidos al final del cultivo. El resto de hongos de podredumbre parda aumentaron el contenido de esta cetona hasta los 90 días, cuando ésta empezó a ser degradada.

El perfil de la suma de todas las cetonas esteroidales estudiadas se muestra en la Figura 13. Su perfil varía según la madera de eucalipto sea tratada con hongos de podredumbre blanca o parda. En el primer caso, se produjo un aumento de las cetonas esteroidales durante los primeros días de cultivo, para terminar siendo degradas en mayor o menor medida, siendo la estigmasta-3,5-dien-7-ona la cetona mayoritaria en todos los casos.

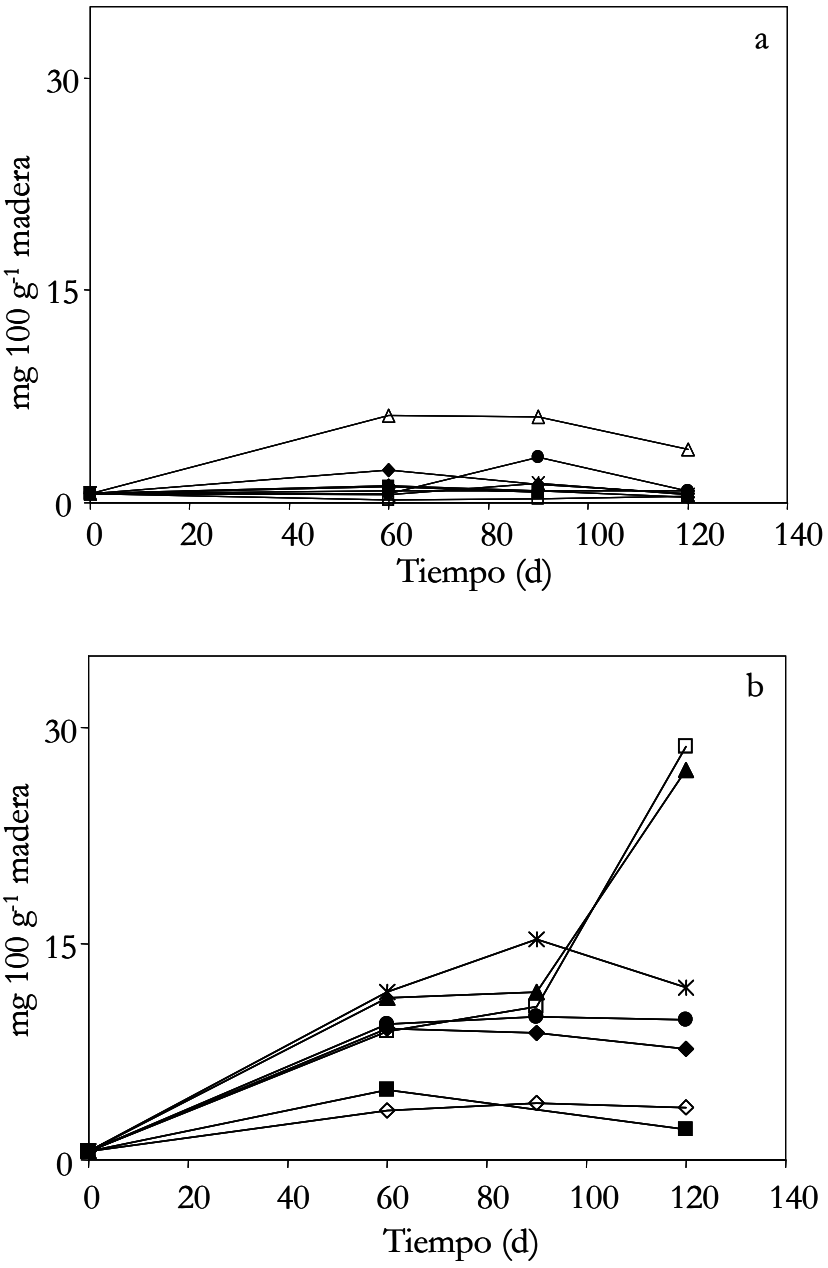

Figura 12. Evolución de la estigmasta-3,6-diona en la madera de *E. globulus* tratada, en condiciones de SSF, con los hongos de podredumbre blanca (a) *P. pulmonarius* (◊), *P. eryngii* (□), *B. adusta* (Δ), *C. subvermispora* (▲), *P. chrysosporium* (*), *G. australe* (●), *P. radiata* (♦) y *T. versicolor* (■), y de podredumbre parda (b) *L. sulphureus* (●), *L. degener* (▲), *G. trabeum* (■), *P. placenta* (□), *F. palustris* (◊), *C. olivacea* (*) y *C. puteana* (♦).

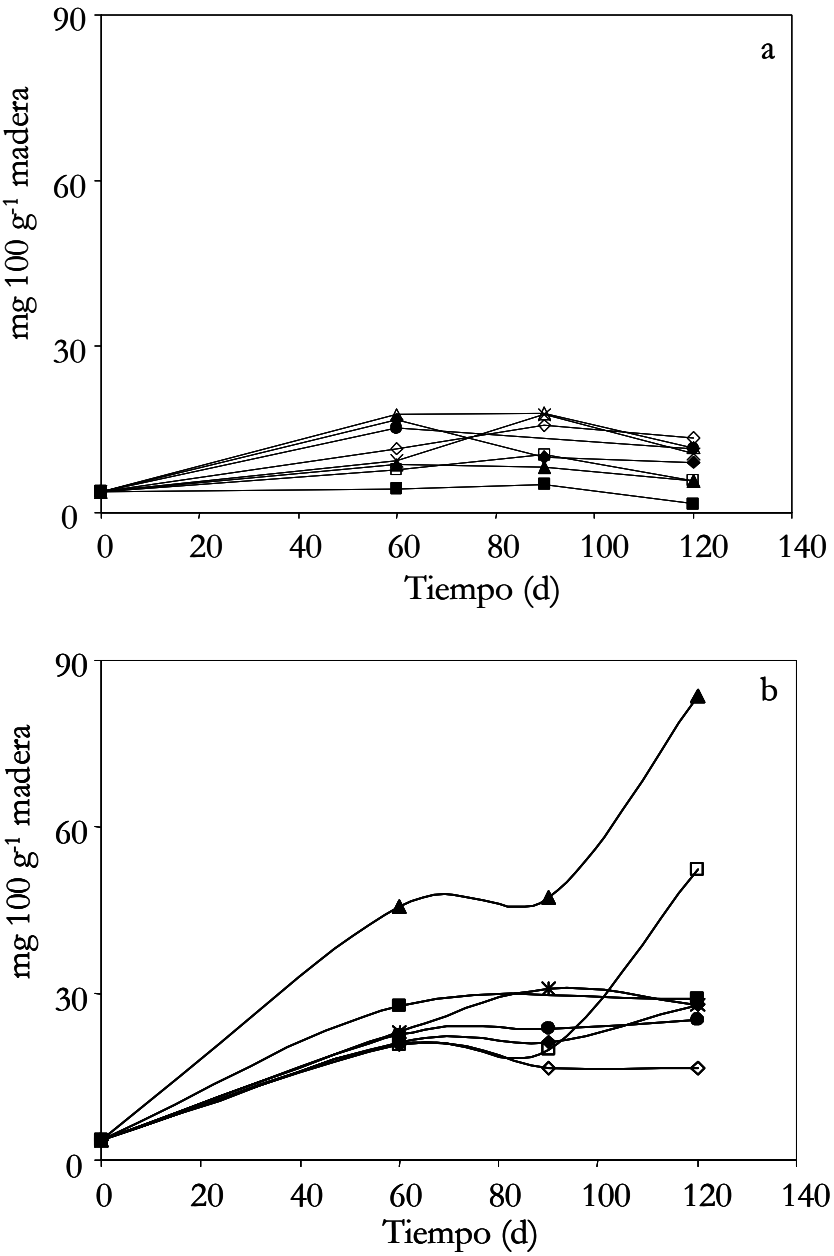

Figura 13. Cetonas esteroidales totales en la madera de *E. globulus* tratada, en condiciones de SSF, con los hongos de podredumbre blanca (a) *P. pulmonarius* (◊), *P. eryngii* (□), *B. adusta* (Δ), *C. subvermispora* (▲), *P. chrysosporium* (*), *G. australe* (●), *P. radiata* (♦) y *T. versicolor* (■), y de podredumbre parda (b) *L. sulphureus* (●), *L. degener* (▲), *G. trabeum* (■), *P. placenta* (□), *F. palustris* (◊), *C. olivacea* (*) y *C. puteana* (♦).

En las maderas tratadas con hongos de podredumbre parda, el total de cetonas esteroidales aumentó hasta los 60 días de cultivo alcanzando en todos los casos niveles superiores a los alcanzados en las tratadas con hongos de podredumbre blanca. En las maderas tratadas con *P. placenta, L. degener* (y en menor grado *C. puteana*) las cetonas esteroidales aumentaron durante todo el cultivo. En el resto de los casos se estabilizaron o fueron mínimamente degradadas. La estigmast-4-en-3,6-diona y la estigmasta-3,6-diona fueron las cetonas esteroidales mayoritarias seguidas de la estigmast-4-en-3-ona, salvo en las maderas tratadas con *G. trabeum* y *F. palustris*. En estos dos casos, la estigmast-4-en-3-ona fue mayoritaria, presentando las estigmastadionas bajas concentraciones. En la madera tratada con *L. degener* las tres cetonas presentaron altas concentraciones.

Otra diferencia entre el patrón de degradación de la madera por hongos de podredumbre blanca y parda, fue la presencia de 7-oxositosterol (aunque en concentraciones traza) en las muestras tratadas con hongos de podredumbre blanca y su ausencia en las muestras tratadas con hongos de podredumbre parda.

2.3. Síntesis de nuevos compuestos lipídicos por hongos de podredumbre blanca y parda

En algunas de las muestras de madera tratadas con hongos de podredumbre blanca o parda, se identificaron lípidos nuevos que no estaban presentes en la madera sin inocular y que son resultantes de la actividad fúngica.

En el caso de hongos de podredumbre blanca, se observó la producción de diversos ácidos dicarboxílicos en la madera tratada con *C. subvermispora* y *P. eryngii*. Estos compuestos, caracterizados por tener una cadena alquílica unida al grupo itacónico, como se describe en el Capítulo 3, fueron los lípidos mayoritarios en la madera tratada con *C. subvermispora* (Fig. 14). El perfil de la producción de estos nuevos compuestos (ácidos alquilitacónicos), así como su posible implicación en la biodegradación de la lignocelulosa, se describe en el Capítulo 4. En la madera tratada con *P. eryngii,* estos compuestos también se pudieron identificar aunque en concentraciones traza.

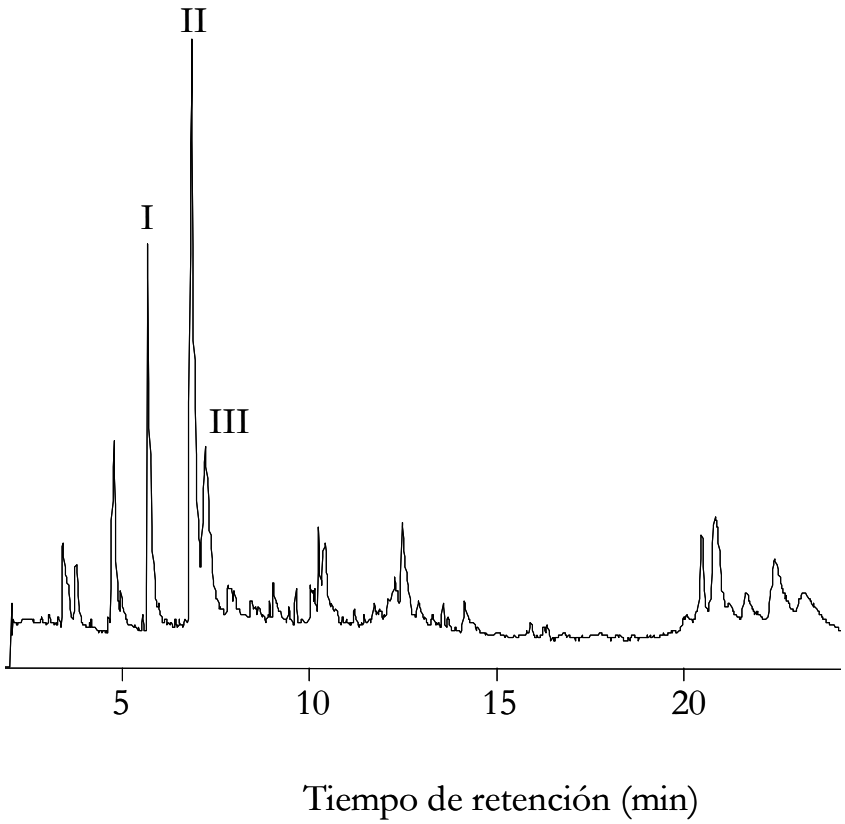

Figura 14. Cromatograma de gases del total de iones de la fracción lipofílica de madera de *E. globulus* tratada, en condiciones de SSF, con *C. subvermispora* durante 90 d (ácido tetradecilitacónico (I), ácido hexadecenilitacónico (II) y ácido hexadecilitacónico (III)).

En el caso de los hongos de podredumbre parda, se identificaron compuestos estructuralmente relacionados con los ácidos alquilitacónicos en cultivos de *P. placenta* y de *L. sulphureus*. En las maderas tratadas con *P. placenta* se identificaron, como se describe en el Capítulo 3, ácidos tricarboxílicos (ácido norcaperático y ácido agarícico). Estos compuestos, ausentes en la madera sin inocular, aumentaron hasta los 90 días de cultivo. A partir de los 90 días disminuyeron ligeramente, pasando a ser las dicetonas los lípidos mayoritarios (Fig. 15).

En las maderas tratadas con *L. sulphureus*, se identificaron compuestos de tipo anhídrido, como se describe en el Capítulo 3. Estos compuestos aparecieron a los 60 días de cultivo (Fig. 16) y durante el resto de cultivo no se detectaron. Por otro lado, la degradación de los ésteres de sitosterol fue baja siendo estos últimos compuestos los lípidos mayoritarios al final del cultivo (32 mg/100 g de madera).

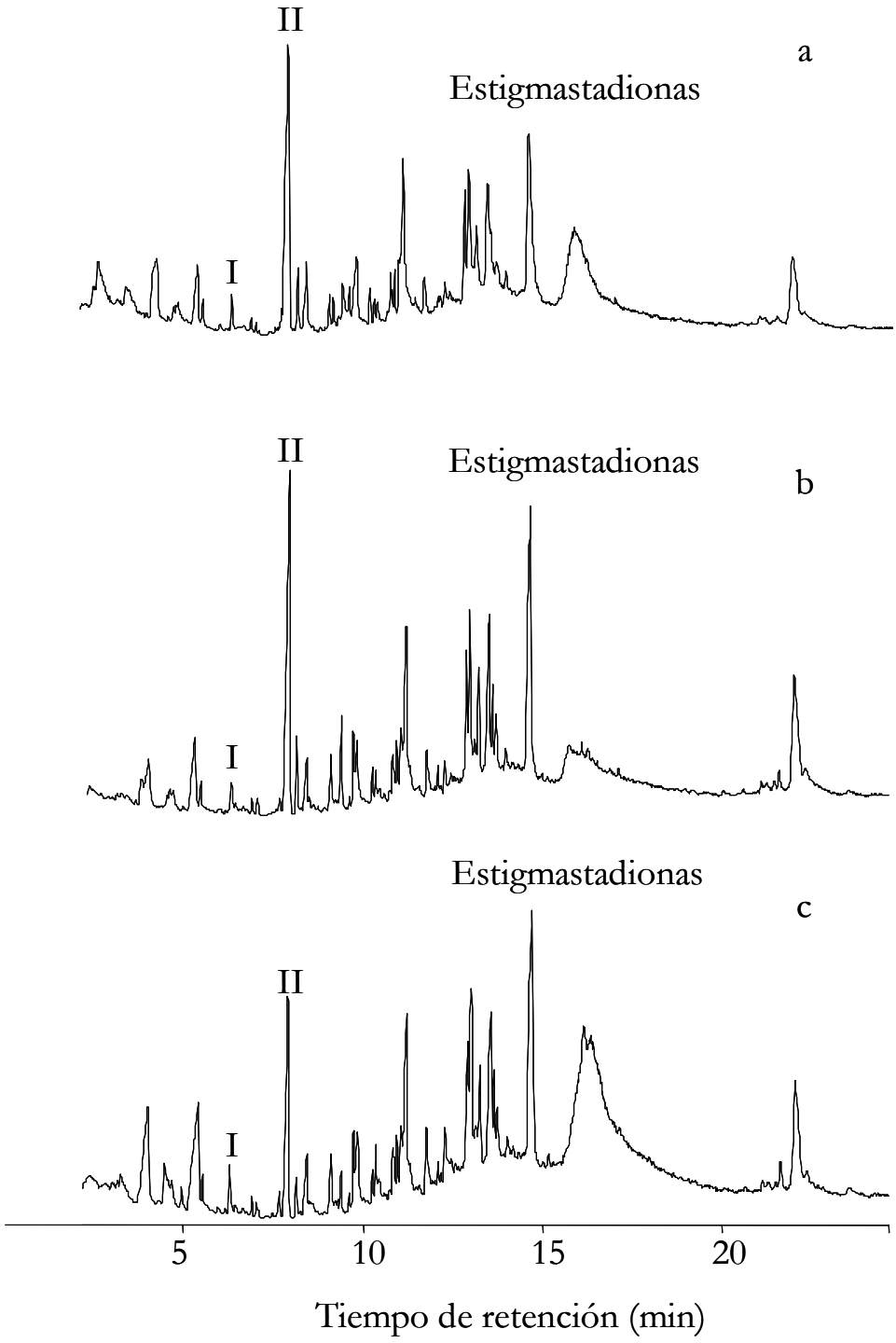

Figura 15. Cromatogramas de gases del total de iones de la fracción lipofílica de la madera de *E. globulus* tratada, en condiciones de SSF, con *P. placenta* durante 60 días (a), 90 días (b) y 120 días (c) (I: ácido norcaperático y II: ácido agarícico).

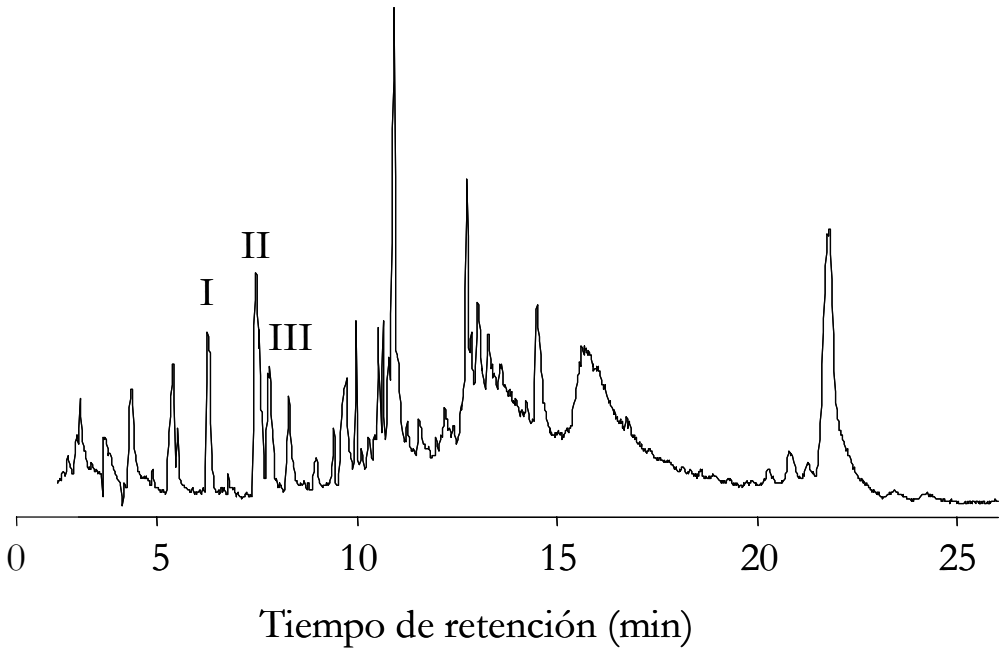

Figura 16. Cromatograma del total de iones de la fracción lipofílica de madera de *E. globulus* tratada, en condiciones de SSF, con *L. sulphureus* durante 60 días (I: anhídrido tetradecilitacónico, II: anhídrido hexadecenilitacónico y III: anhídrido hexadecilitacónico).

3. DISCUSIÓN

3.1. Degradación de los esteroles libres y esterificados

La eliminación del sitosterol libre y esterificado tiene gran importancia en la industria papelera ya que son compuestos muy pegajosos que forman el núcleo de los depósitos de "pitch" aglutinando a los demás componentes lipídicos (Gutiérrez *et al.*, 2001).

En el presente Capítulo se muestra que los ésteres de sitosterol así como los esteroles libres son degradados, en mayor o menor medida, por todas las especies fúngicas estudiadas. La degradación de esteroles por hongos es poco conocida. La degradación de los ésteres de esteroles puede iniciarse mediante esterol esterasas aunque estas enzimas son poco frecuentes (Gutiérrez *et al.*, 2001). Las esterol esterasas (esteril-éster acilhidrolasas, EC 3.1.1.13) son sintetizadas en tejidos de mamíferos, y por varias especies fúngicas y bacterianas (Okawa y Yamaguchi, 1977; Taketani *et al.*, 1981; Gandarias *et al.*, 1987; Calero Rueda *et al.*, 2002). Un vez hidrolizado el

enlace éster se generan ácidos grasos y esteroles libres. Los ácidos grasos pueden ser fácilmente degradados o utilizados en reacciones de peroxidación. Los esteroles libres liberados por la acción de esterol esterasas y los presentes de forma libre en la madera fueron degradados, en mayor o menor medida, por todas las especies fúngicas, a pesar de ser compuestos recalcitrantes. La degradación de los esteroles libres puede iniciarse mediante enzimas de tipo esterol oxidasa que dan lugar a cetonas esteroidales, pero también pueden producirse otras reacciones degradativas.

3.2. Síntesis y degradación de cetonas esteroidales

Los resultados obtenidos en el presente estudio parecen indicar una diferencia clara entre los hongos de podredumbre blanca y parda en lo que respecta a los patrones de degradación de los esteroles presentes en la madera de *E. globulus*. En maderas tratadas con hongos de podredumbre blanca las cetonas esteroidales aumentan en las fase intermedias de degradación para luego disminuir, en menor o mayor medida, siendo la más abundante la estigmasta-3,5-dien-7-ona. En el caso de *B. adusta* el comportamiento fue ligeramente diferente, con un contenido de estigmastadionas superior. Con los hongos de podredumbre parda las cetonas se fueron acumulando, siendo mayoritarias la estigmast-4-en-3,6-diona, la estigmasta-3,6-diona, y en menor medida, la estigmast-4-en-3-ona. Al final del cultivo comenzó también a acumularse la estigmasta-3,5-dien-7-ona. En las maderas tratadas con *G. trabeum* y *F. palustris* el comportamiento fue ligeramente diferente, siendo la cetona mayoritaria la estigmast-4-en-3-ona, y degradándose la estigmasta-3,5-dien-7-ona.

La degradación del sitosterol, al igual que la del colesterol, incluye reacciones de hidroxilación, deshidrogenación y reducción del anillo de esterano, y degradación de la cadena lateral (Izuka y Naito, 1968b; Malik, 1982). En el caso del colesterol las enzimas encargadas de llevar a cabo las reacciones de oxidación son inespecíficas como muestra la cantidad de productos generados a partir de un mismo sustrato. En la Tabla 1 se resumen varias reacciones de degradación de colesterol por diferentes organismos. Diversos microorganismos como *Arthrobacter*, *Bacillus, Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia, Streptomyces, Protaminobacter* y *Serratia*, son capaces de descomponer completamente el colesterol, pero no degradan el lanosterol ya que las

deshidrogenasas presentan especificidad en torno al grupo Δ^5 3-β-hidroxilo (Stadtman *et al.*, 1953; Marsheck *et al.*, 1972).

Tabla 1. Reacciones de conversión del colesterol por diferentes microorganismos (Izuka y Naito, 1968a).

Tipo de reacción	Producto	Organismo
Hidroxilación	4-Hidroxicolest-4-en-3-ona	*Streptomyces* sp
Deshidrogenación	Colest-4-en-3-ona	*Azotobacter* sp
		Arthrobacter simplex
		Mycobacterium cholesterolicum
		Nocardia restrictus
	Coleste-1,4-dien-3-ona	*Arthrobacter simplex*
	Colest-4-en-3,6-diona	*Mycobacterium cholesterolicum*
Reducción	5-β-Colesteran-3-β-ol	Bacterias intestinales
Degradación de la cadena	Ácido 3-oxobisnorcol-1,4-dienoico	*Nocardia* sp.

Se ha descrito que bacterias como *Arthobacter oxydans* son capaces de degradar el sitosterol hasta CO_2 (Dutta *et al.*, 1992). Para la degradación de esteroles existen dos puntos de ataque, el anillo de esterano y la cadena alquílica. En bacterias se considera que la degradación en estos dos puntos de ataque es simultánea y llevada a cabo por enzimas independientes (Peterson y Davis, 1964). Por el contrario, los hongos utilizados en la transformación de esteroides (ascomicetos, deuteromicetos y zigomicetos) no son capaces de degradar los anillos derivados del esterano (Buetow y Levedahl, 1964). Estos hongos, a diferencia de las bacterias, no degradan la cadena alquílica, aunque se ha descrito que *Fusarium solani* forma androstadiendiona (Stadtman *et al.*, 1953). En bacterias, la capacidad para degradar la cadena alquílica unida al C_{17} se ve inhibida tras la desaparición del grupo 3-β-hidroxilo (Marsheck *et al.*, 1972). Los hongos oxidan el grupo hidroxilo dando lugar a cetonas que podrían inhibir, igual que en algunas bacterias, a las enzimas responsables de la degradación de la cadena alquílica. En las muestras estudiadas no se encontraron productos de la degradación de la cadena alquílica, lo que puede ser debido a que los hongos oxidan rápidamente el grupo hidroxilo.

Atendiendo a las cetonas esteroidales presentes en la madera de eucalipto se podría considerar que la degradación del sitosterol por los hongos de

podredumbre blanca y parda tendría lugar mediante reacciones de deshidrogenación del anillo (ya que no se encontraron productos de degradación de la cadena alquílica). Existen diversos estudios en los que se afirma que, a diferencia de las bacterias, los hongos no son capaces de transformar los compuestos esteroidales en intermediarios no esteroidales. Sin embargo los resultados obtenidos en esta Tesis indican la notable capacidad para degradar esteroides de los basidiomicetos de podredumbre blanca de acuerdo con trabajos previos (Martínez *et al.*, 1999; Gutiérrez *et al.*, 1999b).

3.3. Rutas de transformación de esteroides por hongos de podredumbre blanca y parda

Las diferencias en los tipos de cetonas esteroidales identificadas en las maderas tratadas por los diversos hongos podría deberse a las diferentes enzimas oxidativas producidas. Una de las características que diferencia a estos organismos es la capacidad de sintetizar lacasa. Los hongos de podredumbre blanca son capaces de sintetizar dicha enzima durante la degradación de la madera, mientras que los hongos de podredumbre parda carecen de ella. La oxidación del sitosterol con lacasa en presencia del mediador HBT origina la estigmasta-3,5-dien-7-ona, como muestra la Figura 17.

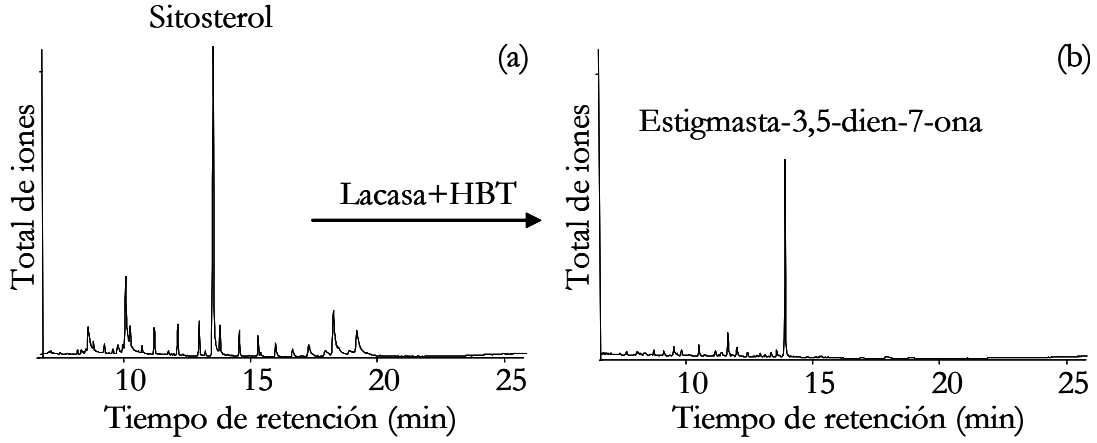

Figura 17. Cromatogramas del total de iones en los que se muestra: Control con sitosterol (a) y el resultado del tratamiento del sitosterol con lacasa y HBT como mediador (b) (ver Capítulo 4).

La presencia o ausencia de lacasa podría explicar las diferencias en cuanto a la acumulación de esta cetona. Los hongos de podredumbre parda no acumulan la estigmasta-3,5-dien-7-ona o lo hacen sólo al final del cultivo, mientras que los hongos de podredumbre blanca que presentan actividad lacasa dan lugar a niveles altos de esta cetona. Ésta se puede formar por la actividad de la lacasa que en presencia de mediadores naturales oxidarían el sitosterol originando el intermediario 7-oxositosterol y finalmente daría lugar a la estigmasta-3,5-dien-7-ona (Fig. 18A). La síntesis de compuestos fenólicos que pueden actuar como mediadores naturales ha sido descrita en cultivos de hongos de podredumbre blanca (Gutiérrez *et al.*, 1994) y compuestos similares podrían también derivar de la lignina. Recientemente se ha demostrado que algunos de ellos son mediadores eficaces de la lacasa (Camarero *et al.*, 2005).

Los hongos de podredumbre blanca son capaces de una degradación significativa de los esteroles mediada por oxidorreductasas ligninolíticas y, en las fases avanzadas de degradación se observa un descenso en los niveles de estigmasta-3,5-dien-7-ona.

En el caso de hongos de podredumbre parda, a partir del sitosterol se formaría la estigmast-4-en-3-ona por oxidación del grupo hidroxilo unido al C_3 por acción de una esterol oxidasa (Fig. 18B). Esta cetona se acumula principalmente en *G. trabeum* y *F. palustris*. El resto de hongos de podredumbre parda continúan la degradación. El carbono 6 presenta cierta vulnerabilidad (Stadtman *et al.*, 1953) y mediante su hidroxilación se origina la 6-hidroxi-estigmast-4-en–ona. Este grupo hidroxilo sería oxidado dando lugar a la estigmast-4-en-3,6-diona que tras la saturación del doble enlace en posición 4 daría lugar a la estigmasta-3,6-diona.

Tal como se ha mencionado anteriormente los hongos no parecen degradar la cadena alquílica unida al C_{17}. Por lo tanto, las dos últimas estigmastadionas se acumularían como productos de la degradación del sitosterol libre y esterificado en los cultivos de los hongos de podredumbre parda.

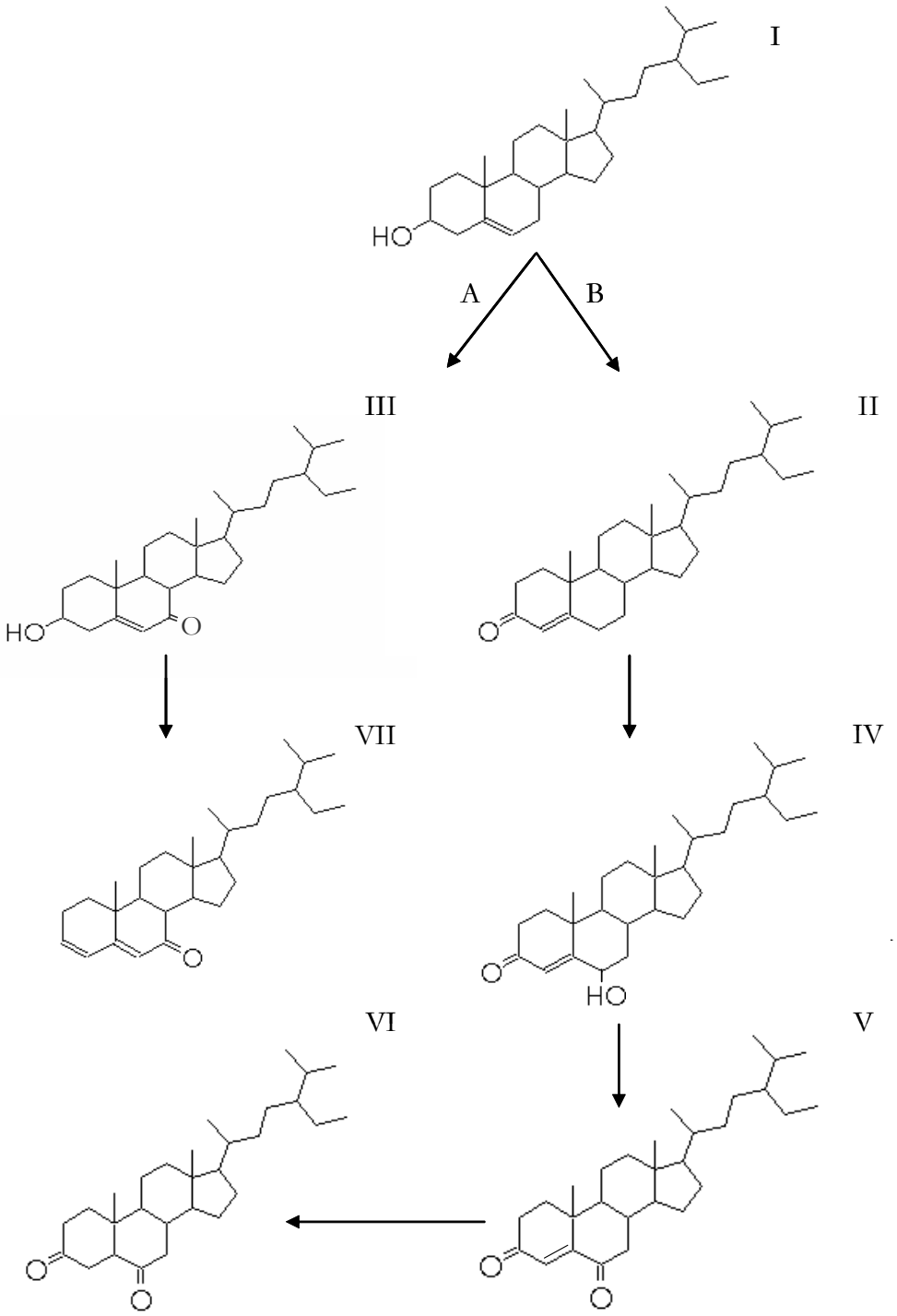

Figura 18. Rutas propuestas para la biotransformación de sitosterol mediante reacciones de oxidación en hongos de podredumbre blanca (A) y en hongos de podredumbre parda (B); I) sitosterol, II) estigmast-4-en-3-ona, III) 7-oxositosterol, IV) 4-hidroxiestigmast-4-en-3,6-diona, V) estigmast-4-en-3,6-diona, VI) estigmasta-3,6-diona y VII) estigmasta-3,5-dien-7-ona.

3.4. Síntesis de ácidos/anhídridos di-tricarboxílicos

La principal diferencia entre los hongos de podredumbre blanca y los de podredumbre parda radica en el patrón de degradación de la lignocelulosa. Los hongos de podredumbre parda degradan extensivamente la celulosa con una baja degradación de la lignina. Por el contrario, los hongos de podredumbre blanca degradan extensivamente la lignina de forma selectiva o simultánea con la celulosa (Martínez, 2006). La forma diferente de degradación de la lignocelulosa podría ser debida a la capacidad de ciertos hongos (*C. subvermispora* y *P. eryngii)* para sintetizar ciertos ácidos dicarboxílicos. Estos dos hongos dan lugar a un patrón de degradación selectiva de lignina, con una degradación mínima de la celulosa. Como se discute en el Capítulo 4, se ha sugerido que estos compuestos podrían inhibir la reacción de Fenton quelando el Fe^{3+}, lo que suprimiría la producción del radical hidroxilo limitándose la degradación de la celulosa (Watanabe *et al.*, 2001; Enoki *et al.*, 2002).

De las muestras tratadas con hongos de podredumbre parda se aislaron compuestos estructuralmente parecidos en los casos de *L. sulphureus* y *P. placenta.* La degradación de celulosa por *L. sulphureus* puede ser debida a que los compuestos sintetizados son anhídridos lo que imposibilita su unión al Fe^{3+}. En el caso de *P. placenta* los compuestos identificados fueron compuestos tricarboxílicos que, en principio podrían ser precusores directos de los ácidos y anhídridos dicarboxílicos (Capítulo 3). Sin embargo, en ninguna de las muestras se identificaron ácidos o anhídridos dicarboxílicos. Por lo tanto, *P. placenta,* a diferencia de *C. subvermispora* y *L. sulphureus*, no continúa la síntesis a través de la deshidratación y descarboxilación de los precusores, de ahí que los productos acumulados sean ácidos tricarboxílicos. Su estructura química tricarboxílica con un grupo hidroxilo libre, no es favorable para quelar metales, con lo que no se inhibiría la formación de hidroxilo.

Capítulo 3

Nuevos metabolitos fúngicos durante la degradación de madera de eucalipto: Identificación por GC/MS y 2D-NMR

Resumen. En este Capítulo se identifican nuevos compuestos lipídicos sintetizados por hongos de podredumbre blanca y parda durante su crecimiento sobre madera de eucalipto en condiciones de SSF (Capítulo 2). Estos nuevos metabolitos se identifican mediante GC/MS de los extractos lipídicos y 2D-NMR (^{1}H-^{13}C), en experimentos HSQC y HMBC, de los compuestos purificados por una combinación de SPE y HPLC. Estos nuevos compuestos son ácidos/anhídridos alquilitacónicos sintetizados por *Laetiporus sulphureus* y *Ceriporiopsis subvermispora* y aquilcítricos sintetizados por *Postia placenta*. Se propone como ruta de síntesis una desviación del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y reacciones de isomerización que dan lugar a las formas anhídridas.

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos filamentosos producen ácidos orgánicos para mantener en el medio un pH apto para su crecimiento y utilizarlos como defensa frente a otros microorganismos, entre otras funciones. El tipo de ácido orgánico y su concentración dependen del tipo de microorganismo y de la composición del medio (Dart y Stretton, 1976; Dart, 1976).

Los ácidos orgánicos acumulados por los hongos filamentosos se clasifican en dos grupos, aquéllos que derivan de carbohidratos (ácido láctico, ácido glucónico, etc.) y los derivados del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Los metabolitos de este último grupo se dividen en tres clases atendiendo al tipo de reacción de la que resultan: i) condensación entre el grupo carboxilo de un intermediario dicarboxílico de 4 átomos de carbono con el α-metileno de ácidos grasos; ii) condensación del grupo carbonilo del ácido oxalacético con el grupo metileno de ácidos orgánicos; y iii) los llamados nonádridos producidos por la dimerización de los metabolitos, normalmente de 9 átomos de carbono, obtenidos en el caso ii.

Dentro de los derivados del ciclo de los ácidos tricarboxílicos de tipo ii destaca por su aplicación industrial la producción de ácido itacónico por *Aspergillus terreus* (Calam *et al.*, 1939; Kubicek, 2001). El ácido itacónico se describió por primera vez en 1931 en *Aspergillus itaconicus* (Kinoshita, 1931; Turner, 1971; Bonnarme *et al.*, 1995) y posteriormente en otras especies fúngicas como *Helicobasidium mompa* (Araki *et al.*, 1957), *Ustilago zeae* (Haskins *et al.*, 1995) y *Ustilago maydis* (Guevarra y Tabuchi, 1990), así como en algunas levaduras del género *Candida* (Tabuchi, 1981).

Compuestos alquílicos de tipo ii derivados del ácido cítrico han sido descritos anteriormente en varios hongos, incluyendo el ácido tetradecilcítrico (ácido norcaperático) sintetizado por *Cantharellus floccosus* (Miyata *et al.*, 1966) y el ácido hexadecilcítrico (ácido agarícico) sintetizado por *Polyporus officinalis*. En ambos casos, la mayor concentración de estos compuestos se encuentra en los carpóforos y se cree que son los responsables de la toxicidad que presentan estos hongos. Estos compuestos actúan sobre el sistema parasimpático provocando alteraciones gastrointestinales con deshidratación, anorexia, hipotermia y vómitos. La toxicidad del ácido norcaperático es mayor que la que presenta el ácido agarícico (Miyata *et al.*, 1966).

En este trabajo se describen una serie de compuestos derivados del ciclo de los ácidos tricarboxílicos mediante reacciones de tipo ii, sintetizados por

diversos hongos de podredumbre blanca y parda durante la degradación de madera de *Eucalyptus globulus* en condiciones de SSF. Estos compuestos están constituidos por una larga cadena alquílica saturada o mono-insaturada unida al ácido cítrico o al ácido itacónico.

2. RESULTADOS

2.1. Identificación de nuevos lípidos alquil-di/tri-carboxílicos en cultivos de hongos sobre madera de eucalipto en condiciones de SSF

Se han identificado diferentes compuestos con estructura de tipo alquil-di/tri-carboxílico en cultivos de hongos de podredumbre blanca (*C. subvermispora)* y de podredumbre parda (*P. placenta* y *L. sulphureus*). Entre estos compuestos cabe destacar las series de ácidos alquilitacónicos, ácidos alquilcítricos y anhídridos alquilitacónicos.

2.2 Identificación de ácidos alquilitacónicos en cultivos de *C. subvermispora*

La estructura química de los metabolitos fúngicos presentes en los cultivos de *C. subvermispora* se determinó tras el análisis por GC/MS de los extractos sin derivatizar, así como de los extractos metilados y silanizados. Dichos análisis revelaron que estos compuestos eran ácidos dicarboxílicos insaturados, constituidos por una larga cadena alifática unida al carbono 3 del ácido itacónico (ácido propen-2,3-dicarboxílico). En la Figura 1 se muestra un cromatograma del extracto lipídico de madera de *E. globulus* tratada con *C. subvermispora* donde se observan los tres ácidos alquilitacónicos mayoritarios (I, II y III) cuyos tiempos de retención fueron 6,36 min, 7,60 min y 7,99 min, respectivamente.

Los tres picos mayoritarios se identificaron como ácido 2-metilen-3-carboxiheptadecanoico (ácido tetradecilitacónico, I); ácido 2-metilen-3-carboxi-10-nonadecenoico (ácido 7-hexadecenilitacónico, II); y ácido 2-metilen-3-carboxinonadecanoico (ácido hexadecilitacónico, III); cuyas estructuras químicas se muestran en la Figura 2.

La identificación de estos compuestos se llevó a cabo a partir de sus espectros de masas (Figs. 3-5). Como se observa en la Figura 3, los picos I (ácido tetradecilitacónico) y III (ácido hexadecilitacónico), sin derivatizar, presentaron un patrón de fragmentación muy similar, con un pico base de

m/z 126 y un fragmento intenso de *m/z* 150. El pico II (ácido 7-hexadecenilitacónico) presentó un patrón de fragmentación diferente a los dos anteriores aunque se observaron fragmentos de *m/z* 126 y *m/z* 151 lo que sugiere que posee una estructura similar.

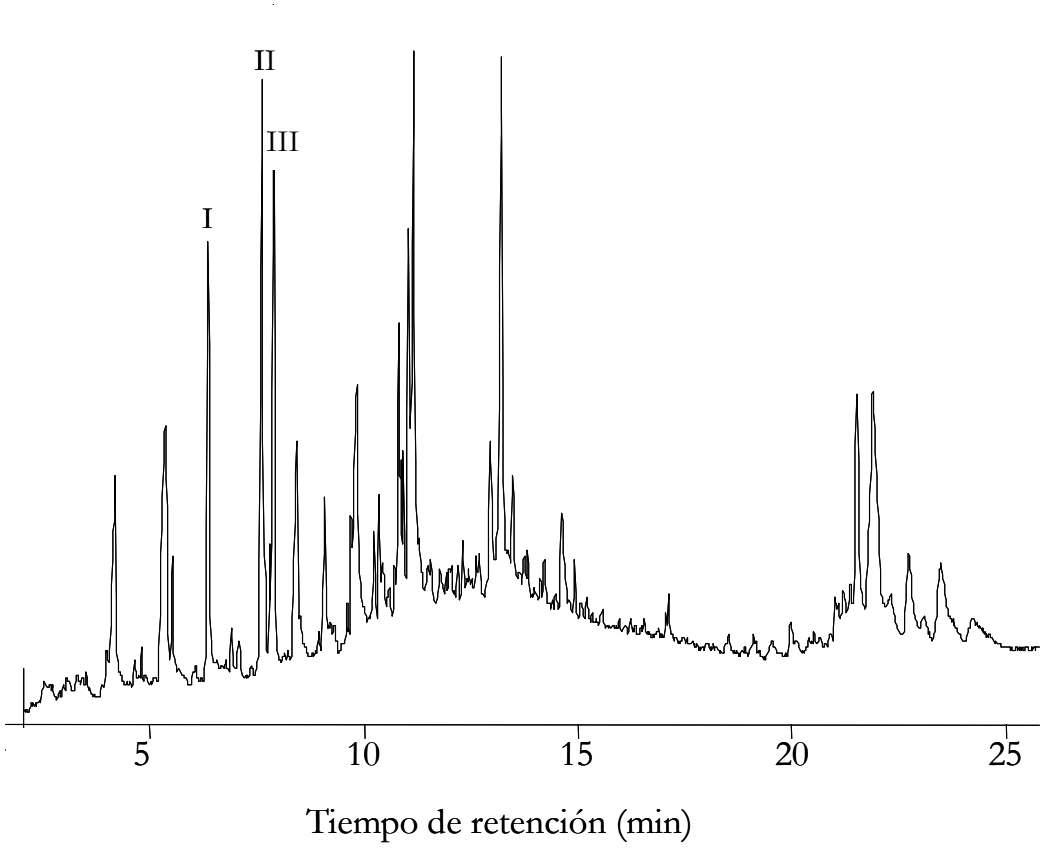

Figura 1. Cromatograma del total de iones de la fracción lipídica de madera de *E. globulus* tratada con *C. subvermispora* en condiciones de SSF, donde se observan los ácidos alquilitacónicos: I) ácido tetradecilitacónico, II) ácido 7-hexadecenilitacónico y III) ácido hexadecilitacónico.

El pico base de *m/z* 126 se forma a partir del isómero citracónico por eliminación de una molécula de agua seguida de una transposición de McLafferty del ión resultante (Keogh y Zurita, 1977). La pérdida del grupo carbonilo del pico base da lugar al ión de *m/z* 98. El ión molecular de estos compuestos (con valores de *m/z* 326, *m/z* 352 y *m/z* 354 para los picos I, II y III respectivamente) no se observó en los espectros, pero se pudo deducir a partir del ión (M^+-18) [M-H_2O] de *m/z* 308, *m/z* 334 y

m/z 336, respectivamente, que pierde de nuevo otra molécula de agua produciendo los iones (M^+-36) de *m/z* 290, *m/z* 316 y *m/z* 318. Otros fragmentos derivados directamente del ión molecular son (M^+-18-45) [M-H_2O-COOH] de *m/z* 263, *m/z* 289 y *m/z* 291 (especialmente abundante en el pico II) y (M^+-91) [M-COOH-COOH-H] de *m/z* 235, *m/z* 261 y *m/z* 263 para los picos I, II y III, respectivamente.

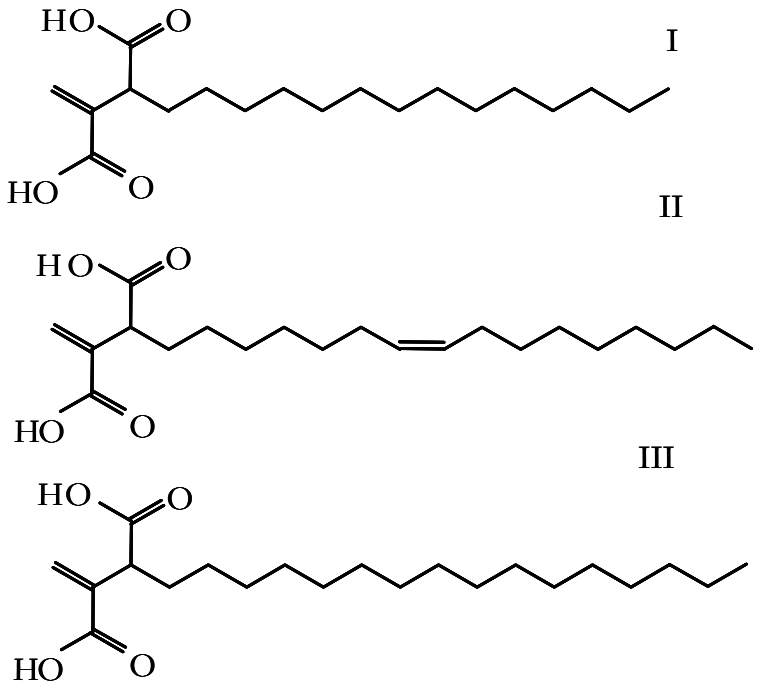

Figura 2. Estructura química de los ácidos alquilitacónicos identificados en la madera de *E. globulus* tratada con *C. subvermispora* en condiciones de SSF: I) ácido tetradecilitacónico, II) ácido 7-hexadecenilitacónico y III) ácido hexadecilitacónico.

Los espectros de masas de los ácidos alquilitacónicos metilados se muestran en la Figura 4. La metilación de estos compuestos introdujo dos grupos metilo indicando que se trataba de ácidos dicarboxílicos. Los espectros de masas de los compuestos I y III metilados, son muy parecidos diferenciándose en dos grupos metilénicos en el ión molecular. Ambos compuestos presentaron un pico base de *m/z* 157 procedente del grupo

itacónico metilado tras la ruptura del enlace con la cadena alquílica. El fragmento de *m/z* 171 se forma de la misma manera a partir del isómero citracónico. Una transposición de McLafferty del éster metílico da lugar al fragmento *m/z* 158. Los iones moleculares de los picos I y III metilados son de *m/z* 354 y *m/z* 382, respectivamente y, en este caso, se observaron en el espectro de masas. La pérdida de un grupo metoxilo [M-OCH_3] dio lugar a fragmentos de *m/z* 323 y *m/z* 351 para los picos I y III respectivamente, mientras que la pérdida de un grupo carboxilo metilado [M-$COOCH_3$] dio fragmentos de *m/z* 295 y *m/z* 323.

En el caso del pico II, el ión molecular de *m/z* 380 fue poco abundante mientras que los iones de *m/z* 349 y *m/z* 321, procedentes de la pérdida de un grupo metoxilo y carboxilo metilado, respectivamente, estuvieron presentes de forma evidente, al igual que el fragmento de *m/z* 157.

Por otro lado, es de destacar que al aumentar el tiempo de reacción con el agente metilante, los picos de ácidos alquilitacónicos metilados disminuían apareciendo picos con espectros característicos de los ácidos alquilcitracónicos metilados.

La silanización tras una metilación previa no introdujo ningún grupo trimetilsililo (TMSi), lo que confirmó la ausencia de grupos hidroxilo libres.

El espectro de masas de los compuestos silanizados, se muestra en la Figura 5. La silanización introdujo dos grupos TMSi, lo que ratificó que se trataba de compuestos dicarboxílicos, que no presentan grupos hidroxilos libres. Al igual que en los casos anteriores, los espectros de masas de los compuestos I y III silanizados fueron semejantes, mientras que el espectro de masas del compuesto II presentó diferencias. Los espectros de masas no mostraron los iones moleculares de los compuestos, aunque pudieron ser deducidos a partir del ión (M^+-15) [M-CH_3] con fragmentos de *m/z* 455, *m/z* 481 y *m/z* 483 para los picos I, II y III o bien a partir del ión (M^+-117) [M-COOTMSi], de *m/z* 353, *m/z* 379 y *m/z* 381 para los picos I, II y III respectivamente. El ión de *m/z* 273, presente en los espectros de los tres compuestos, proviene del grupo itacónico silanizado tras la ruptura del enlace entre el C_3 del grupo itacónico y la cadena alquílica.

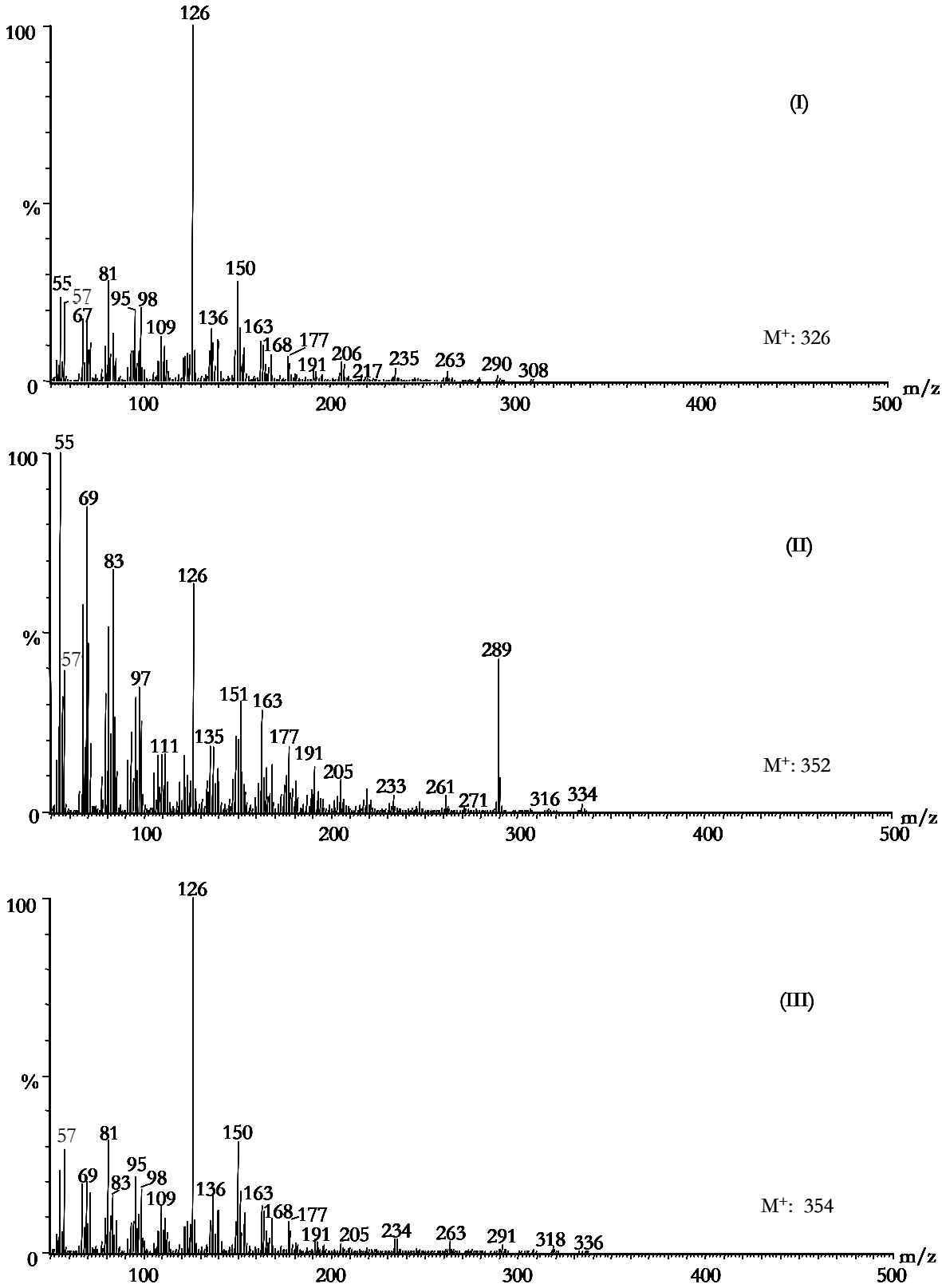

Figura 3. Espectros de masas sin derivatizar de los ácidos alquilitacónicos: I) ácido tetradecilitacónico, II) ácido 7-hexadecenilitacónico y III) ácido hexadecilitacónico.

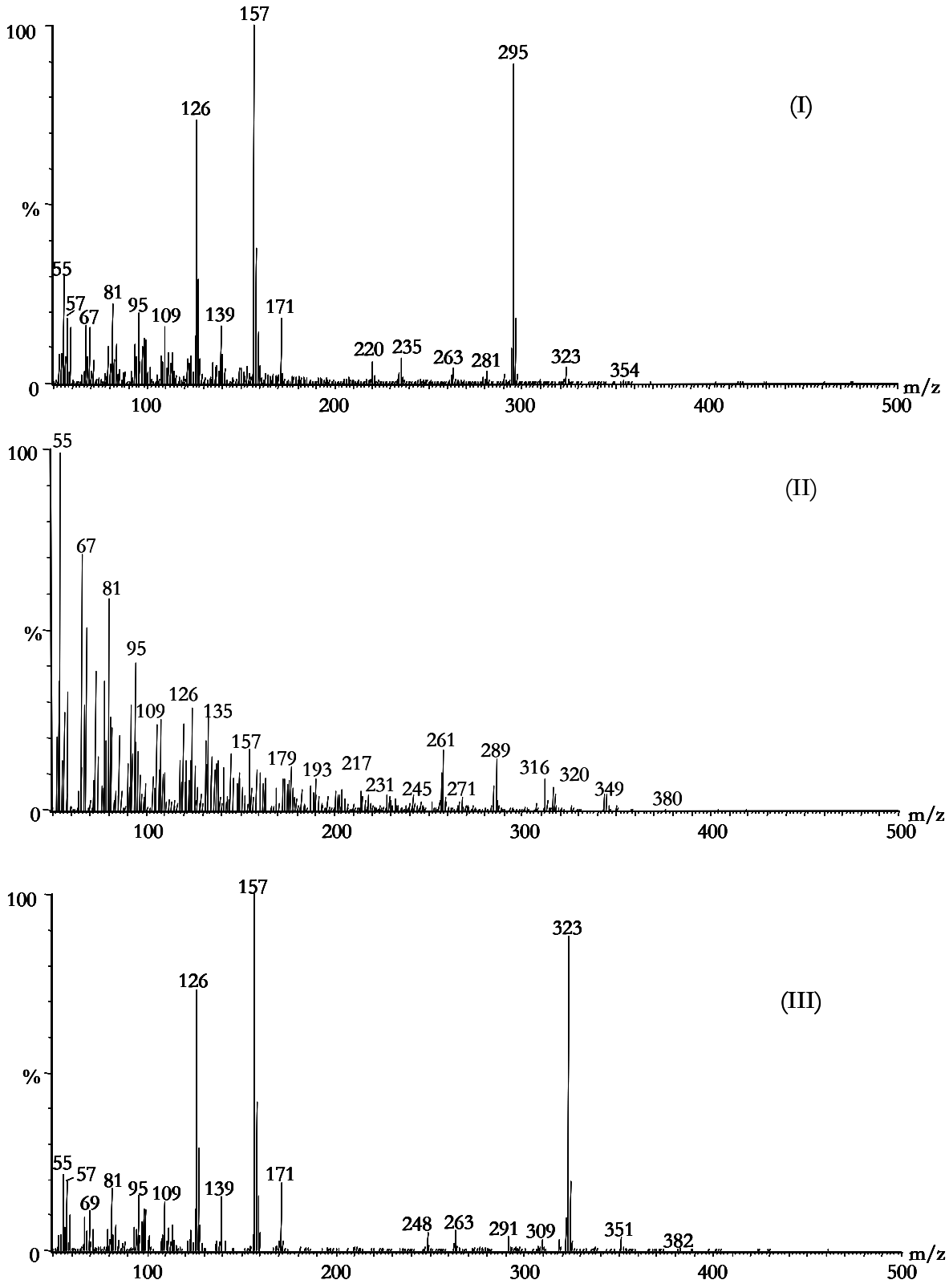

Figura 4. Espectros de masas de los ácidos alquilitacónicos metilados: I) éster metílico del ácido tetradecilitacónico, II) éster metílico del ácido 7-hexadecenilitacónico y III) éster metílico del ácido hexadecilitacónico.

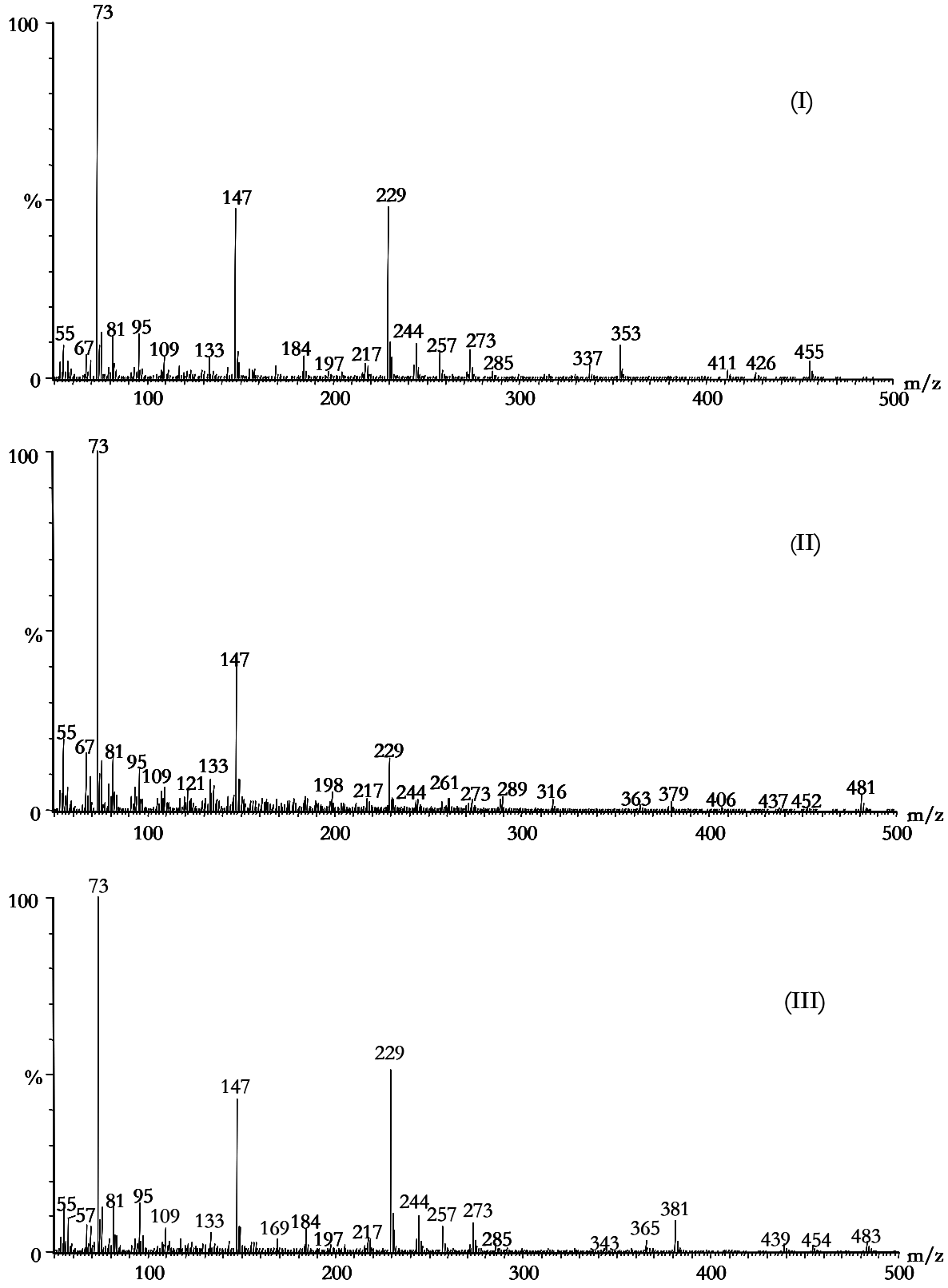

Figura 5. Espectros de masas de los ácidos alquilitacónicos silanizados: I) trimetilsilil-éster del ácido tetradecilitacónico, II) trimetilsilil-éster del ácido 7- hexadecenilitacónico y III) trimetilsilil-éster del ácido hexadecilitacónico.

2.2.1 Determinación de la posición del doble enlace en el ácido 7-hexadecenilitacónico

La posición del doble enlace en los ácidos grasos insaturados no se puede determinar por GC/MS debido a que los distintos isómeros posicionales dan lugar a espectros de masas muy parecidos, a menos que el doble enlace esté próximo al grupo carboxilo.

Para localizar el doble enlace en la cadena alquílica del ácido hexadecenilitacónico se utilizó el método de McCloskey y McClelland (1965). Este método consiste en la hidroxilación del doble enlace por tratamiento con OsO_4, seguida de una reducción con Na_2SO_3. El diol obtenido se silanizó y se analizó por GC/MS. En la Figura 6 se muestra la reacción de hidroxilación para la determinación del doble enlace. La muestra fue previamente metilada para evitar la silanización de los grupos carboxilos.

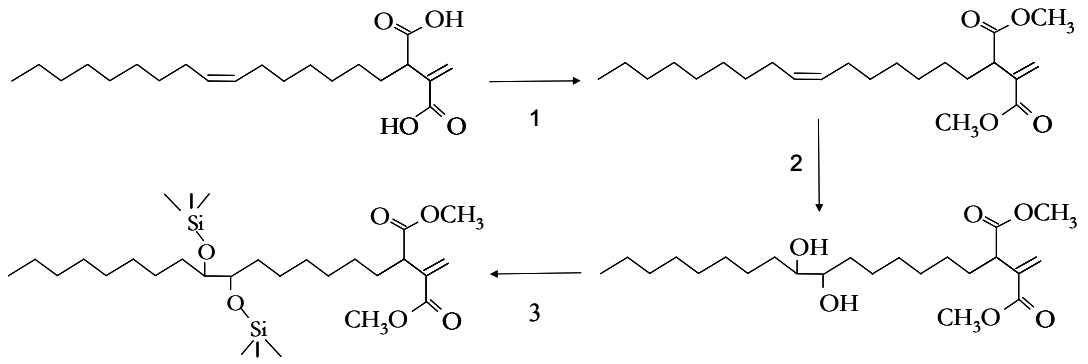

Figura 6. Reacciones para la determinación de la posición del doble enlace en el ácido 7-hexadecenilitacónico: 1) metilación de los grupos carboxilo, 2) oxidación con OsO_4 y reducción con Na_2SO_3 y 3) silanización con BSTFA.

La posición del doble enlace se dedujo a partir de los fragmentos de *m/z* 215 y *m/z* 343 (Fig. 7b), que se corresponden con los fragmentos de la cadena alquílica, tras la ruptura del enlace entre los dos grupos trimetilsililoxi. Esta fragmentación indica que el doble enlace se encuentra en el C_7 de la cadena alquílica (en el C_{10} según la nomenclatura de la Figura 26). La misma reacción se llevó a cabo con ácido oleico obteniéndose, como se muestra en la Figura 7a, los fragmentos de *m/z* 215 y de *m/z* 259,

equivalentes a los obtenidos tras la escisión del doble enlace del ácido 7-hexadecenilitacónico. Por tanto, la posición del doble enlace es la misma para el ácido 7-hexadecenilitacónico y para el ácido oleico, que como se discute en el apartado 3.6, sería uno de sus precursores.

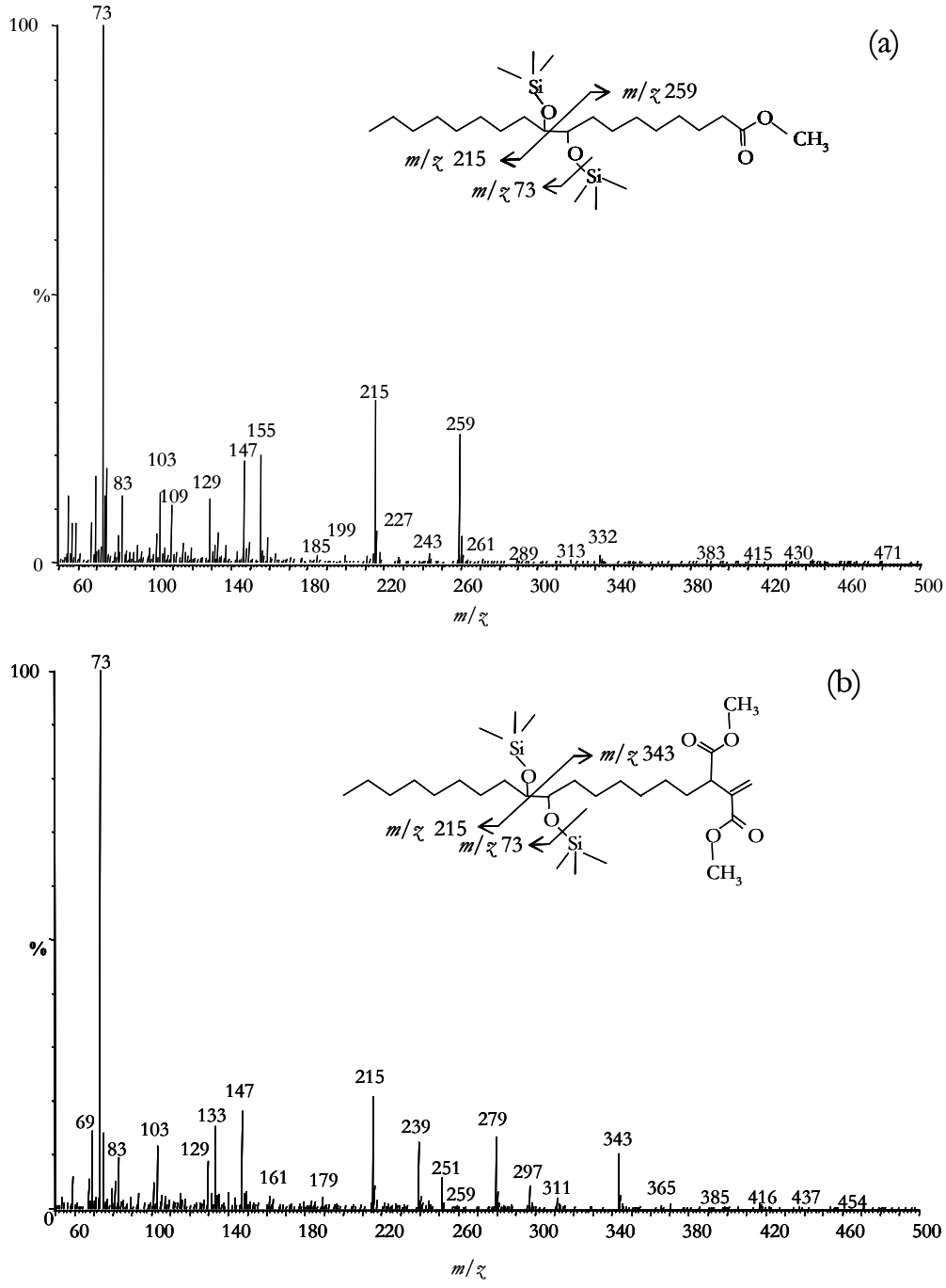

Figura 7. Espectros de masas obtenidos tras oxidación (y silanización) de los ésteres metílicos del ácido oleico (a) y del ácido 7-hexadecenilitacónico (b) (ver Fig. 6).

2.2.2. Serie de ácidos alquilitacónicos en cultivos de *C. subvermispora*

Tras el estudio de los espectros de masas derivatizados y sin derivatizar podemos afirmar que los compuestos I y III presentan la misma estructura pero difieren en que el compuesto III posee dos metilenos más en la cadena alquílica. El compuesto II posee una longitud de cadena igual al compuesto III, pero presenta un doble enlace en el C_7 de la cadena alquílica. Los compuestos I, II y III fueron por tanto identificados como ácido tetradecil-, 7-hexadecenil- y hexadecilitacónico, respectivamente.

Además de los tres compuestos descritos anteriormente, en la madera de *E. globulus* tratada con *C. subvermispora* en condiciones de SSF se identificó toda una serie de otros ácidos alquilitacónicos. Estos ácidos alquilitacónicos minoritarios aparecen en concentraciones bastante más bajas que los anteriormente descritos y difieren en la longitud de la cadena alquílica. En la Figura 8 se muestra la serie completa de ácidos alquilitacónicos.

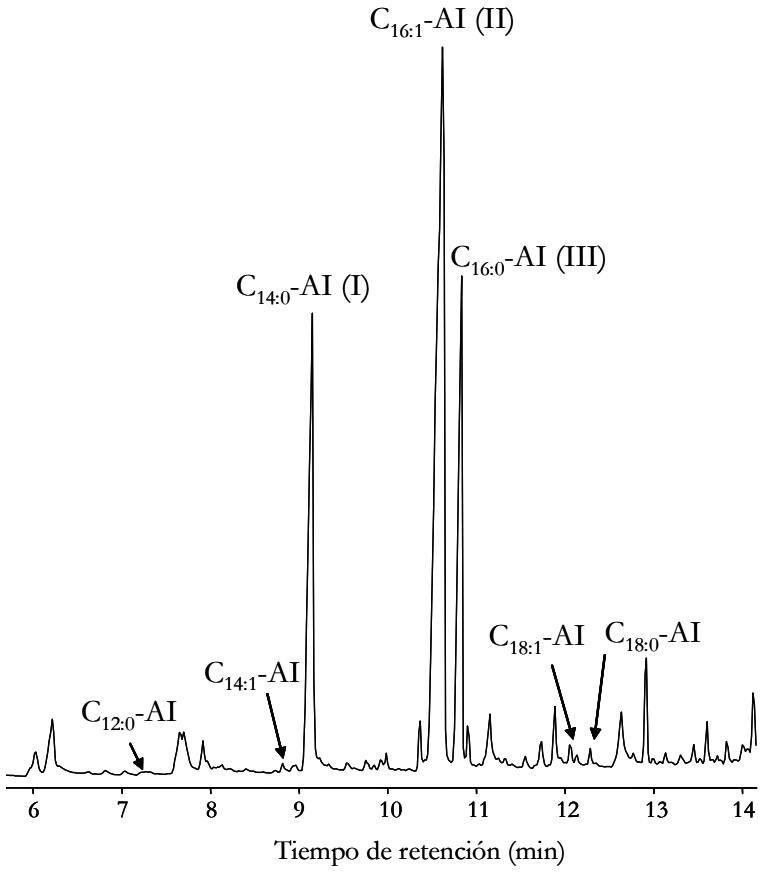

Figura 8. Cromatograma en el que se muestra la serie de ácidos alquilitacónicos, con diferentes cadenas alquílicas (de C_{12} a C_{18}) saturadas o monoinsaturadas, identificados durante el análisis por GC/MS de la fracción lipídica de la madera de *E. globulus* tratada con *C. subvermispora,* en condiciones de SSF.

Los compuestos minoritarios se identificaron, atendiendo a sus espectros de masas, como ácidos dodecilitacónico ($C_{12:0}$-AI), tetradecenilitacónico ($C_{14:1}$-AI), octadecilitacónico ($C_{18:0}$-AI) y octadecenilitacónico ($C_{18:1}$-AI).

2.2.3 Identificación de ácido norcaperático y ácido agarícico en cultivos de *P. placenta*

Los análisis mediante GC/MS (Fig. 9) de los extractos lipídicos de la madera de *E. globulus* tratada en condiciones de SSF con *P. placenta*, revelaron la existencia de compuestos relacionados estructuralmente con los ácidos alquilitacónicos. Al igual que para los ácidos alquilitacónicos, las muestras se analizaron sin derivatizar, metiladas y silanizadas, demostrándose que se trataba de ácidos tricarboxílicos constituidos por una cadena alifática unida al C_4 del ácido cítrico (ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico).

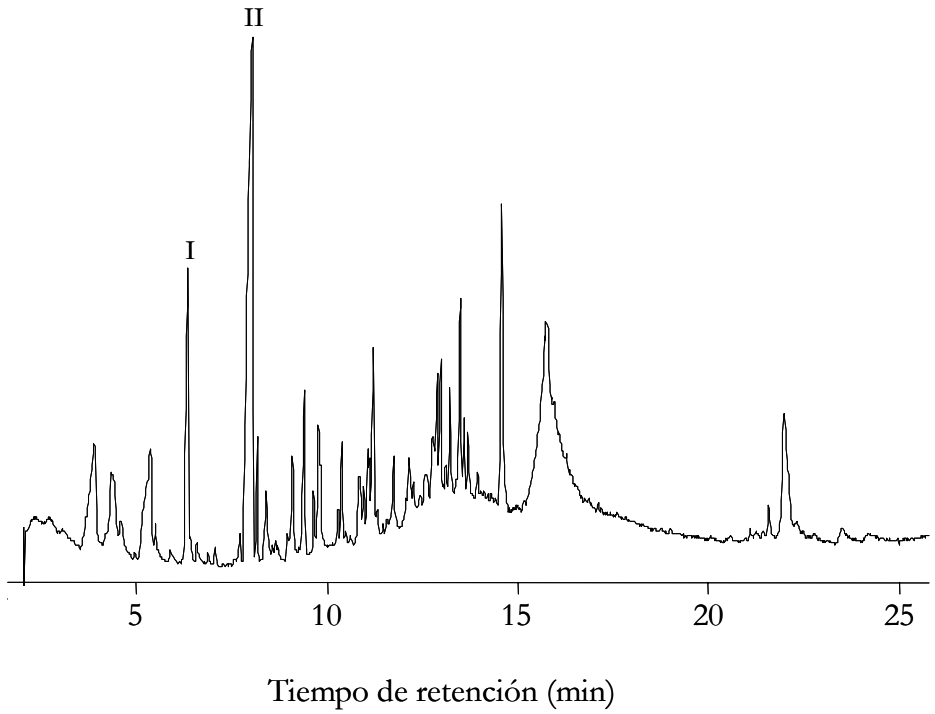

Figura 9. Cromatograma de la fracción lipídica de la madera de *E. globulus* tratada con *P. placenta* en condiciones de SSF, donde se muestran los ácidos alquilcítricos: I) ácido norcaperático y II) ácido agarícico.

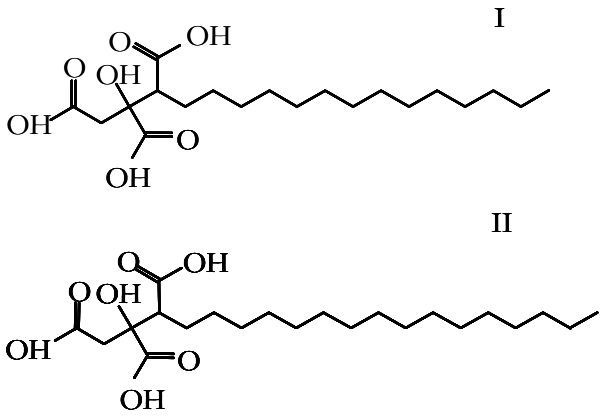

Figura 10. Estructura química de los ácidos alquilcítricos identificados en madera de *E. globulus* tratada con *P. placenta* en condiciones de SSF: I) ácido norcaperático y II) ácido agarícico.

Los dos picos encontrados fueron identificados como ácido tetradecilcítrico (ácido norcaperático) y hexadecilcítrico (ácido agarícico), cuyas estructuras químicas se muestran en la Figura 10.

Las Figuras 11 y 12 muestran los espectros de masas correspondientes al ácido norcaperático y ácido agarícico en las muestras sin derivatizar y derivatizadas. Los espectros de masas de estos compuestos sin derivatizar presentan un pico base de m/z 126 y un fragmento muy abundante de m/z 150. Los iones moleculares, de m/z 388 y m/z 416 para los ácidos norcaperático y agarícico, respectivamente, no aparecen en los espectros de masas. Los espectros de masas de los compuestos sin derivatizar fueron idénticos a los obtenidos para los ácidos tetradecilitacónico y hexadecilitacónico, respectivamente, observándose también los mismos tiempos de retención durante la cromatografía de gases (ver Figs. 1 y 9).

La metilación de estos compuestos introdujo tres grupos metilo lo que indicó, que a diferencia de los ácidos alquilitacónicos, se trataba de compuestos tricarboxílicos. Los iones moleculares de m/z 430 para el ácido norcaperático metilado y de m/z 458 para el ácido agarícico metilado, no están presentes en los espectros. La pérdida de un grupo carboxilo metilado [M-$COOCH_3$] (M^+-59) produjo los fragmentos de m/z 371 y m/z 399, para el ácido norcaperático y el ácido agarícico, respectivamente. A continuación, la pérdida de un grupo hidroxilo y un grupo metileno dio

lugar a los fragmentos de *m/z* 339 y de *m/z* 367 en los casos del ácido norcaperático y el ácido agarícico, respectivamente.

La silanización de las muestras metiladas dio lugar a la incorporación de un grupo trimetilsililo, lo que indicó la existencia de un hidroxilo libre en ambos compuestos. El ión molecular, de *m/z* 502 para el ácido norcaperático y *m/z* 530 para el ácido agarícico, no se observa en los espectros pero se deduce fácilmente a partir del ión (M^+-15) [M-CH_3], de *m/z* 487 para el ácido norcaperático y *m/z* 515 para el ácido agarícico. El fragmento de mayor intensidad correspondió al ión (M^+-91) [M-OCH_3-$COOCH_3$] de *m/z* 411 para el ácido norcaperático y *m/z* 439 para el ácido agarícico. La pérdida de un grupo metilo y un carboxilo metilado [M-CH_3-$COOCH_3$], tras la transposición de McLafferty, generaron el ión de *m/z* 74 y dio lugar a los fragmentos de *m/z* 427 y *m/z* 455 para el ácido norcaperático y el ácido agarícico respectivamente. En ambos espectros se observó el ión de *m/z* 73, correspondiente a un grupo TMSi (Christie, 1994).

El espectro de masas de los compuestos totalmente silanizados mostró la incorporación de cuatro grupos TMSi. Tres grupos TMSi correspondían a la derivatización de los tres grupos carboxílicos y el cuarto a la derivatización del grupo hidroxilo. Los iones moleculares, de *m/z* 676 y *m/z* 704 para los derivados silanizados del ácido norcaperático y del ácido agarícico, respectivamente, no se observaron en el espectro de masas, pero se dedujeron a partir del (M^+-15-117) [M-CH_3-COOTMSi], dando lugar a los iones de *m/z* 543 para el ácido norcaperático y *m/z* 571 para el ácido agarícico. En los espectros se pudo observar un fragmento abundante de *m/z* 469 para el ácido norcaperático y *m/z* 499 para el ácido agarícico, tras la pérdida de un grupo carboxilo y un grupo hidroxilo, ambos silanizados [M-COOTMSi-OTMSi]. A continuación, la pérdida de un grupo TMSi dio lugar a los iones de *m/z* 397 y *m/z* 425 para los ácidos norcaperático y agarícico, respectivamente. En los espectros de masas de los dos compuestos se observó el ión de *m/z* 73, correspondiente al grupo TMSi.

Tras el análisis de los espectros se pudo concluir que se trataba de ácidos tricarboxílicos constituidos por una cadena alquílica de 14 y 16 átomos de carbono, unida al C_4 del ácido cítrico, identificados como ácido tetradecilcítrico (ácido norcaperático) y ácido hexadecilcítrico (ácido agarícico).

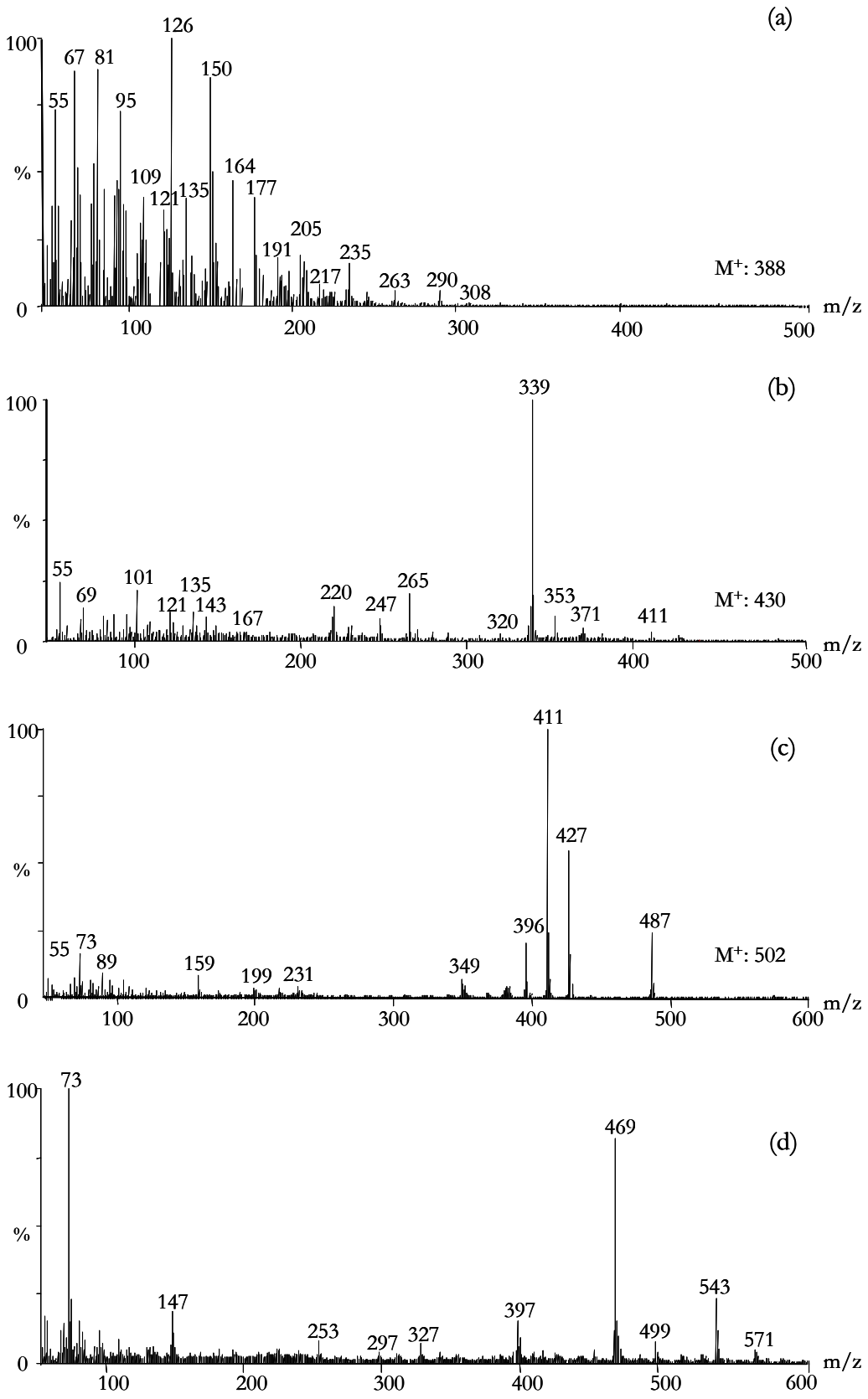

Figura 11. Espectros de masas del ácido norcaperático no derivatizado (a), metilado (b), metilado y silanizado (c) y silanizado (d).

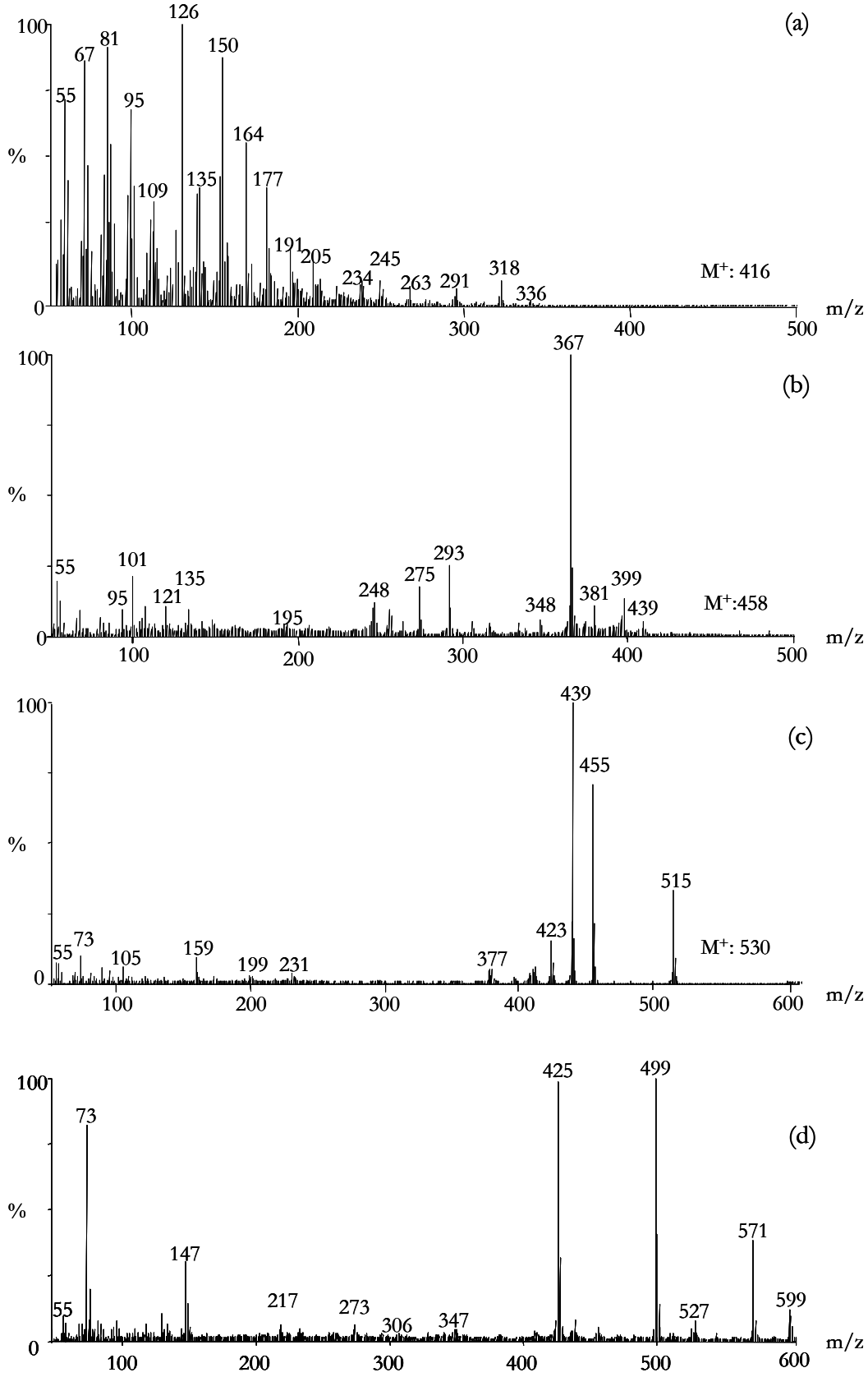

Figura 12. Espectros de masas del ácido agarícico no derivatizado (a), metilado (b), metilado y silanizado (c) y silanizado (d).

2.2.4 Identificación de anhídridos alquilitacónicos en cultivos de *L. sulphureus*

Durante el estudio mediante GC/MS de la fracción lipídica de la madera de *E. globulus* tratada con *L. sulphureus,* en condiciones de SSF, se identificaron los anhídridos de los ácidos alquilitacónicos (Fig. 13).

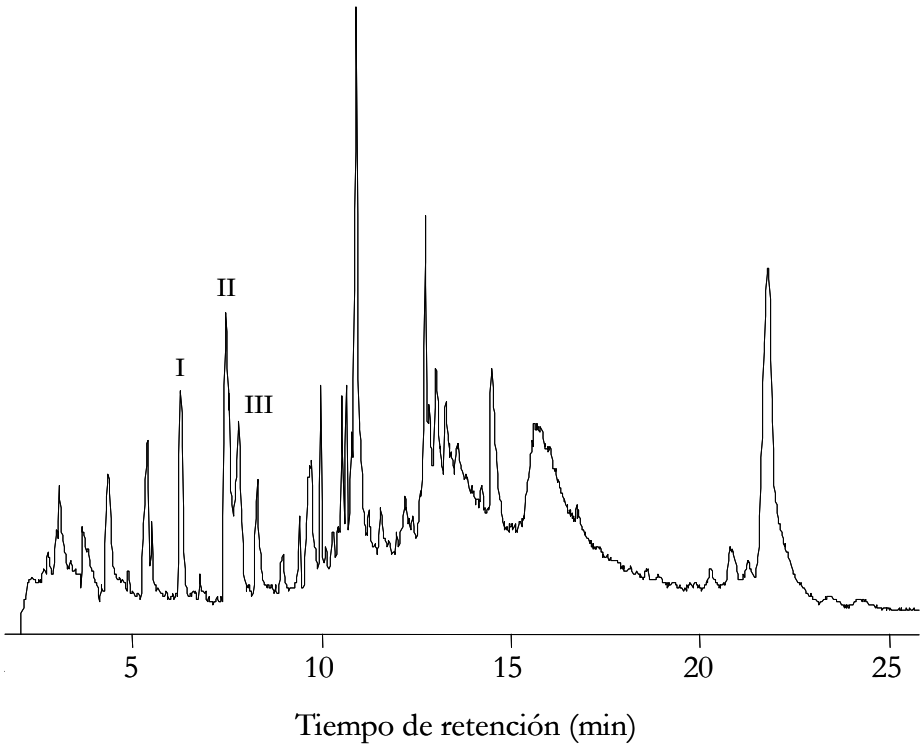

Figura 13. Cromatograma de la fracción lipídica de la madera de *E. globulus* tratada con *L. sulphureus* en condiciones de SSF, donde se observan los anhídridos alquilitacónicos: I) anhídrido tetradecilitacónico, II) anhídrido 7-hexadecenilitacónico y III) anhídrido hexadecilitacónico.

Estos compuestos fueron identificados como anhídridos tetradecilitacónico (I), 7-hexadecenilitacónico (II) y hexadecilitacónico (III). Es decir, se aislaron los mismos compuestos sintetizados por *C. subvermispora* pero en su forma anhídrida, cuya estructura química se muestra en la Figura 14.

Los espectros de masas de los tres compuestos sin derivatizar (Fig. 15), coincidían con los espectros de masas de los respectivos ácidos

alquilitacónicos sin derivatizar, y estos compuestos mostraron también el mismo tiempo de retención en GC (ver Figs. 1 y 13).

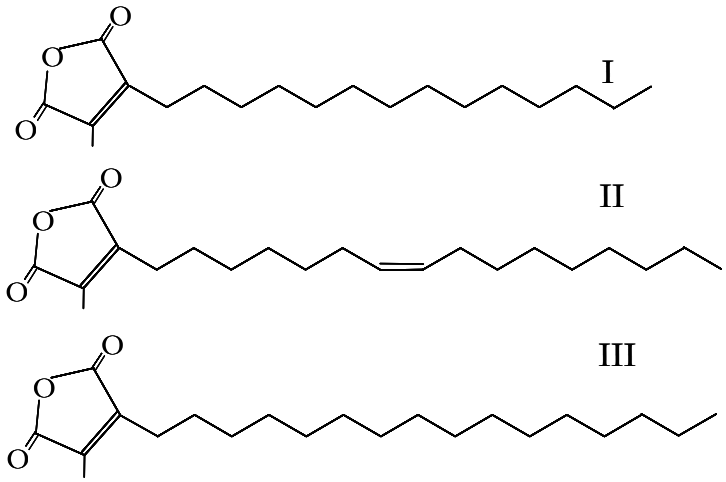

Figura 14. Estructura química de los anhídridos alquilitacónicos identificados en madera de *E. globulus* tratada con *L. sulphureus* en condiciones de SSF: I) anhídrido tetradecilitacónico, II) anhídrido 7-hexadecenilitacónico y III) anhídrido hexadecilitacónico.

Al igual que los ácidos alquilitacónicos, los anhídridos tetradecilitacónico y hexadecilitacónico presentaron un pico base de *m/z* 126 y un fragmento muy intenso de *m/z* 150. Los iones moleculares de los anhídridos itacónicos de *m/z* 308, 334 y 336 respectivamente, aparecen en los espectros. También aparecen los fragmentos (M^+-18), de *m/z* 290 para el anhídrido tetradecilitacónico, *m/z* 316 para el anhídrido 7-hexadecenilitacónico y *m/z* 318 para el anhídrido hexadecilitacónico.

La metilación de la fracción lipídica de la madera tratada con *L. sulphureus* indicó que la mayor parte de los compuestos referidos no se metilaban y permanecían inalterables, lo que está de acuerdo con su naturaleza de anhídridos. Sin embargo, el análisis por GC/MS reveló que una mínima parte de estos compuestos se metilaba, obteniéndose compuestos con espectros de masas idénticos a los ácidos alquilitacónicos metilados. Al someter las muestras a una metilación exhaustiva, multiplicando por 10 el tiempo de reacción con trimetilsilildiazometano, se observó que se mantenía la fracción metilada, y que simultáneamente, la fracción no metilada disminuía incrementándose la proporción de los isómeros citracónicos metilados (Fig. 16).

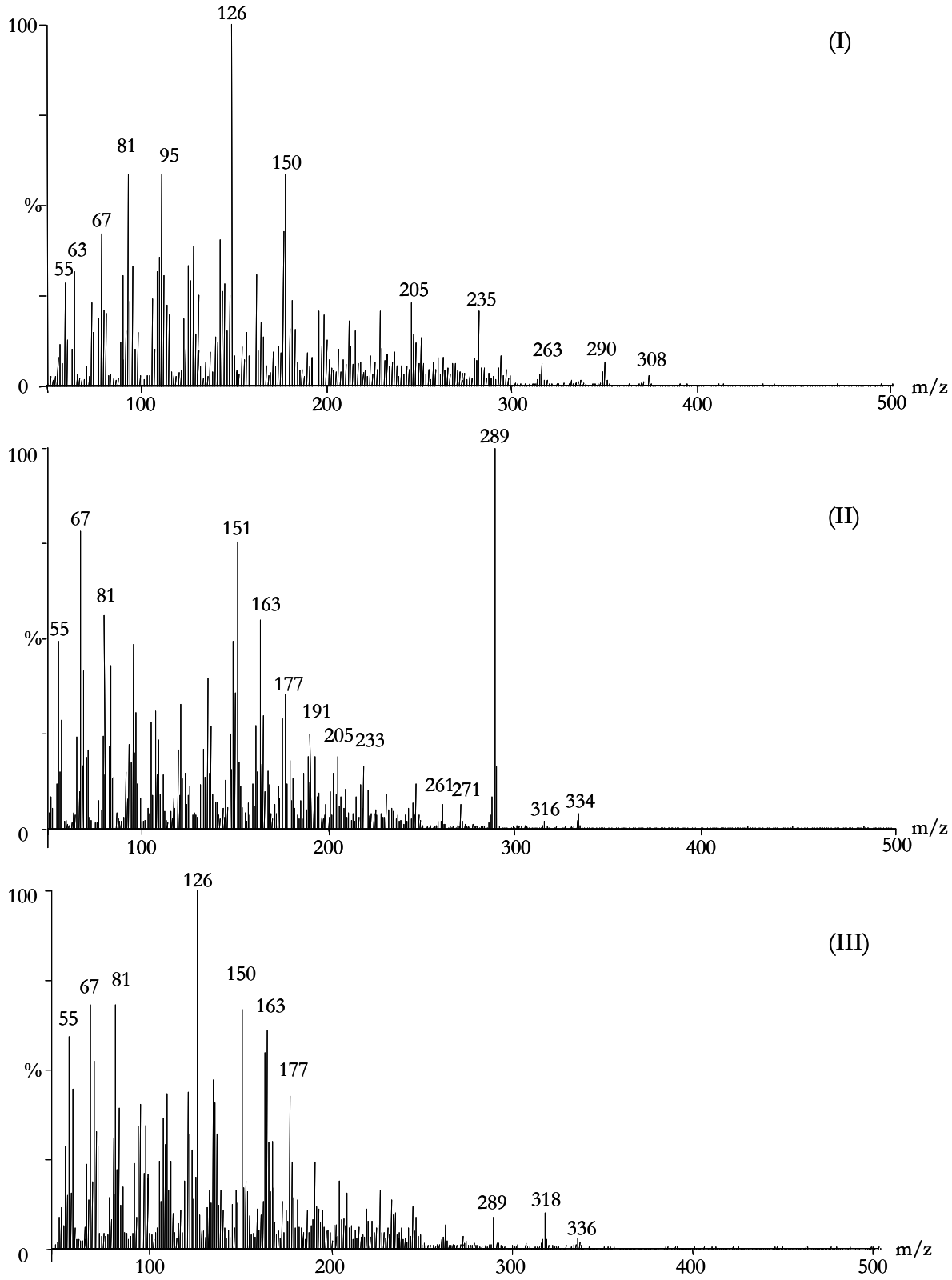

Figura 15. Espectros de masas sin derivatizar de los anhídridos alquilitacónicos: I) anhídrido tetradecilitacónico, II) anhídrido 7-hexadecenilitacónico y III) anhídrido hexadecilitacónico.

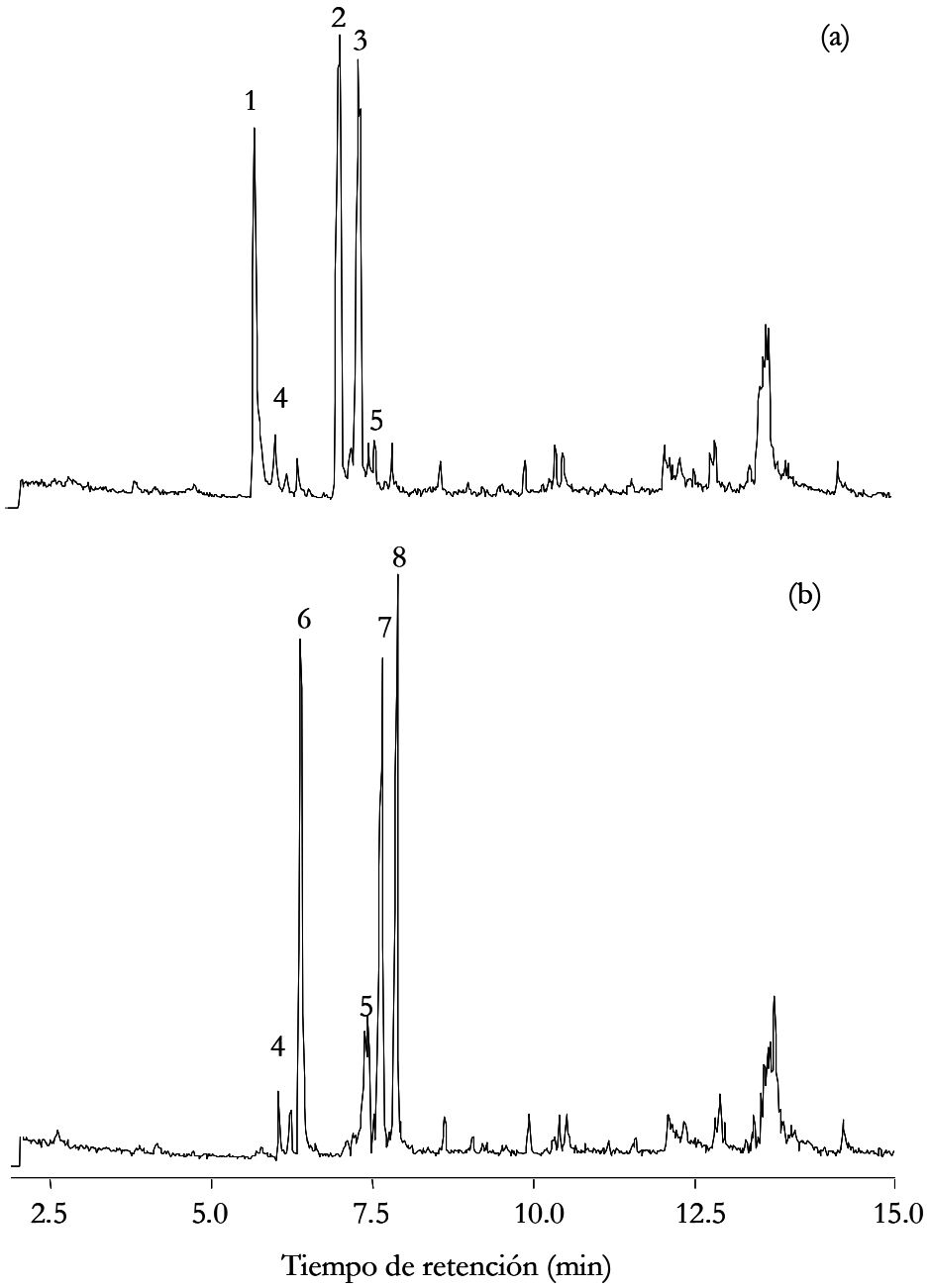

Figura 16. Cromatogramas reconstituidos (mediante la suma de los iones *m/z* 126, *m/z* 150, *m/z* 289, *m/z* 140 y *m/z* 157) de la fracción lipídica de la madera de *E. globulus* tratada con *L. sulphureus* en condiciones de SSF. Se observa el efecto de una metilación exhaustiva sobre los anhídridos de los ácidos alquilitacónicos: a) 1 min de tratamiento con el agente metilante y b) 10 min de tratamiento con el agente metilante. Identificación de los picos: 1) anhídrido tetradecilitacónico, 2) anhídrido 7-hexadecenilitacónico, 3) anhídrido hexadecilitacónico, 4) ácido tetradecilitacónico metilado, 5) ácido hexadecilitacónico metilado, 6) ácido tetradecilcitráconico metilado, 7) ácido 7-hexadecenilcitracónico metilado y 8) ácido hexadecilcitracónico metilado.

Por otro lado, al silanizar la muestra se observó una parte mayoritaria de compuestos que no se silanizaban, mientras que una parte minoritaria se silanizaba (Fig. 17), presentando espectros de masas de ácidos alquilitacónicos silanizados.

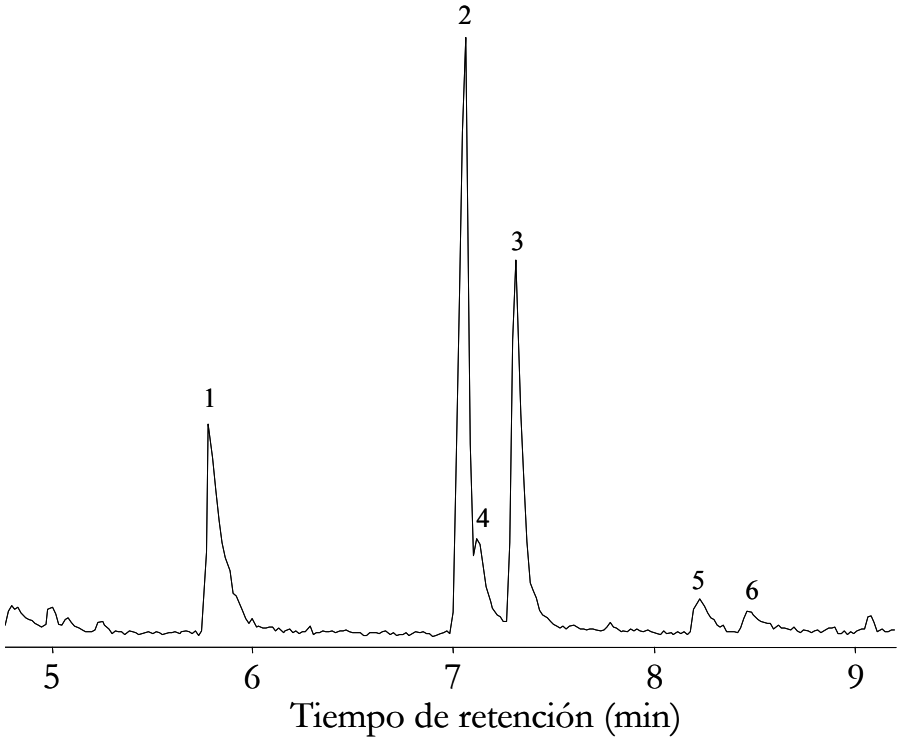

Figura 17. Cromatograma reconstituido (mediante la suma de los iones *m/z* 126, *m/z* 150, *m/z* 289, *m/z* 147 y *m/z* 229) de la fracción lipídica de la madera de *E. globulus* tratada con *L sulphureus* en condiciones de SSF, silanizada: 1) anhídrido tetradecilitacónico, 2) anhídrido 7-hexadecenilitacónico, 3) anhídrido hexadecilitacónico, 4) ácido tetradecilitacónico silanizado, 5) 7-ácido hexadecenilitacónico silanizado y 6) ácido hexadecilitacónico silanizado.

Para confirmar la identificación de estos compuestos, tras los indicios de que se trataba de los derivados anhídridos de los ácidos alquilitacónicos, se cultivó y estudiaron los metabolitos producidos por el hongo deuteromiceto *C. acutiseta*. Se trata de un hongo imperfecto que produce los ácidos alquilcitracónicos (ácidos quetomélicos), tanto en su forma diácida, como anhídrida (Lingham *et al.*, 1993; Singh *et al.*, 2000). Este hongo produce mayoritariamente los ácidos tetradecilcitracónico y 7-hexadecenilcitracónico y, en concentraciones más bajas, el ácido hexadecilcitracónico.

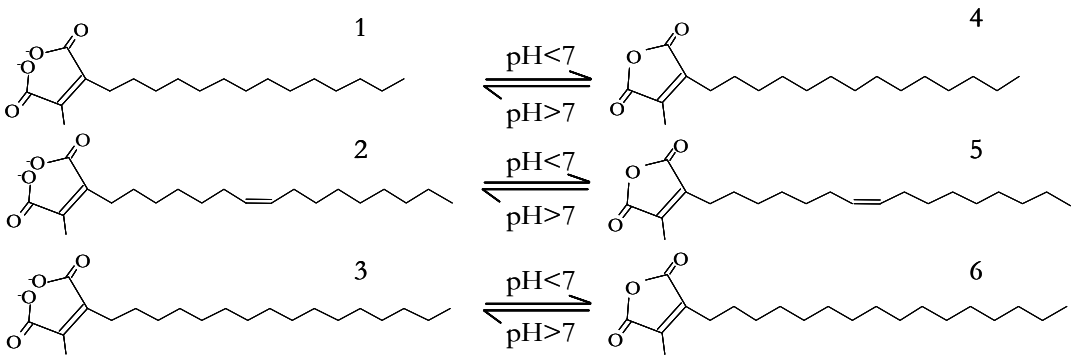

Figura 18. Estructura de los ácidos alquilcitracónicos sintetizados en condiciones de SSF por *C. acutiseta*: 1) ácido tetradecilcitracónico, 2) ácido 7-hexadecenilcitracónico, 3) ácido hexadecilcitracónico, 4) anhídrido tetradecilcitracónico, 5) anhídrido 7-hexadecenilcitracónico y 6) anhídrido hexadecilcitracónico.

Existe un equilibrio entre las formas diácida y anhídrida dependiente del pH (Fig. 18). En medios con pH básico, el compuesto se encuentra en su forma aniónica y diácida, mientras que con pH ácido el compuesto aparece protonado y los dos grupos carboxilos pueden reaccionar perdiendo una molécula de H_2O dando lugar al anhídrido (Singh *et al.*, 1993).

Las muestras de *C. acutiseta* se analizaron tanto sin derivatizar, como metiladas y silanizadas. En el caso de las muestras sin derivatizar, se observaron una serie de compuestos con los mismos espectros de masas que los ácidos y anhídridos alquilitacónicos, así como el mismo tiempo de retención en los análisis por GC.

Cuando estos compuestos se metilaron (Fig. 19), se obtuvieron dos series de compuestos diferentes, una correspondiente a los anhídridos alquilitacónicos sin derivatizar y la otra a los ácidos alquilcitracónicos metilados. Variando los tiempos de reacción de la muestra con el agente metilante, se observó que, conforme la metilación se hacía más exhaustiva, se producía un descenso en la proporción de los anhídridos alquilitacónicos y un aumento de los ácidos alquilcitracónicos metilados.

Por otro lado, la silanización de las muestras no incorporó ningún grupo TMSi, lo que indicó que estos compuestos no poseen ningún grupo carboxilo libre. Por lo tanto fue posible concluir que, en las condiciones en que se cultivó, *C. acutiseta* sintetizaba estos compuestos en su forma anhídrida.

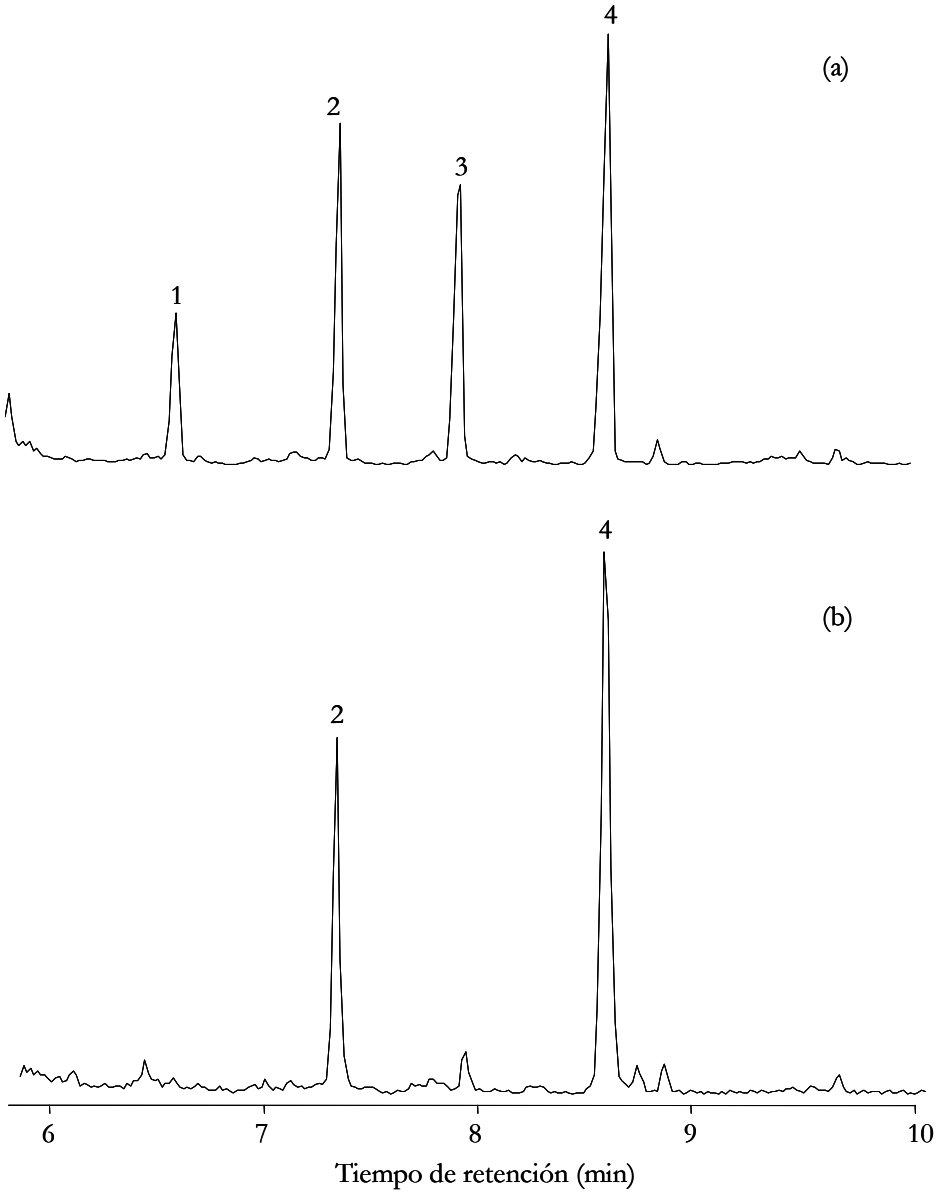

Figura 19. Cromatogramas reconstituidos (mediante la suma de los iones *m/z* 126, *m/z* 150, *m/z* 289, *m/z* 140 y *m/z* 157) del extracto lipídico del cultivo de *C. acutiseta* en medio de arroz, en condiciones de SSF, en los que se observa el efecto de una metilación exhaustiva sobre los anhídridos de los ácidos alquilcitracónicos: a) 1 min de tratamiento con el agente metilante y b) 10 min de tratamiento con el agente metilante. Identificación de los picos: 1) anhídrido tetradecilicitracónico, 2) ácido tetradecilcitracónico metilado, 3) anhídrido 7-hexadecenilcitracónico, y 4) ácido 7-hexadecenilcitracónico metilado.

2.3. Purificación de los ácidos alquil-di/tri-carboxílicos

Con objeto de confirmar la estructura química, se purificaron los ácidos alquilitacónicos de *C. subvermispora* y el ácido agarícico de *P. placenta.*

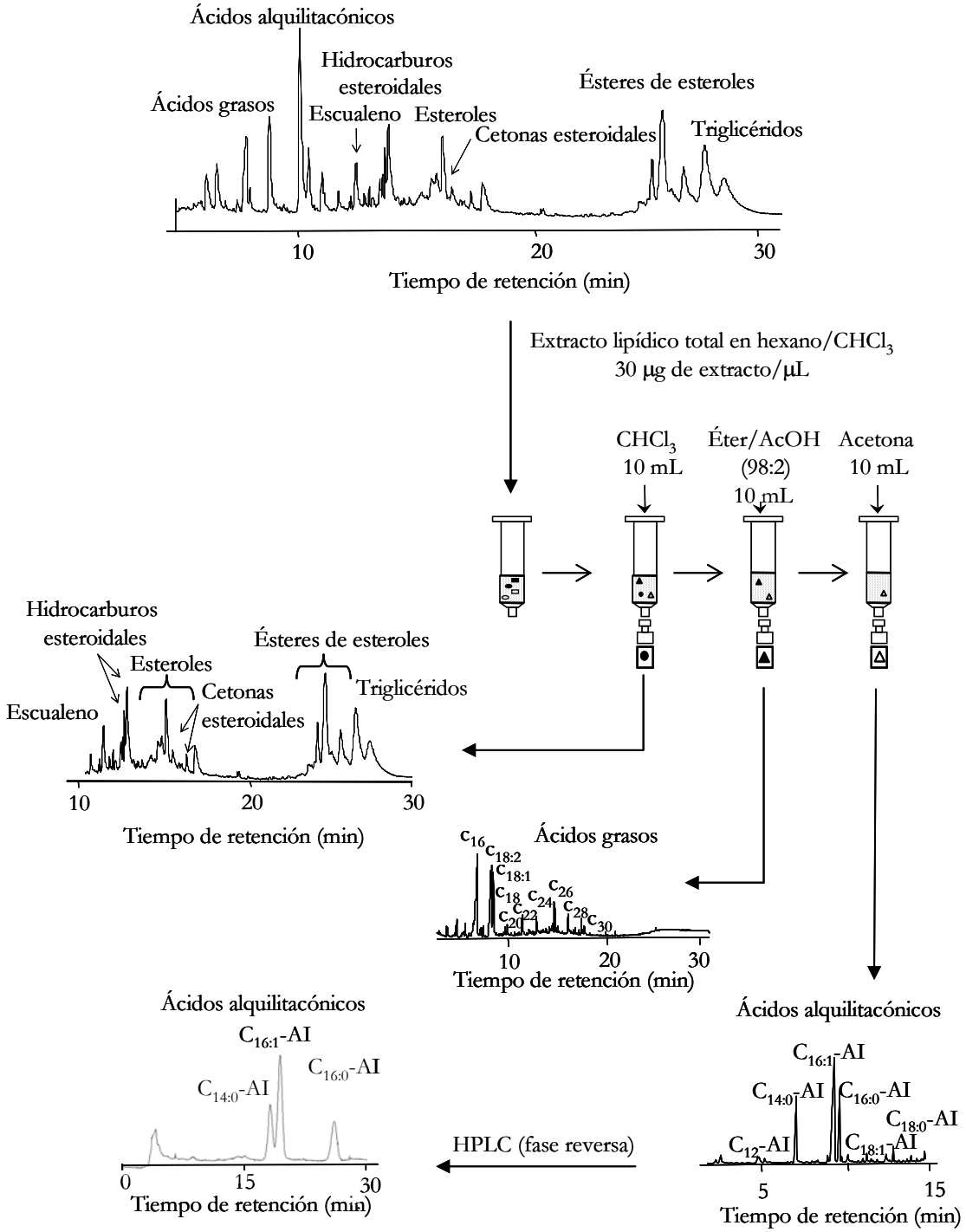

Figura 20. Esquema de purificación de los ácidos alquilitacónicos, adaptado de Gutiérrez *et al.* (2004).

La purificación de los ácidos alquilitacónicos se realizó mediante una combinación de dos técnicas cromatográficas, extracción en fase sólida (SPE) y cromatografía líquida (HPLC), como se muestra en la Figura 20.

Tras la obtención de la fracción lipofílica (soluble en cloroformo) del extracto en acetona de la madera tratada con *C. subvermispora*, dicha fracción se resuspendió en hexano/cloroformo y se fraccionó mediante SPE utilizando cartuchos de aminopropilo como fase estacionaria (Gutiérrez *et al.*, 1998; 2004). Las diferentes fracciones se eluyeron con solventes de polaridad creciente y los ácidos alquilitacónicos con acetona en la última fracción. Obtenida la mezcla de dichos ácidos se procedió a su separación individual mediante HPLC (Fig. 21) como se describe en el apartado 6.2.1 de Material y Métodos.

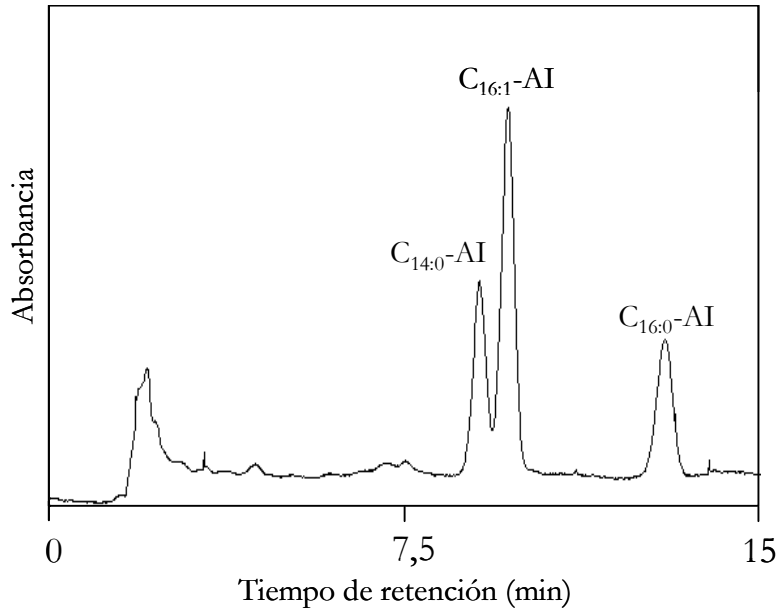

Figura 21. Perfil cromatográfico obtenido durante la purificación de los ácidos alquilitacónicos mayoritarios mediante HPLC. Absorbancia a 205 nm.

Los tiempos de retención de los tres ácidos alquilitacónicos mayoritarios fueron los siguientes: 8,9 min ($C_{14:0}$-AI), 9,6 min ($C_{16:1}$-AI) y 12,8 min ($C_{16:0}$-AI) en condiciones analíticas; y 12,9 min ($C_{14:0}$-AI), 13,8 min ($C_{16:1}$-AI), 18,9 min ($C_{16:0}$-AI) en condiciones preparativas.

La purificación del ácido agarícico producido por *P. placenta* se realizó directamente por HPLC ya que al ser un ácido tricarboxílico presentaba

gran afinidad por la fase estacionaria de los cartuchos de SPE y no se eluía con ninguno de los disolventes orgánicos utilizados.

Para su separación se utilizó una columna C_8 de fase reversa, y un gradiente de metanol como fase móvil. El ácido agarícico eluyó al alcanzar el 95% de metanol, con un tiempo de retención de 21,7 min (Fig. 22).

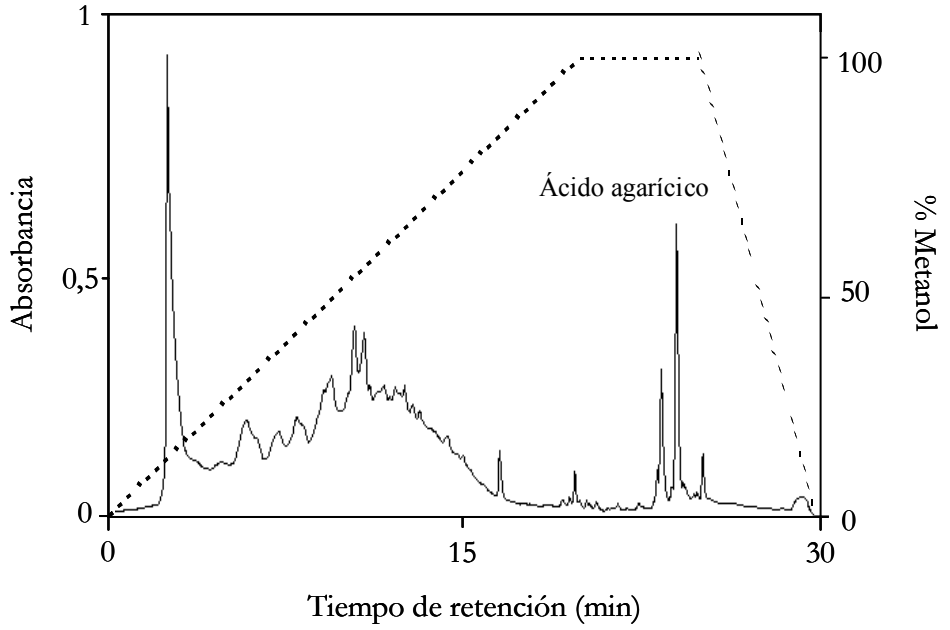

Figura 22. Perfil cromatográfico obtenido durante la purificación del ácido agarícico mediante HPLC. Absorbancia a 205 nm (—) y gradiente de metanol (....).

2.4. Identificación de los ácidos alquil-di/tri-carboxílicos por resonancia magnética nuclear (NMR)

Una vez purificados los ácidos alquilitacónicos producidos por *C. subvermispora* y el ácido agarícico producido por *P. placenta*, se analizaron por NMR bidimensional (2D-NMR) de ^{1}H y ^{13}C para confirmar las estructuras previamente determinadas por GC/MS. Las asignaciones de las señales se realizaron empleando experimentos HSQC y HBMC (Aue *et al.*, 1976)..

2.4.1. NMR de los ácidos alquilitacónicos

Las estructuras de los ácidos tetradecilitacónico y 7-hexadecenilitacónico se confirmaron mediante 2D-NMR, tal como se describe a continuación.

2.4.1.1. NMR del ácido tetradecilitacónico

La estructura química y la nomenclatura seguida en los experimentos de NMR del ácido tetradecilitacónico se muestran en la Figura 23.

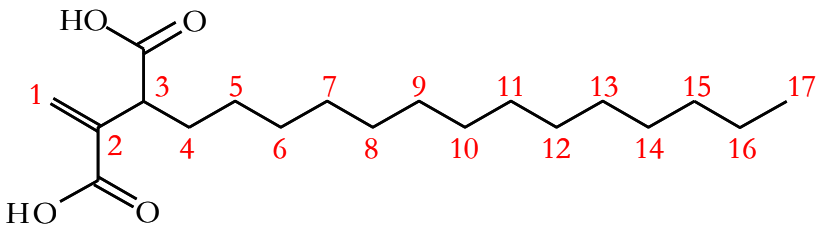

Figura 23. Estructura química y nomenclatura seguida para los análisis de NMR del ácido tetradecilitacónico.

En la Tabla 1 se muestran las las asignaciones de ^{1}H y ^{13}C NMR del ácido tetradecilitacónico.

Tabla 1. Asignaciones de NMR de ^{1}H y ^{13}C del ácido tetradecenilitacónico.

Posición	$\delta^{13}C$ (ppm)	$\delta^{1}H$ (ppm)
1	129,1	5,8 6,1
2	137,5	
3	47,4	3,4
4	29,7	1,7 1,9
5-16	27,3	1,3
17	14,0	0,9
$C_{(2)}$-**C**OOH	171,1	
$C_{(3)}$ -**C**OOH	178,7	

En el espectro HSQC (Figs. 24 y 25b) se observaron las señales cruzadas del C_1 con sus dos protones a δ_C/δ_H= 129,1/5,8 y 6,1 ppm, que dieron señales diferentes debido al entorno que rodea a cada uno de ellos. Lo mismo ocurre con los protones unidos al C_4 cuyas asignaciones fueron a δ_C/δ_H= 29,7/1,7 y 1,9 ppm.

La señal cruzada del C_3 y su proton fue asignada a δ_C/δ_H= 47,4/3,4 ppm, y los protones y carbonos (C_5-C_{16}) de los grupos metilenos de la cadena alquílica, al ser iguales y tener el mismo entorno, presentan la misma señal a δ_C/δ_H= 27,3/1,3 ppm. La integración de dicha señal se correspondió con 24 protones lo que equivale a 12 átomos de carbono, confirmándose de esta forma la longitud de la cadena alquílica, determinada previamente por GC/MS.

El grupo metilo (C_{17}) al tener 3 protones presentó diferencias en las asignaciones de los grupos metilenos de la cadena alquílica dando una señal a δ_C/δ_H= 47,4/3,4 ppm.

El carbono C_2 y los carbonos de los grupos carboxilos, al tratarse de carbonos cuaternarios, no pudieron asignarse mediante el experimento anterior y se asignaron en el experimento HMBC (Fig. 25). El C_2 se asignó a δ_C= 137,5 ppm. Se identificaron únicamente dos grupos carboxilos confirmando que se trataba de un compuesto dicarboxílico. El grupo carboxilo unido al C_2 se asignó a δ_C= 171,1 ppm y el grupo carboxilo unido al C_3 a δ_C= 178,7 ppm.

Los resultados obtenidos mediante el análisis de NMR coincidieron con los obtenidos por GC/MS. En ambos casos, se obtuvo la estructura de un ácido de 19 átomos de carbono incluyendo dos grupos carboxilo, constituido por una cadena alquílica saturada de 14 átomos de carbono, unida al C_3 del ácido itacónico, confirmando que se trataba del ácido 2-metilen-3-carboxiheptadecanoico (ácido tetradecilitacónico).

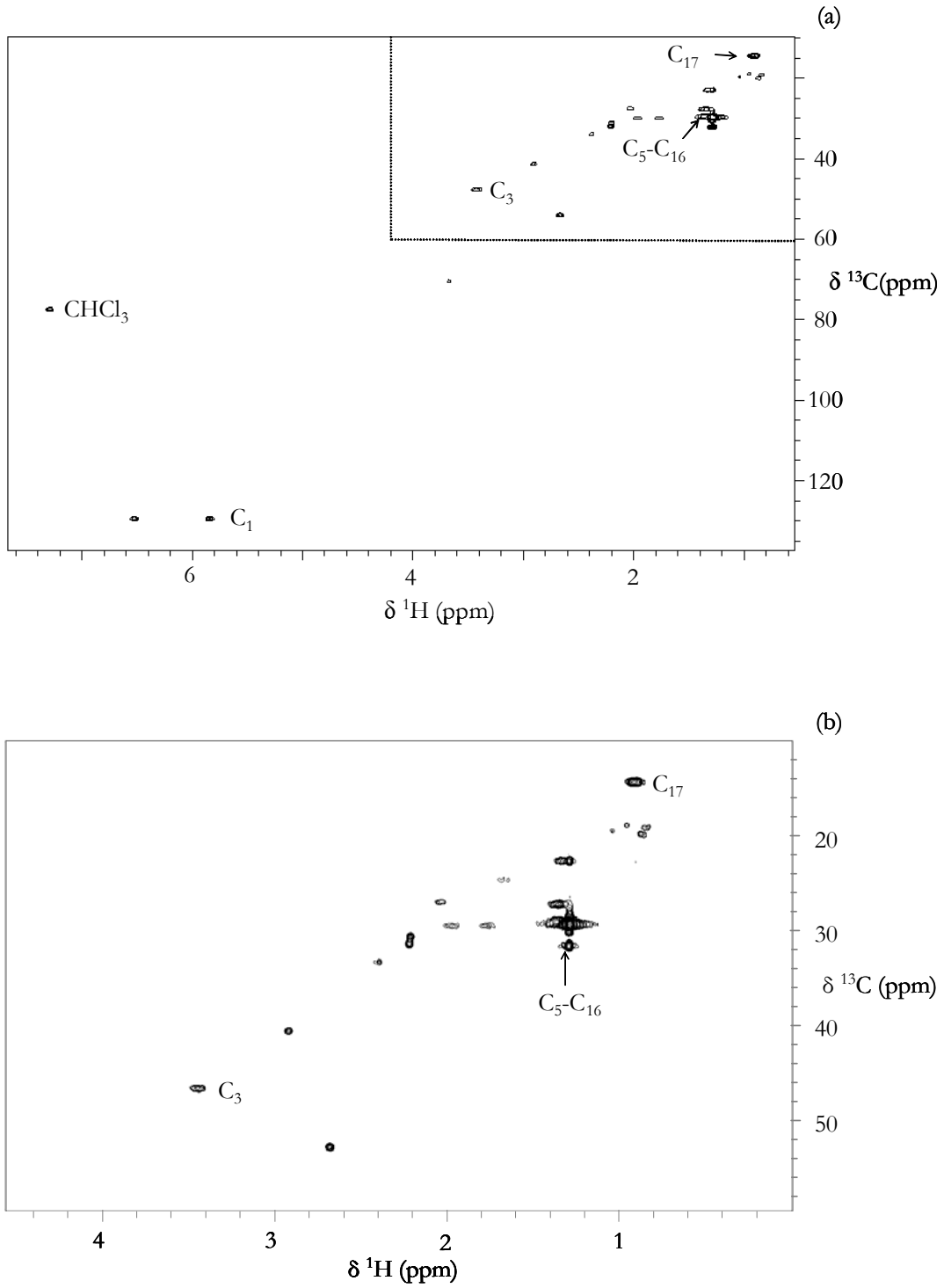

Figura 24. Espectro ^{1}H-^{13}C HSQC completo del ácido tetradecilitacónico (a) y región alifática ampliada (δ_C/δ_H= 10-60/0-4,6 ppm) (b).

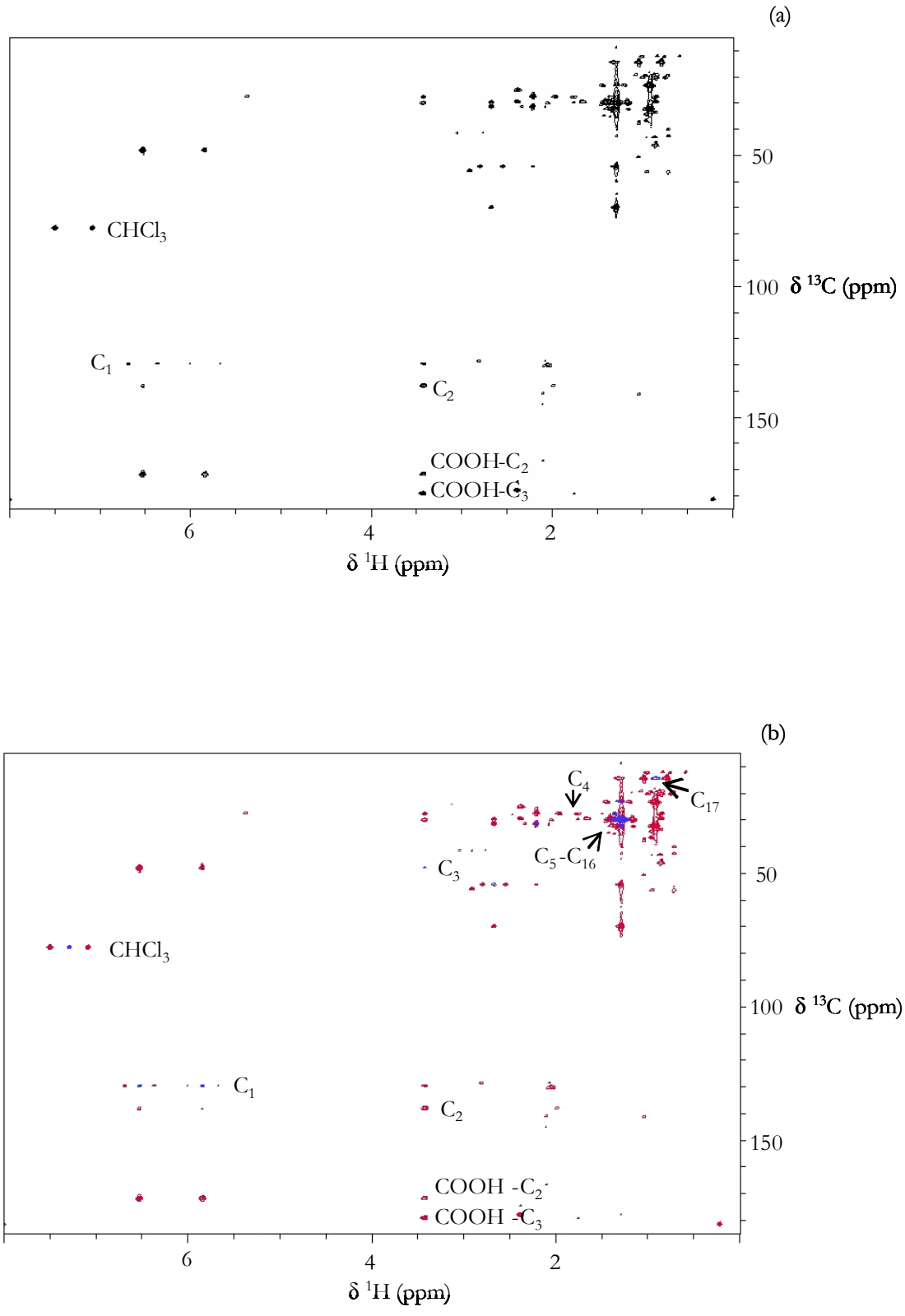

Figura 25. Espectros ^{1}H-^{13}C HMBC (a), y ^{1}H-^{13}C HMBC (rojo) y ^{1}H-^{13}C HSQC (azul) superpuestos (b) del ácido tetradecilitacónico.

2.4.1.2. NMR del ácido 7-hexadecenilitacónico

La estructura química y la nomeclatura utilizada en los experimentos de NMR del ácido 7-hexadecenilitacónico se muestran en la Figura 26 .

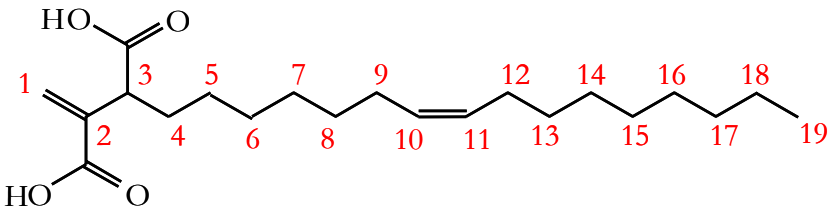

Figura 26. Estructura química y nomenclatura seguida para los análisis de NMR del ácido 7-hexadecenilitacónico.

En la Tabla 2 se muestran las asignaciones de ^{1}H y ^{13}C-NMR del ácido hexadecenilitacónico.

Tabla 2. Asignaciones de NMR de ^{1}H y ^{13}C del ácido 7-hexadecenilitacónico.

Posición	$\delta^{13}C$ (ppm)	$\delta^{1}H$ (ppm)
1	129,1	5,8 6,4
2	138,5	
3	48,2	3,4
4	27,4	1,7 1,9
5-8	27,6-32,3	1,2-1,8
9	27,4	2,0
10-11	129,4 130,4	5,3
12	27,4	2,0
13-18	27,6-32,3	1,2-1.,8
19	20,0	0,8
$C_{(2)}$-**C**OOH	171,7	
$C_{(3)}$ -**C**OOH	179,0	

En el espectro HSQC (Figs. 27 y 28b) se asignaron las señales cruzadas del C_1 y sus dos protones a δ_C/δ_H= 129,1/5,8 y 6,4 ppm, y del C_4 y sus dos protones a δ_C/δ_H= 27,4/1,7 y 1,9 ppm. Al igual que en el caso del ácido tetradecilitacónico los protones unidos a estos carbonos dieron señales diferentes. El C_3 dio señal cruzada con su protón a δ_C/δ_H= 48,2/3,4 ppm. En el espectro se observa la señal correspondiente a un doble enlace asignado a los carbonos C_{10}-C_{11}. Sus correlaciones fueron muy similares, a δ_C/δ_H= 129,4 y 130,4 / 5,3 ppm, obteniéndose una sola señal cuya integración se correspondió a dos protones, uno por cada uno de los dos carbonos implicados en el doble enlace. De esta forma se confirmó la existencia de un doble enlace en la cadena alquílica, entre los C_{10} y C_{11} (C_7 y C_8 según nomenclatura utilizada en el apartado 2), determinada previamente por GC/MS. Debido a que el entorno de los dos protones implicados en el doble enlace es similar, la configuración del doble enlace no pudo ser determinada con claridad por NMR.

Los grupos metilenos adyacentes al doble enlace (C_9 y C_{12}), por influencia del mismo, dieron señales diferentes a los metilenos de la cadena alquílica, y se asignaron ambos a δ_C /δ_H= 27,4/ 2,0 ppm. Los grupos metilenos de la cadena alquílica del C_5 al C_8 y del C_{13} al C_{18} se asignaron entre δ_C= 27,6 y 32,3 ppm y sus protones entre δ_H= 1,2 y 1,8 ppm. El grupo metilo (C_{19}) se asignó a δ_C/δ_H= 20,0/0,8 ppm.

Los carbonos C_2 y de los grupos carboxilos se asignaron en el espectro HMBC (Fig. 28). El C_2 se identificó a δ_C= 138,5 ppm. En el espectro se identificaron sólo dos grupos carboxilos, confirmando los resultados obtenidos por GC/MS. El grupo carboxilo unido al C_2 se asignó a δ_C= 171,7 ppm y el grupo carboxilo unido al C_3 a δ_C= 179,0 ppm.

Tras los estudios de NMR se concluye que se trata de un ácido dicarboxílico de 21 átomos de carbono constituido por una cadena alquílica de 16 átomos de carbono insaturada en el C_7, unida al C_3 del ácido itacónico, confirmándose que se trata del ácido 2-metilen-3-carboxi-10-nonadecenoico (ácido 7-hexadecenilitacónico).

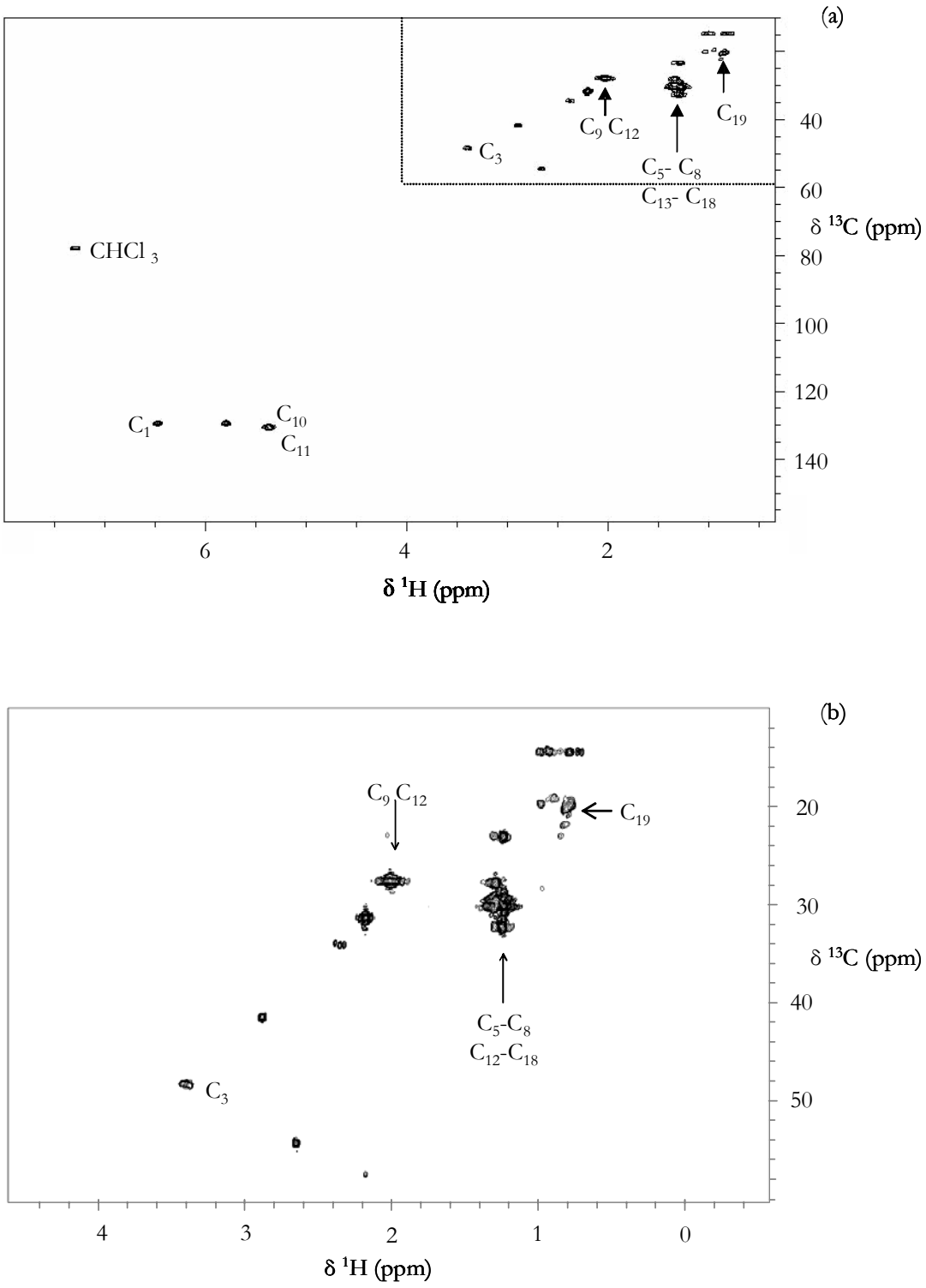

Figura 27. Espectro ^{1}H-^{13}C HSQC completo del ácido 7-hexadecenilitacónico (a) y región alifática ampliada (δ_C/δ_H= 10-60 / 0-4,6 ppm) (b).

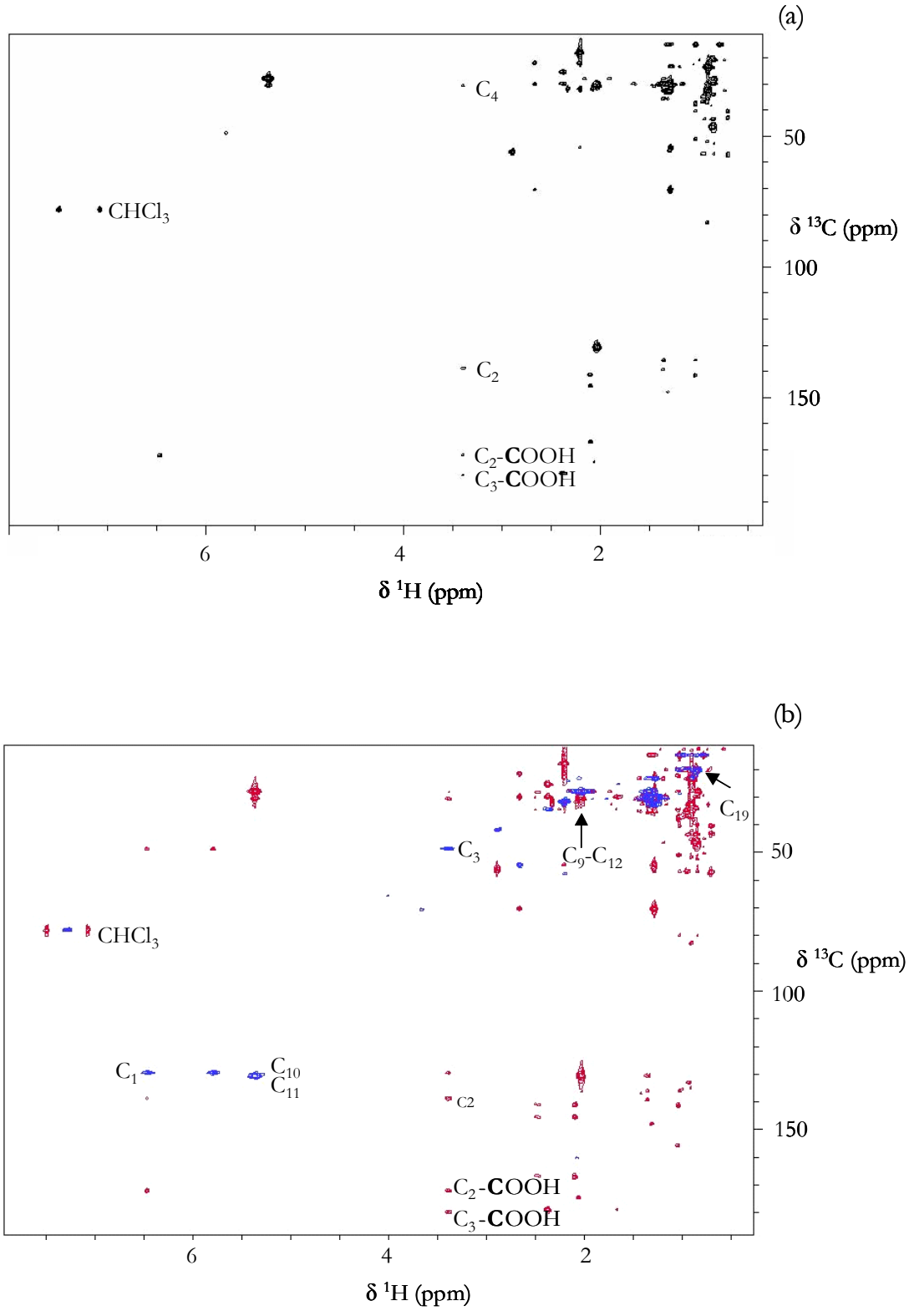

Figura 28. Espectros ^{1}H-^{13}C HMBC (a), y ^{1}H-^{13}C HMBC (rojo) y ^{1}H-^{13}C HSQC (azul) superpuestos (b) del ácido 7-hexadecilitacónico.

2.4.2 NMR del ácido agarícico

La estructura química del ácido agarícico se confirmó por comparación del espectro de NMR del metabolito aislado de *P. placenta* con el ácido agarícico sintetizado por *P. officinalis*. En ambos casos el análisis se realizó con los compuestos metilados para estabilizar los grupos carboxilos. La estructura del ácido agarícico y las asignaciones de ^{1}H y ^{13}C-NMR se muestran en la Figura 29 y en la Tabla 3, respectivamente.

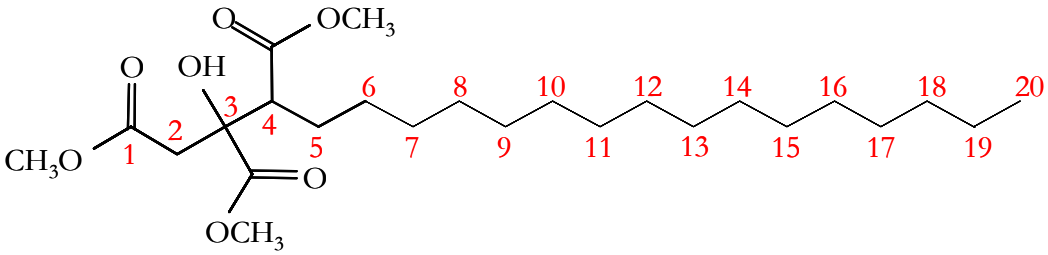

Figura 29. Estructura química y nomenclatura seguida para los análisis de NMR del ácido agarícico metilado.

Tabla 3. Asignaciones del NMR de ^{1}H y ^{13}C del ácido agarícico metilado.

Posición	$\delta^{13}C$ (ppm)	$\delta^{1}H$ (ppm)
1	170,9	
2	40,8	2,7 4,0
3	76,0	
4	54,0	2,7
5	27,0	1,5 1,8
6-18	29,3	1,2
19	22,5	1,3
20	14,3	0,9
$C_{(3)}$-**C**$OOCH_3$	174,3	
$C_{(4)}$-**C**$OOCH_3$	176,3	
$C_{(3)}$-COO**C**H_3	53,1	3,8
$C_{(2)}$-COO**C**H_3	51,8	3,7
$C_{(4)}$-COO**C**H_3	51,8	3,7
OH		3,9

En la Figura 30 se muestra el espectro ^{1}H-NMR del ácido agarícico metilado. Los tres protones de cada grupo metilo dieron un solo pico asignándose a δ_H= 3,70 ppm los del metoxilo del C_2, a δ_H= 3,74 ppm los del metoxilo del C_4 y a δ_H= 3,83 ppm los del metoxilo del C_3. A este carbono también se une el grupo hidroxilo, de ahí que el entorno del correspondiente metilo difiera de los otros dos.

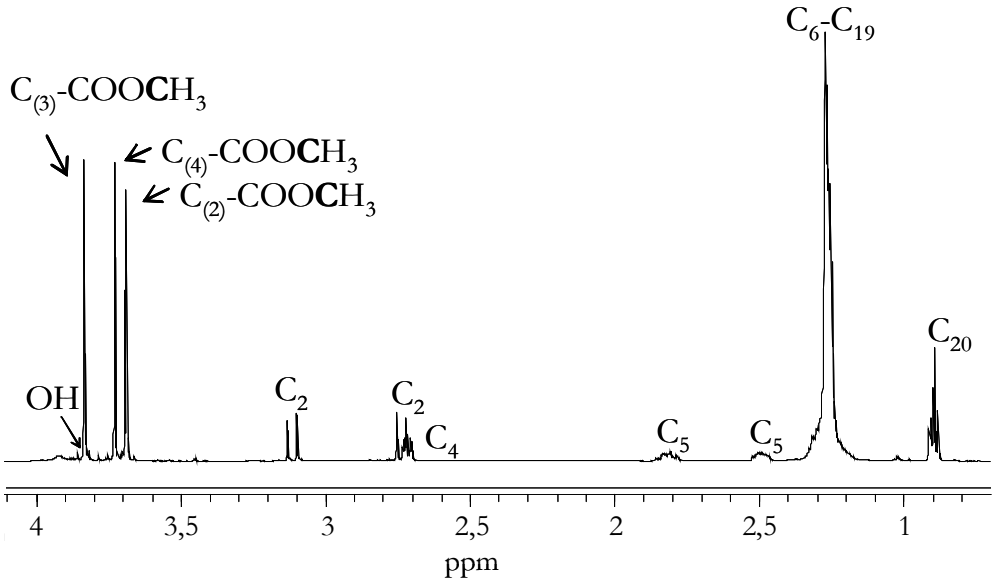

Figura 30. ^{1}H-NMR del ácido agarícico metilado.

La señal del protón del grupo hidroxilo (δ_H= 3,9 ppm) es poco intensa debido a que éste es muy ácido e intercambiable por los hidrógenos del H_2O residual. Los protones unidos a C_2 y C_5 dieron señales dobles con asignaciones para el C_2 a δ_C/δ_H= 40,8/2,7 y 4,0 ppm y para el C_5 a δ_C/δ_H= 27,0/1,5 y 1,8 ppm. La señal cruzada del C_4 y su protón se asignó a δ_C/δ_H= 54/2,7 ppm. Los grupos metilenos de la cadena alquílica (C_6-C_{18}), dieron la misma señal a δ_C/δ_H= 29,3/1,2 ppm. Integrando esta señal se correspondió con 26 protones, es decir 13 átomos de carbono formarían la cadena alquílica. El grupo metileno en C_{19} por influencia del grupo metilo (C_{20}) dio señales diferentes al resto de los metilenos de la cadena alquílica a δ_C/δ_H= 22,5/ 1,3 ppm, mientras que el grupo metilo (C_{20}) dio señal δ_C/δ_H= 14,3/ 0,9 ppm. Estas asignaciones se establecieron a partir del experimento HSQC (Fig. 31).

La señal de los carbonos de los grupos carboxilos así como del C_3, al tratarse de carbonos cuaternarios, se identificaron en el espectro HMBC (Fig. 32). El grupo carboxilo unido al C_3 se asignó a δ_C= 174,3 ppm, el

grupo carboxilo unido al C_4 a δ_C= 176,3 ppm. El C_1 se asignó a δ_C= 170,9 ppm y el C_3 a δ_C= 76 ppm.

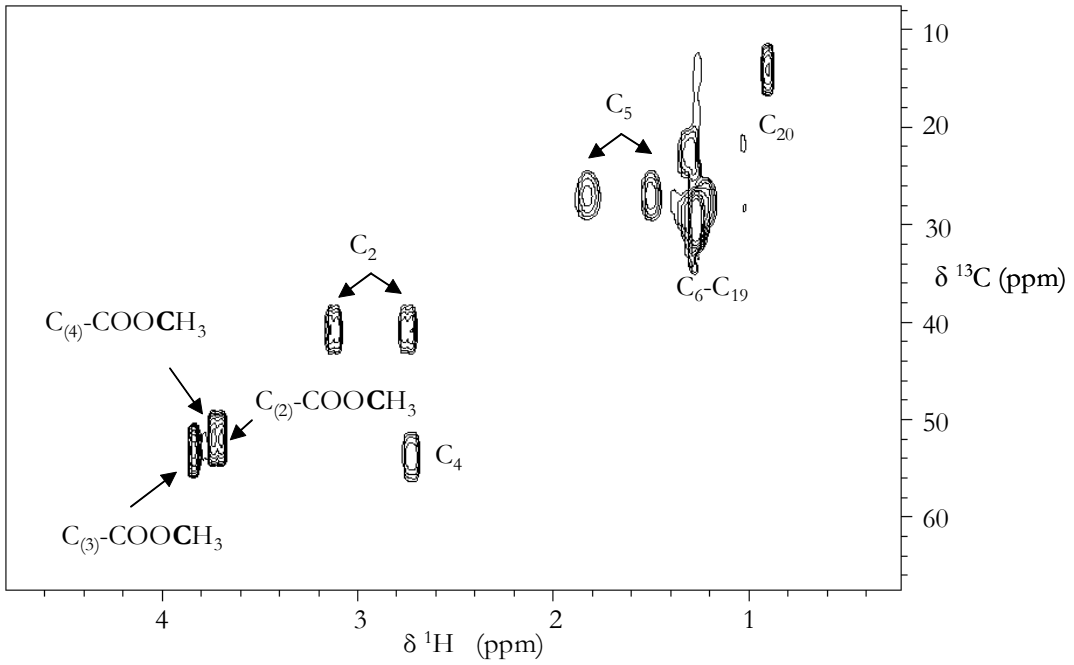

Figura 31. Espectro HSQC del ácido agarícico metilado.

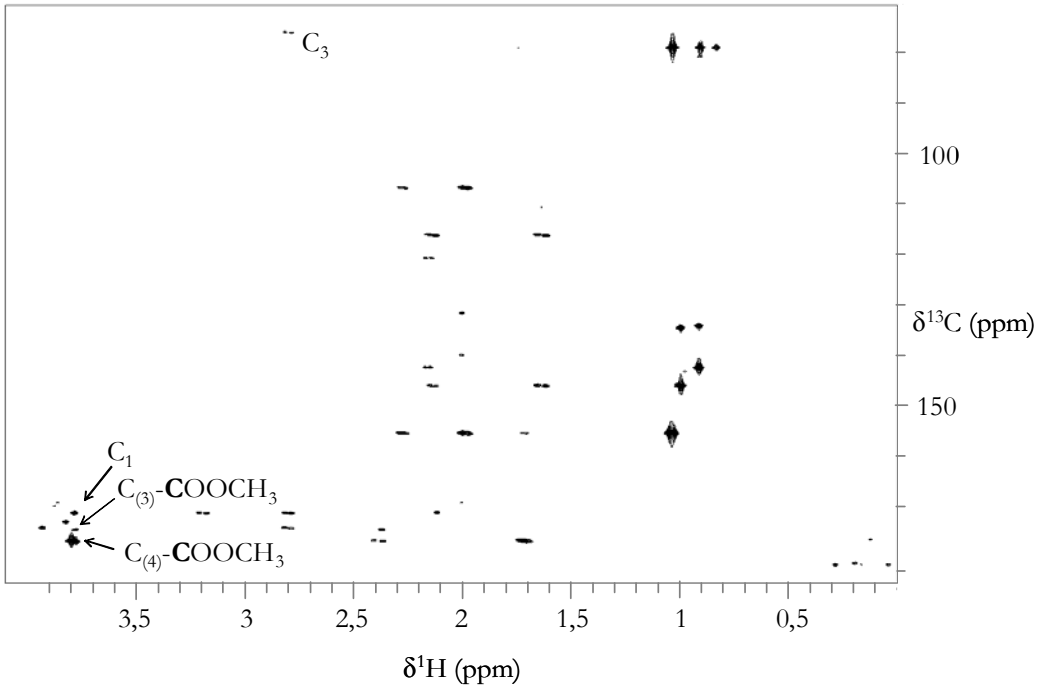

Figura 32. Espectro de ^{1}H-^{13}C HMBC del ácido agarícico metilado.

Tras los análisis de NMR se confirma que el metabolito sintetizado por *P. placenta* es un ácido tricarboxílico constituido por una cadena alquílica de 20 átomos, saturada e hidroxilada en el C_3. Por tanto *P. placenta* y *P. officinalis* sintetizan el mismo compuesto, el ácido agarícico.

3. DISCUSIÓN

3.1. Los ácidos alquilitacónicos

Se ha identificado una serie de ácidos alquilitacónicos durante la degradación de madera de *E. globulus* por hongos de podredumbre blanca, principalmente con el hongo *C. subvermispora* aunque también se han identificado estos compuestos en concentraciones bajas en madera de *E. globulus* tratada con otros hongos de podredumbre blanca como *P. eryngii,* como se describe en el Capítulo 4.

Los ácidos alquilitacónicos producidos por *C. subvermispora* al crecer sobre madera de *E. globulus,* en condiciones de SSF, se caracterizaron mediante GC/MS y 2D-(^{1}H-^{13}C)-NMR en experimentos HSQC y HMBC, encontrándose que estaban constituidos por una cadena alifática unida al C_3 del ácido itacónico.

Los tres compuestos mayoritarios de la serie son los ácidos tetradecil-, hexadecenil- y hexadecilitacónico. Estos tres compuestos podrían sintetizarse a partir de los tres ácidos grasos presentes en la madera de eucalipto, ácidos palmítico, oleico y esteárico, respectivamente (ver Capítulo 4) (Gutiérrez *et al.*, 1999a).

Los espectros de masas de los ácidos alquilitacónicos fueron similares a los de compuestos relacionados, como el ácido 15-hidroxihexadecilitacónico, identificado en el liquen *Usnea aliphatica* (Keogh y Zurita, 1977). En los espectros de masas de estos compuestos se observaron fragmentos correspondientes al grupo itacónico, así como a sus isómeros citracónico (ácido *cis*-propen-2,3-dicarboxílico) y mesacónico (ácido *trans*-propen-2,3-dicarboxílico) (Fig. 33), como el ión de m/z 126, presente en todos los espectros de masas de los ácidos alquilitacónicos.

La presencia de sólo dos protones en el C_1 en los espectros HMBC y HSQC de 2D-NMR, nos indican que los ácidos sintetizados por *C. subvermispora* derivan del ácido itacónico y no del ácido citracónico o mesacónico. El ácido itacónico es estable a pH ácido, neutro y parcialmente básico, sólo en condiciones de temperatura moderada (Willke y Vorlop,

2001). Sin embargo, durante la metilación, al aumentar el tiempo de reacción con el agente metilante, los ácidos alquilitacónicos se isomerizan dando lugar a sus isómeros citracónicos metilados, indicando que el agente metilante reacciona con el grupo itacónico provocando una transformación a su forma más estable.

Varios ácidos alquilitacónicos han sido encontrados previamente en hongos y líquenes, como el ácido hidroxibutilitacónico identificado en los conidios del hongo *Penicillium decumbens* (McCorkindale *et al.*, 1978), y el ácido 15-hidroxihexadecilitacónico identificado en el liquen *U. aliphatica,* (Keogh y Zurita, 1977). En el año 2000 se identificó por primera vez un ácido alquilitacónico (ácido hexadecenilitacónico) en madera de haya libre de extracto lipídico, tratada con *C. subvermispora* en condiciones de SSF (Enoki *et al.*, 2000). En este trabajo la posición del doble enlace se determinó de forma errónea. Posteriormente se describieron varios ácidos alquilitacónicos en madera de eucalipto tratada con distintos hongos de podredumbre blanca (del Río *et al.*, 2002; Gutiérrez *et al.*, 2002).

Compuestos análogos a los alquilitacónicos son los alquilcitracónicos, también llamados ácidos quetomélicos, que han sido identificados en *Chaetomella acutiseta*, *Chaetomella raphigera, Chaetomella circinoseta* y *Chaetomella oblonga*, y en el basidiomiceto *Piptoporus australiensis* (Gill, 1982; Singh *et al.*, 1993). En este basidiomiceto únicamente se ha identificado el anhídrido hexadecilcitracónico. Los ácidos quetomélicos sintetizados por *C. acutiseta* son potenciales antitumorales ya que son fuertes inhibidores de las farnesil transferasas (RAS) (Gill, 1982; Singh *et al.*, 1993; Lingham *et al.*, 1993; Vilella *et al.*, 2000). Se puede especular que los ácidos alquilitacónicos con una estructura muy parecida a la de los ácidos alquilcitracónicos presenten una actividad similar.

Otros metabolitos fúngicos relacionados son los ácidos protoliquesterínico, liquesterínico y murólicos, que poseen un grupo lactona que deriva del ácido itacónico o citracónico (Huneck *et al.*, 1979).

3.2. Los ácidos alquilcítricos

Se identificaron derivados del ácido cítrico en maderas de *E. globulus* tratadas con el hongo de podredumbre parda *P. placenta* en condiciones de SSF. Estos compuestos han sido caracterizados, mediante GC/MS y 2D-NMR, como ácidos tricarboxílicos constituidos por una larga cadena alifática saturada unida al C_4 del ácido cítrico.

Los compuestos identificados fueron el ácido tetradecilcítrico (ácido norcaperático) y el ácido hexadecilcítrico (ácido agarícico), con un predominio de este último. Los ácidos norcaperático y agarícico sin derivatizar presentan espectros de masas similares a los ácidos tetradecilitacónico y hexadecilitacónico, respectivamente. Esto es debido a la poca estabilidad del grupo carboxilo unido al C_3, que debido a las altas temperaturas del inyector sufre una reacción de descarboxilación y posterior deshidratación (Benoit y Holmes, 1969; Christie, 1994). La baja estabilidad de este grupo carboxilo es debida a su unión a un carbono cuaternario al que se une a su vez un grupo hidroxilo.

Al derivatizar las muestras, ya sea metilando o silanizando, los grupos carboxilos se estabilizan, evitando que el compuesto sufra descarboxilaciones a la hora de llevar a cabo el análisis cromatográfico. La presencia de los tres grupos carboxilos se confirmó mediante los experimentos HMBC de los compuestos metilados, en los que se observaron los tres grupos carboxilos y los experimentos HSQC de los compuestos metilados, donde se observaron los grupos metilo unidos a cada uno de los tres grupos carboxilos. Estos compuestos tricarboxílicos, podrían ser los precursores directos de los ácidos alquilitacónicos como se discute en el apartado 3.6.

3.3. Los anhídridos aquilitacónicos

En los cultivos de *L. sulphureus* sobre madera de *E. globulus* en condiciones de SSF, se identificaron los anhídridos alquilitacónicos mediante GC/MS. Estos compuestos son similares al anhídrido hexadecenilcitracónico identificado en *C. acutiseta* (Singh *et al.*, 1993) y en el basidiomiceto *P. australiensis* (Gill, 1982). En el caso de *C. acutiseta* la presencia de este compuesto en forma diácida o anhídrida es dependiente del pH, mientras que en el caso de *P. australiensis* solamente se ha descrito la forma anhídrida.

En los análisis de los lípidos de *L. sulphureus* sin derivatizar se obtuvieron patrones de fragmentación similares a los ácidos alquilitacónicos. Si las muestras se metilaban se obtenían picos minoritarios, cuyos patrones de fragmentación correspondían a los ácidos alquilitacónicos metilados, y picos mayoritarios correspondientes a los ácidos alquilitacónicos sin metilar, o a los ácidos alquilcitracónicos metilados, según que el tiempo de reacción con el agente metilante fuera menor o mayor, respectivamente. Al

silanizar las muestras se obtuvieron picos pequeños con un patrón de fragmentación correspondiente a los ácidos alquilitacónicos silanizados y otros mayoritarios correspondientes a los ácidos alquilitacónicos sin silanizar. Este resultado indicó que un alto porcentaje de los compuestos sintetizados por *L. sulphureus* no presentaban ningún grupo carboxilo libre susceptible de ser derivatizado.

Los análisis de las muestras de *C. acutiseta*, y *L. sulphureus*, revelaron que los compuestos que sintetizaban ambos hongos presentaban cierta semejanza. Diferían únicamente en que en el primer caso sólo se detectaron derivados del ácido citracónico. Por lo tanto los anhídridos sintetizados por *L. sulphureus* serían derivados del ácido itacónico, y no del ácido citracónico como ocurre en el caso de *C. acutiseta.*

Por otro lado, el hecho de que al duplicar el tiempo de metilación en ambos hongos, aumentase la proporción de los ácidos alquilcitracónicos metilados, implica que el agente metilante es capaz de reaccionar con el anillo, transformando los compuestos de su forma anhídrida a su forma diácida. En *L. sulphureus,* el cambio de conformación de los derivados citracónicos se debe a que los anhídridos de los ácidos alquilitacónicos, en condiciones de metilación exhaustiva, dan lugar al éster metílico de su isómero diacídico más estable, el ácido alquilcitracónico. Cuanto mayor sea el tiempo de reacción mayor será la proporción de anhídridos que se encuentran en forma diacídica.

Podemos concluir que *L sulphureus* sintetiza los ácidos alquilitacónicos en sus formas diácida y anhídrida. Sin embargo, en todas las muestras analizadas en este trabajo la forma diacídica fue minoritaria.

3.4. ¿Anhídridos ó diácidos?

El pH de la madera varía según las especies entre 4 y 8. En el caso de la madera de eucalipto, su pH se sitúa en torno a 4 (Fengel y Wegener, 1984). Durante la degradación de la misma por *C. subvermispora* y *L. sulphureus* en condiciones de SSF, el pH disminuyó hasta 2,5. A este pH los ácidos alquilitacónicos se encuentran protonados pudiendo reaccionar sus grupos carboxilos, perdiendo una molécula de H_2O y dando lugar a su forma anhídrida.

En el caso de *L. sulphureus* los ácidos alquilitacónicos aparecieron en su gran mayoría en forma anhídrida, lo cual no ocurre en el caso de los

ácidos alquilitacónicos sintetizados por *C. subvermispora*, que aparecen en forma diácida, a pesar de encontrarse al mismo pH.

Una de las principales diferencias entre estos dos hongos es la forma de degradar la madera, *L. sulphureus* degrada principalmente la celulosa (podredumbre parda) mientras que *C. subvermispora* degrada la lignina sin prácticamente alterar las fibras de celulosa (podredumbre blanca de tipo selectiva) (Martínez, 2006). Como se discute en el Capítulo 2, la diferente degradación de la celulosa puede ser debida a la capacidad de *C. subvermispora* para inhibir la reacción de Fenton, ya que los ácidos alquilitacónicos podrían quelar el Fe^{3+} (Watanabe *et al.*, 2001; Enoki *et al.*, 2002). El hecho de que los compuestos sintetizados por *L. sulphureus* sean anhídridos imposibilita su unión al Fe^{3+}. De esta forma la reacción de Fenton no se inhibe y de ahí que degraden la celulosa.

El mecanismo por el que *L. sulphureus* mantiene estos compuestos en su forma diácida es desconocido.

3.5. Isomerización entre los ácidos/anhídridos alquilitacónicos y alquilcitracónicos

Los ácidos/anhídridos alquilitacónicos y alquilcitracónicos, anteriormente descritos, están relacionados por reacciones de isomerización (Figura 33).

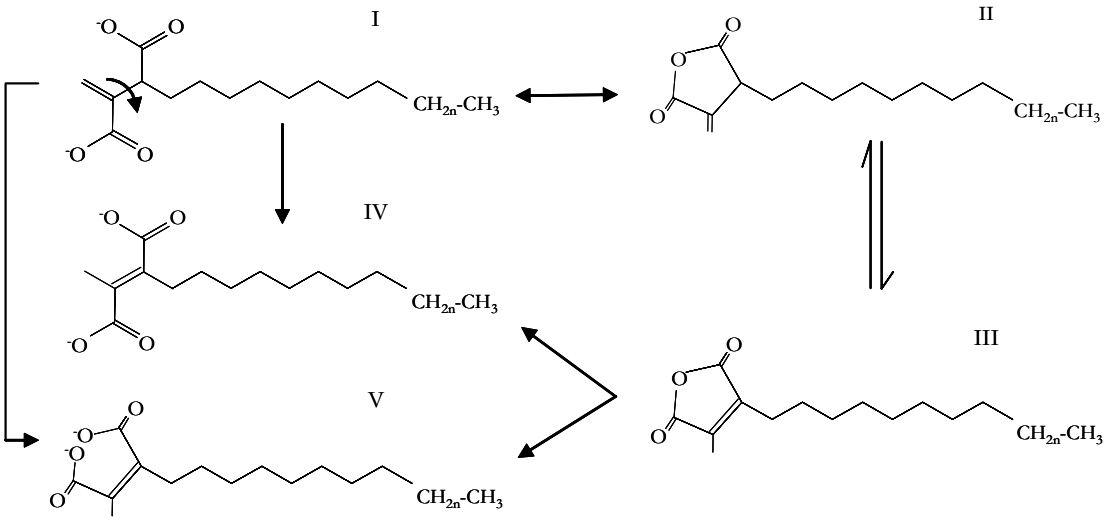

Figura 33. Reacciones de isomerización entre los compuestos estudiados: I) ácido alquilitacónico II) anhídrido alquilitacónico, III) anhídrido alquilcitracónico, IV) ácido alquilcitracónico y V) ácido alquilmesacónico.

A partir de los ácidos alquilcítricos se sintetizarían los ácidos alquilitacónicos que, a su vez, darían lugar al anhídrido alquilitacónico. El enlace simple que une los C_2-C_3 puede rotar aproximando los dos grupos carboxilos, perdiéndose una molécula de H_2O y originándose un anhídrido itacónico. El anhídrido alquilitacónico se estabilizaría formándose el anhídrido citracónico, el cual en presencia de H_2O se hidrataría abriendo su anillo dando lugar al ácido alquilmesacónico y al ácido alquilcitracónico.

3.6. Posible ruta de biosíntesis de los ácidos alquil-di/tri-carboxílicos

Esta serie de compuestos carboxílicos poseen una estructura química muy similar lo que indica que la ruta de biosíntesis debe ser común. Diversos ácidos di- o tricarboxílicos son sintetizados tanto por hongos como por líquenes (Turner, 1971; Turner y Aldridge, 1983).

Como ruta de síntesis de estos compuestos se propone una modificación del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, en el cual se condensa el grupo carboxilo del acetil-CoA con el grupo metileno del oxalacetato para dar lugar, mediante la citrato sintasa, al ácido cítrico. Éste, tras una deshidratación, origina el ácido *cis*-aconítico, de baja estabilidad y que normalmente no se disocia del centro activo. Existe una desviación conocida de esta ruta en la que el *cis*-aconitato, mediante la *cis*-aconitato sintasa, da lugar al ácido itacónico (Bonnarme *et al.*, 1995).

La síntesis de los ácidos alquiltricarboxílicos y alquildicarboxílicos sería similar a la síntesis del ácido cítrico y del ácido itacónico, respectivamente. En este caso el grupo metileno del ácido oxalacético se condensaría con el grupo carbonilo de los ácidos grasos precursores, previamente activados por la ruta de los tioésteres.

Las enzimas citrato sintasas han sido aisladas en muchos organismos pero no ocurre lo mismo con las alquilcitrato sintasas que son poco corrientes. Se conocen dos, caracterizadas en *Penicillium lehmanii*, que son responsables de la síntesis del ácido decilcítrico y del ácido decilhomocítrico (Måhlén, 1971; Måhlén, 1973). La formación de este grupo de ácidos alquili-di/tri-carboxílicos estaría regulada por la especificidad de las alquilcitrato sintasas, así, por ejemplo, la decilcitrato sintasa de *P. lehmanii* utiliza preferentemente tioésteres saturados, cuyas cadenas alquílicas tengan una longitud inferior a 12 átomos de carbono (Måhlén y Gatenbeck, 1968; Måhlén, 1971).

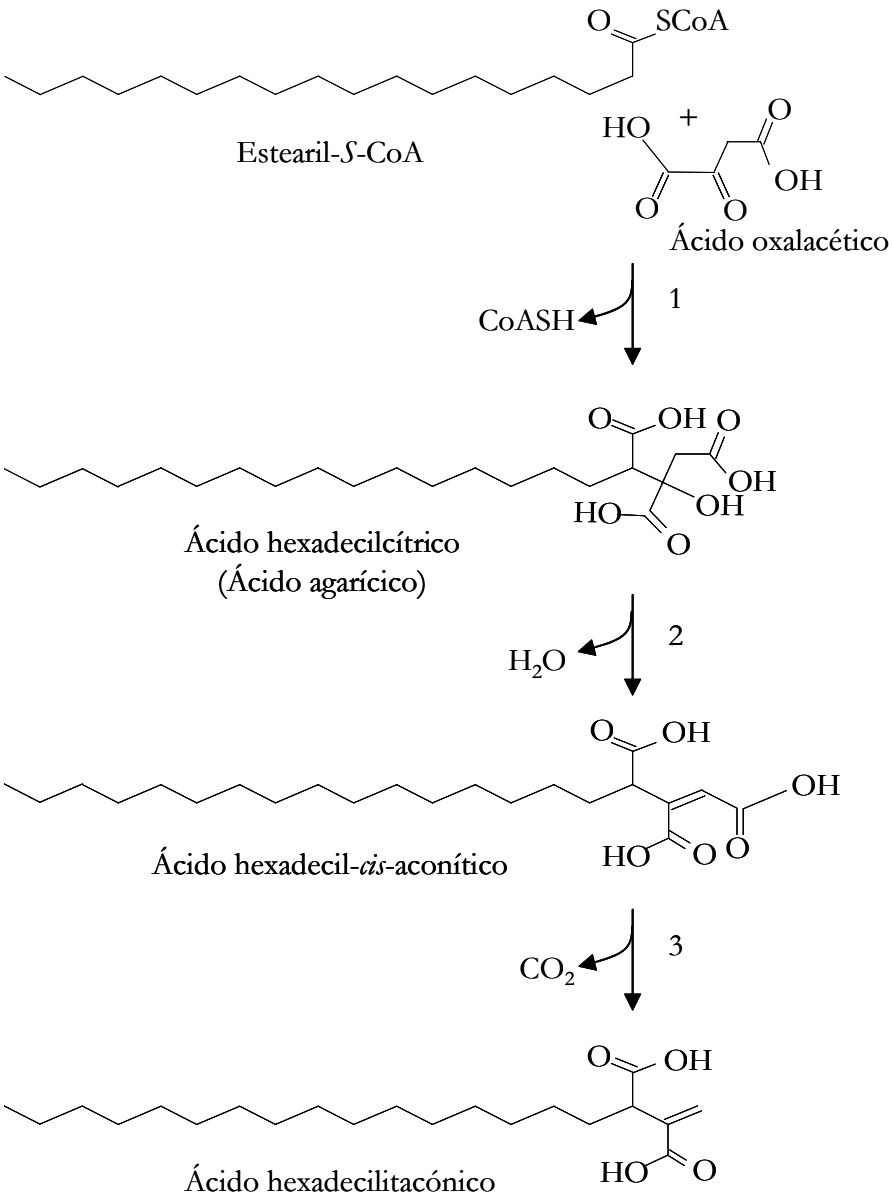

Figura 34. Esquema propuesto para la síntesis del ácido hexadecilitacónico: 1) condensación del grupo carbonilo del oxalacetato con el grupo metileno del estearil-S-CoA, 2) deshidratación y 3) descarboxilación.

Como ejemplo de la ruta de síntesis propuesta, en la Figura 34 se presenta la síntesis del ácido hexadecilitacónico. Éste se originaría a partir de la condensación del estearil-*S*-CoA con el ácido oxalacético, dando lugar

al ácido agarícico que tras una deshidratación y una descarboxilación, generaría el ácido hexadecilitacónico.

En el caso del ácido 7-hexadecenilitacónico, su ácido graso precursor sería el ácido oleico y su intermediario alquiltricarboxílico sería el ácido hexadecenilcítrico, compuesto que no ha sido identificado en ninguna de las muestras analizadas en este trabajo. El precursor del ácido norcaperático y por tanto del tetradecilitacónico, sería el ácido palmítico.

Los hongos en los que se han descrito este tipo de compuestos (*L. sulphureus, C. subvermispora,* y *P. placenta*) podrían utilizar los ácidos grasos de la madera o bien sintetizarlos para utilizarlos en la producción de los nuevos compuestos di/tricarboxílicos.

Capítulo 4

Estudio de las posibles funciones de los ácidos alquilitacónicos en la biodegradación de la madera

Resumen. Se observa una correlación entre el aumento de ácidos alquilitacónicos (identificados en el Capítulo 3) y la producción de TBARS (especies reactivas con el ácido tiobarbitúrico) en cultivos de *Ceriporiopsis subvermispora* sobre madera de eucalipto, al mismo tiempo que se produce una degradación preferente de la lignina. Sin embargo, dichos niveles no se corresponden con la producción de enzimas ligninolíticas y las enzimas aisladas no son capaces de peroxidar los ácidos alquilitacónicos purificados dando lugar a TBARS. Además, utilizando un dímero modelo de lignina, se demuestra que los ácidos alquilitacónicos no sólo no promueven su ataque oxidativo por manganeso peroxidasa/Mn^{2+}, sino que inhiben la oxidación del dímero en presencia de lípidos peroxidables. Este hecho, junto con la detección de ácidos alquilitacónicos y sus precursores en madera tratada tanto por hongos de podredumbre blanca como de podredumbre parda (ver Capítulo 2) permiten descartar la hipótesis anteriormente propuesta de que la síntesis de ácidos alquilitacónicos es la causa de la capacidad de *C. subvermispora* para degradar la lignina de la madera de una forma selectiva.

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos producen una gran variedad de ácidos grasos, tanto libres como esterificados (Sancholle y Lösel, 1996). El micelio vegetativo (de cultivos puros) y los cuerpos fructíferos de los basidiomicetos difieren tanto en su contenido lipídico como en la composición de los ácidos grasos. En la mayor parte de los casos, los ácidos grasos más abundantes son el ácido oleico, el ácido palmítico y el ácido linoleico, destacando la presencia de éste último en los cuerpos fructíferos donde llega a representar entre el 70 y 80 % del total de lípidos (Shaw, 1966; Aho y Kurkela, 1978; Martínez *et al.*, 1991). Al igual que en otros organismos, los ácidos grasos insaturados facilitan la adaptación de algunos hongos a bajas temperaturas (Dart, 1976) y pueden estar implicados en procesos de degradación de lignina tal como se describe más adelante.

Los hongos de podredumbre blanca son los únicos organismos capaces de degradar de forma eficaz la lignina, mineralizándola hasta CO_2 y H_2O. Sin embargo, algunos de estos hongos, como *C. subvermispora*, carecen de lignina peroxidasa (LiP) o peroxidasa versátil (VP). Para explicar el mecanismo por el cual los hongos de podredumbre blanca que carecen de dichas enzimas degradan de forma eficaz la lignina, se han propuesto mecanismos de peroxidación lipídica mediados por enzimas capaces de oxidar el Mn^{2+} (Bao *et al.*, 1994; Jensen *et al.*, 1996; Kapich *et al.*, 1999a; 1999b) (Fig. 1).

Las reacciones de peroxidación pueden iniciarse con la oxidación de Mn^{2+} a Mn^{3+} (Bao *et al.*, 1994) el cual, una vez estabilizado en forma de quelato, puede oxidar ácidos grasos insaturados dando lugar a radicales acilo ($L^{\bullet}$). Estos radicales reaccionan con el oxígeno generando radicales peroxilo ($LOO^{\bullet}$) que a su vez pueden oxidar a otros ácidos grasos propagando la reacción. Como resultado de estas reacciones se generan hidroperóxidos (LOOH) que originan a su vez radicales alcoxilo ($LO^{\bullet}$) mediante reacciones de tipo Fenton en las que intervienen metales de transición presentes en el medio en concentraciones trazas. Los radicales alcoxilo son oxidantes más fuertes que los radicales peroxilo. El papel de estos radicales lipídicos en la degradación de la lignina no se conoce bien, pero se admite como hipótesis para la degradación de las unidades no fenólicas por parte de los hongos que carecen de LiP o VP y que sólo sintetizan manganeso peroxidasa (MnP). Existen estudios de degradación *in*

vitro de dímeros modelo de la lignina mediante estas reacciones (Moen y Hammel, 1994).

En las reacciones de peroxidación los hongos pueden utilizar tanto los lípidos insaturados generados por su metabolismo (Martínez *et al.*, 1991; Sancholle y Lösel, 1996), como los lípidos insaturados del sustrato vegetal sobre el que crecen (Kapich y Shishbina, 1995; Bogan *et al.*, 1996). En estudios de degradación de la fracción lipídica de la madera, se detectó la presencia de nuevos lípidos, especialmente abundantes en los cultivos del hongo *C. subvermispora* (Enoki *et al.*, 2000; Gutiérrez *et al.*, 2002), que han sido identificados por GC/MS y 2D-NMR como ácidos alquilitacónicos, como se describe en el Capítulo 3. En los procesos de peroxidación a través de la MnP participan ácidos grasos insaturados en forma libre (no esterificados) (Watanabe *et al.*, 2000). Los ácidos alquilitacónicos presentan dos grupos carboxilos libres así como insaturaciones en la cadena alquílica, lo que hace pensar que podrían estar implicados en la degradación de lignina mediante reacciones de peroxidación iniciadas por las peroxidasas capaces de oxidar Mn^{2+}.

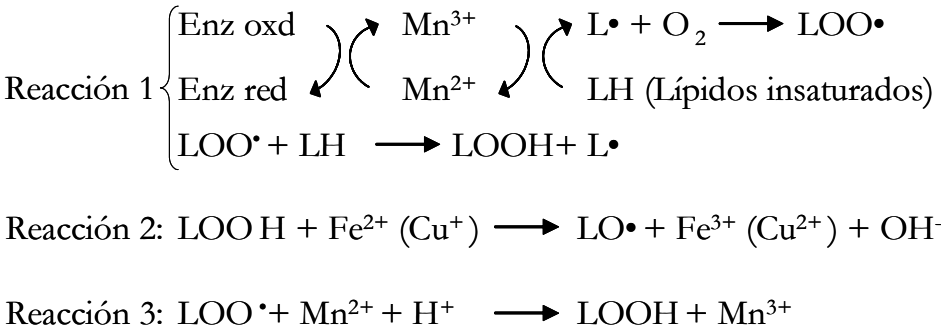

Figura 1. Reacciones de producción de radicales lipídicos por los hongos. Reacción 1: peroxidación lipídica iniciada por la enzima (Enz) MnP. Reacción 2: producción del radical alcoxilo mediante la oxidación de metales de transición presentes en el medio (reacción tipo Fenton). Reacción 3: Producción del radical peroxilo a través de la oxidación del Mn^{2+} tal como había sido sugerido por Watanabe *et al.* (2000).

2. RESULTADOS

2.1. Degradación de la fracción lipídica de la madera de eucalipto por *C. subvermispora* en condiciones de SSF

Durante el tratamiento de la madera de eucalipto por *C. subvermispora* en condiciones de SSF, los lípidos originalmente presentes fueron degradados en su mayoría, pero también se sintetizaron nuevos compuestos lipídicos.

La fracción extraíble de la madera de eucalipto no inoculada estaba compuesta por un 30 % de compuestos polares, y un 70 % de compuestos lipídicos. La composición de la fracción lipídica (Tabla 1) incluyó un 30 % de esteroles esterificados, un 41 % de esteroles libres, un 9 % de hidrocarburos esteroidales y un 15 % de ácidos grasos, dentro de los cuales los ácidos palmítico, linoleico y oleico fueron los mayoritarios. Con menores porcentajes aparecieron cetonas esteroidales y triglicéridos (2 %).

En la Figura 2 se muestran los cromatogramas de la fracción lipídica durante la degradación de la madera de eucalipto por *C. subvermispora* en condiciones de SSF. A lo largo del tratamiento la composición de la fracción lipídica varió drásticamente, produciéndose el mayor porcentaje de degradación durante el primer mes. A medida que se degradaron los lípidos de la madera se observó la acumulación de tres compuestos (picos I a III) ausentes en la madera sin inocular, que fueron identificados como ácidos alquilitacónicos (ver Capítulo 3).

Los ácidos grasos insaturados, ácidos oleico y linoleico, presentaron incrementos en su concentración durante las fases iniciales de degradación (Fig. 3a). El ácido linoleico aumentó durante los 30 primeros días de cultivo y el ácido oleico durante la primera semana, pero ambos fueron finalmente degradados. Los ácidos grasos saturados, palmítico y esteárico, disminuyeron a lo largo de todo el cultivo. El porcentaje final de degradación del total de ácidos grasos fue de un 90 %. Por otro lado, los esteroles libres y esterificados, así como los hidrocarburos esteroidales, experimentaron también una fuerte degradación (90-98 %) (Fig. 3b). En menor grado se degradaron las cetonas esteroidales (hasta el 43 %).

Tabla 1. Variación de la composición lipídica de madera de *E. globulus,* tratada con *C. subvermispora*, en condiciones de SSF.

			Composición lipídica (mg 100 g^{-1}) de madera de *E. globulus*												
	Biomasa fúngica (%)	Pérdida de peso (%)	Total de lípidos	Ácidos grasos libres				Ácidos alquilitacónicos			Esteroides libres			Ésteres	
Tiempo (d)				$C_{16:0}$	$C_{18:0}$	$C_{18:1}^{9c}$	$C_{18:2}^{9c12c}$	$C_{14:0}$-AI	$C_{16:1}$-AI	$C_{16:0}$-AI	Hidrocarburos esteroidales	Esteroles libres	Cetonas esteroidales	Ésteres de esteroles	Triglicéridos
0	0	0	73	5,13	0,28	4,23	1,25	0	0	0	6,3	30	2,33	22,24	1,6
7	0,23	2	53	5,11	0,59	5,08	2,09	0,1	0,37	0,27	4,78	7,2	8,5	17,37	1,97
30	0,31	7	39	4,47	0,68	4,03	4,06	6,55	3,96	4,14	1,27	1,1	4,23	3,89	1,75
60	0,26	11	37	2,51	0,33	3,19	2,82	6,98	11,58	3,75	0,58	0,47	2,58	1,67	0,55
120	0,21	19	51	1,59	0,27	3,93	1,96	13,33	16,58	7,85	0,74	0,37	2,25	1,87	0,66
180	0,19	28	32	0,9	0,19	0	0	7	13,85	6,14	0,58	0,46	1,34	1,3	0,98

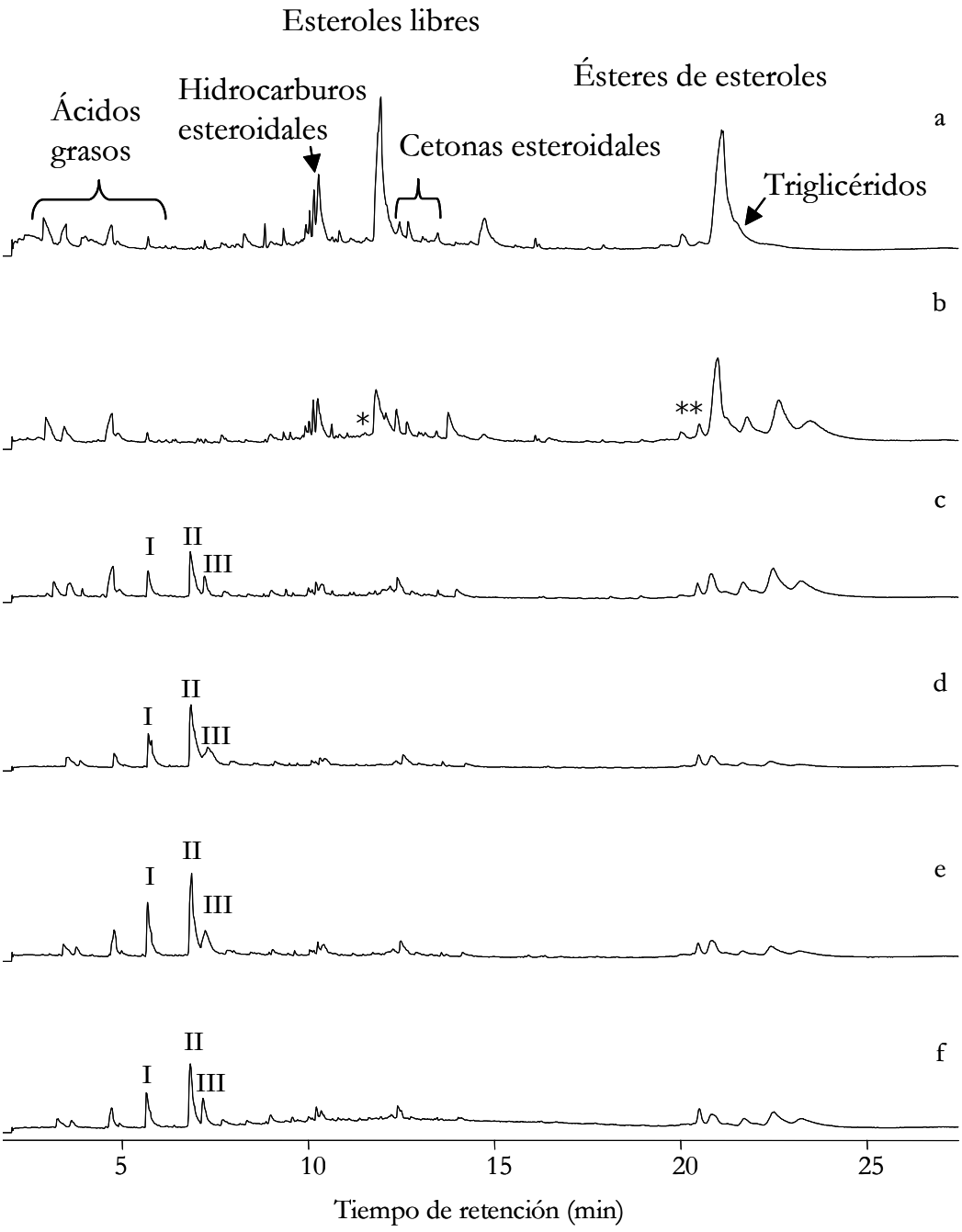

Figura 2. Cromatogramas del total de iones mostrando la degradación de la fracción lipídica de la madera de *E. globulus* y la síntesis de ácidos alquilitacónicos por *C. subvermispora*, a lo largo del tiempo de cultivo: a) Control sin inocular, b) 7 días, c) 30 días, d) 60 días, e) 120 días y f) 180 días (I: $C_{14:0}$-AI; II: $C_{16:1}$-AI; III: $C_{16:0}$-AI, * ergosterol, ** ésteres de ergosterol).

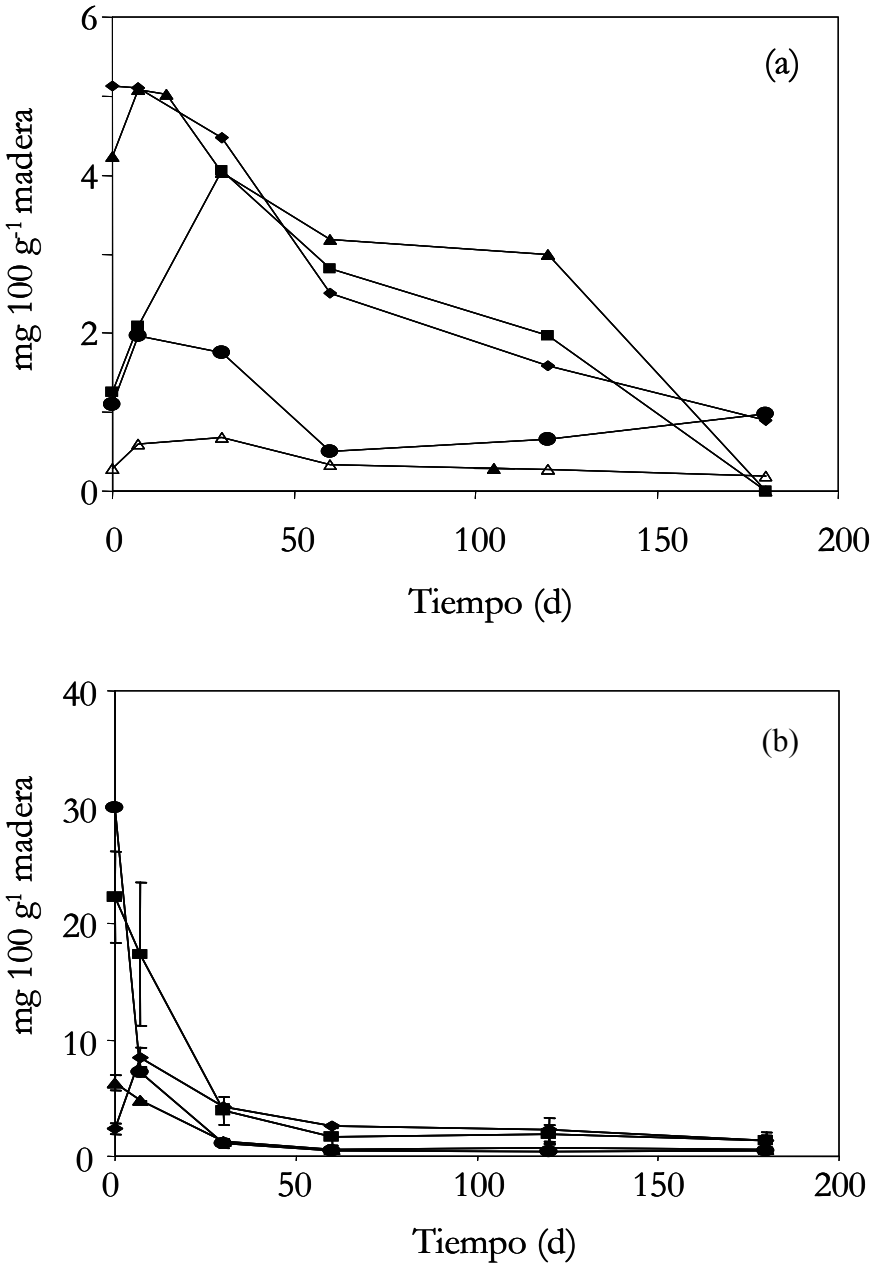

Figura 3. Degradación de los ácidos grasos y triglicéridos (a) y esteroides (b) de la madera de *E. globulus* por *C. subvermispora* a lo largo del tiempo de cultivo. a) $C_{16:0}$ (♦), $C_{18:0}$ (Δ), $C_{18:1}$ (▲), $C_{18:2}$ (■) y triglicéridos (●). b) Degradación de hidrocarburos esteroidales (▲), cetonas esteroidales (♦), ésteres de esteroles (■) y esteroles libres (●). Medias e intervalos de confianza del 95%.

Como estimación de la biomasa fúngica se cuantificó el ergosterol libre y esterificado, ausente en la madera sin inocular (Fig. 2). El perfil de producción de este esterol fúngico se muestra en la Figura 4. El ergosterol libre apareció en concentraciones 10 veces inferiores a los ésteres de ergosterol. La concentración de ambas formas aumentó al comienzo del cultivo, indicando la fase exponencial de crecimiento del hongo, y alcanzó el máximo a los 30 días. Posteriormente la biomasa se estabilizó relativamente, alcanzándose la fase estacionaria del crecimiento fúngico.

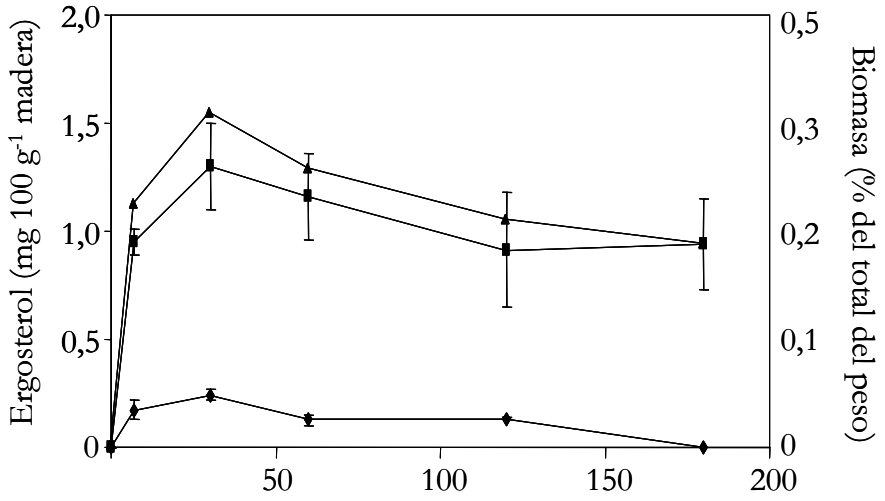

Figura 4. Ergosterol libre (♦), ésteres de ergosterol (■) y biomasa fúngica (▲). Medias e intervalos de confianza del 95%.

2.2. Producción de ácidos alquilitacónicos

El perfil de producción de ácidos alquilitacónicos en los cultivos de *C. subvermispora* sobre madera de eucalipto en condiciones de SSF, se muestra en la Figura 5. Su presencia empezó a ser evidente a partir de la primera semana, aumentando su concentración hasta los 120 días y estabilizándose hasta el final del cultivo. El incremento más acentuado se produjo entre la primera y cuarta semana de cultivo.

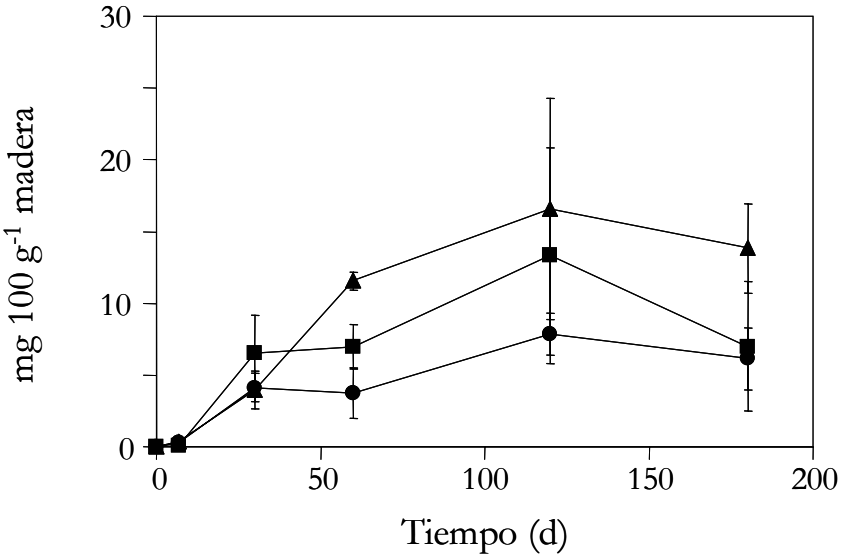

Figura 5. Perfil de producción de los 3 ácidos alquilitacónicos mayoritarios en cultivos de *C. subvermispora* sobre madera de *E. globulus* en condiciones de SSF. Ácido tetradecilitacónico (■), ácido 7-hexadecenilitacónico (▲) y ácido hexadecilitacónico (●). Medias e intervalos de confianza del 95%.

2.2.1. Optimización de la producción de ácidos alquilitacónicos

Para incrementar la producción de ácidos alquilitacónicos se ensayó el efecto de distintas variables de cultivo, como el grado de humedad, el tamaño de la astilla de madera, la cantidad de madera por cm^2 de superficie y el número de pases de la cepa utilizada. Con este fin se realizaron cultivos de *C. subvermispora* en condiciones de SSF, durante 60 días y se estimó la producción de los tres ácidos alquilitacónicos mayoritarios (ácidos tetradecil-, 7-hexadecenil- y hexadecilitacónico). Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 6.

En cuanto al grado de humedad, se ensayaron tres relaciones agua-madera (1:1, 2:1 y 4:1). La mayor producción de ácidos alquilitacónicos se obtuvo con una relación de 2:1 (Fig. 6a). Un mayor grado de humedad resultó excesivo para la producción de ácidos alquilitacónicos presentando un descenso del 55 % en su producción (para una misma pérdida de peso del 12 %). Un grado de humedad menor fue insuficiente para mantener el desarrollo del hongo durante los 60 días de cultivo.

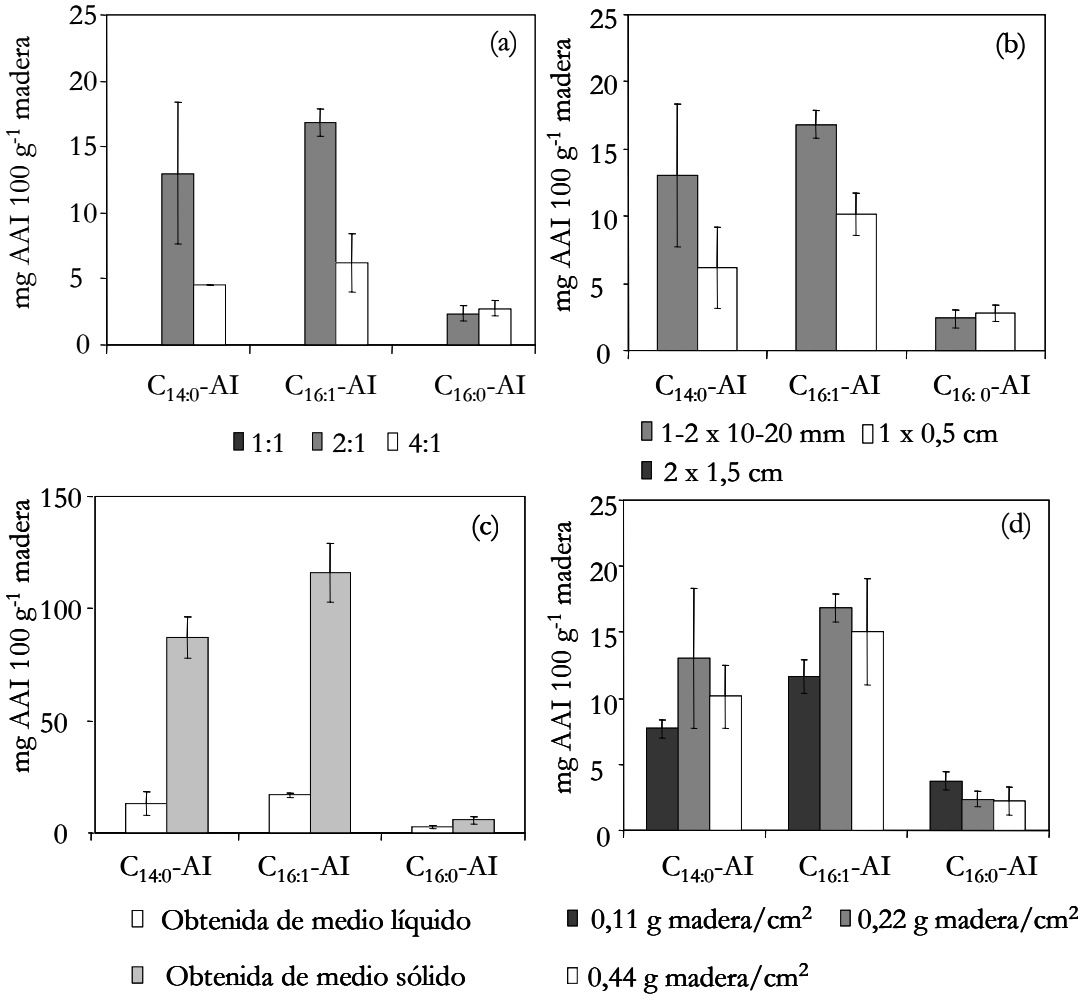

Figura 6. Producción de los tres ácidos alquilitacónicos mayoritarios en diferentes condiciones de cultivo. Efecto de: a) grado de humedad, b) tamaño de astilla, c) cepa fúngica utilizada, y d) cantidad de madera por cm² de superficie del matraz. Medias e intervalos de confianza del 95%.

La segunda variable a estudiar fue el tamaño de astilla, ensayándose tres tamaños diferentes: i) el "chip" utilizado en la industria papelera con un tamaño de 2 x 1,5 cm; ii) astillas de 1 x 0,5 cm; y iii) astillas de 1-2 x 10-20 mm (Fig. 6b). En el caso de los "chips" no se observó producción de ácidos alquilitacónicos. La pérdida de peso en los otros dos casos fue de un 13,3 % en el caso de astillas de 1 x 0,5 cm y un 12 % en el caso de astillas de 1-2 x 10-20 mm. La producción de ácidos alquilitacónicos fue un 40 % mayor en el caso de astillas de 1-2 x 10-20 mm, indicando la necesidad de accesibilidad al sustrato para la síntesis de estos compuestos.

Posteriormente, se comparó una cepa que ya había experimentado diversos ciclos de cultivo en medio líquido y otra conservada en la

colección en medio sólido. La pérdida de peso (12-13 %) y el crecimiento fueron muy semejantes en ambos casos, pero la producción de ácidos alquilitacónicos fue un 85 % superior con la cepa tomada de medio sólido (Fig. 6c).

Finalmente, en cuanto a la cantidad de madera por superficie del matraz, se obtuvieron resultados muy semejantes en la producción de ácidos alquilitacónicos y la pérdida de peso. El mejor resultado su obtuvo con un espesor de 0,22 g madera/cm^2, que dio lugar a una producción 28 % y 15 % superior a las obtenidas con el menor y mayor espesor, respectivamente (Fig. 6d).

En consecuencia, se establecieron como condiciones óptimas de cultivo una humedad de 2:1 (agua-madera), un tamaño de astilla de 1-2 x 10-20 mm y el uso de una cepa tomada de medio sólido.

2.3. Participación de los ácidos alquilitacónicos en la degradación de lignina

Los objetivos del presente trabajo incluyen el estudio de la posible participación de los ácidos alquilitacónicos en la degradación de la lignina, a través de reacciones de peroxidación mediadas por peroxidasas capaces de oxidar el Mn^{2+} (MnP o VP) y/o lacasas. Con este fin se estudió la variación del contenido en lignina así como las actividades enzimáticas durante el tratamiento de la madera de eucalipto con *C. subvermispora* en condiciones de SSF. Paralelamente, se valoró la formación de productos de peroxidación de los lípidos en forma de TBARS. Una vez aislados los ácidos alquilitacónicos se realizaron ensayos de peroxidación con VP. Finalmente, se valoró su posible contribución en la degradación de los lípidos aislados de madera de eucalipto y de un dímero modelo de lignina.

2.3.1 Degradación de la madera de *E. globulus* por *C. subvermispora* en condiciones de SSF

La Figura 7 muestra la pérdida de peso de la madera a lo largo del tratamiento con *C. subvermispora*, tras deducir la pérdida de peso en el control que sólo representó un 1 %. La mayor pérdida se produjo en los primeros 30 días coincidiendo con el mayor porcentaje de biomasa fúngica, para continuar de forma menos acentuada hasta los 180 días, con una pérdida final del 27 %.

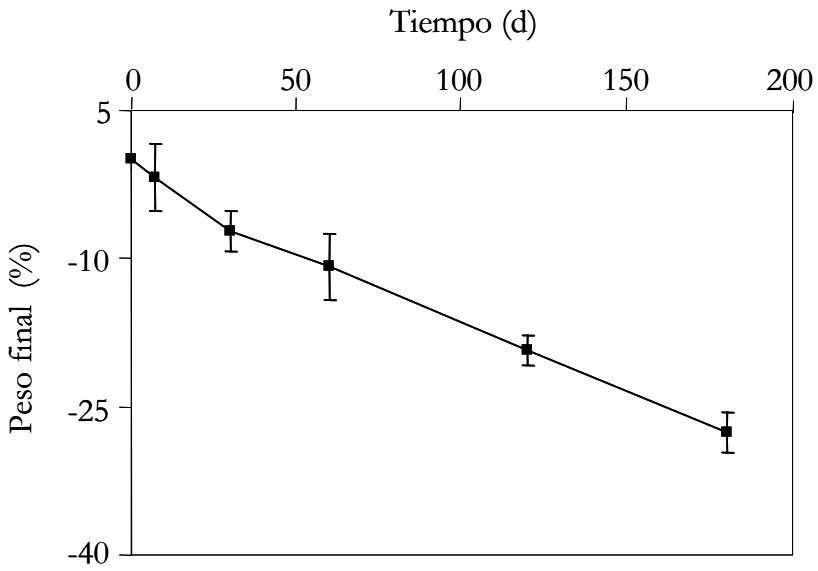

Figura 7. Pérdida de peso durante el tratamiento de la madera de *E. globulus* con *C. subvermispora* en condiciones de SSF. Medias e intervalos de confianza del 95%.

La degradación de lignina a lo largo del cultivo (Fig. 8) se determinó a partir del contenido en lignina Klason y se refirió a la lignina inicial en la madera control (22 %) considerando la pérdida de peso en cada caso.

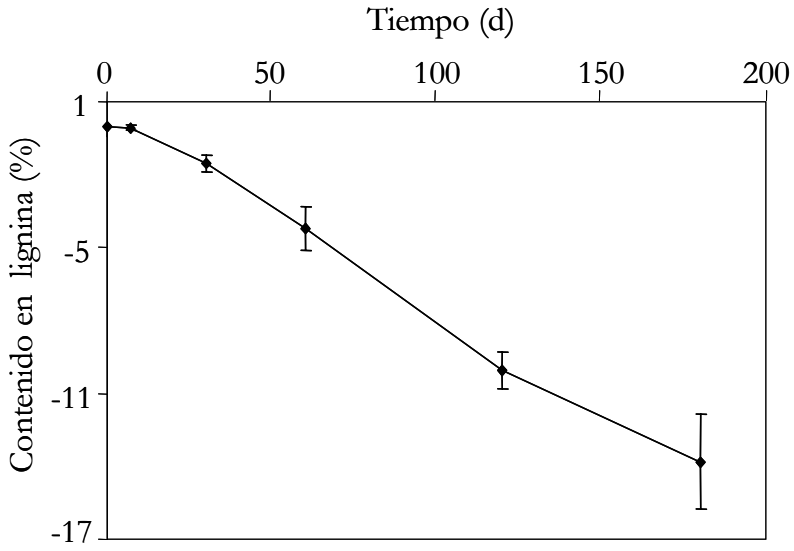

Figura 8. Degradación de lignina durante el tratamiento de la madera de *E. globulus* con *C. subvermispora,* en condiciones de SSF, expresada como porcentaje de la lignina Klason inicial (teniendo en cuenta la pérdida de peso). Medias e intervalos de confianza del 95%.

La disminución en el contenido de lignina comenzó a ser evidente a partir de los primeros 15 días continuando a lo largo de todo el cultivo, con una pérdida final del 14 %. La actividad ligninolítica más acentuada se produjo a partir de los 30 días, coincidiendo con la degradación prácticamente total de la fracción lipídica (Fig. 3) hasta los 120 días, para continuar de forma menos acentuada hasta el final del cultivo.

Paralelamente al análisis de la lignina Klason, se analizó la lignina ácido soluble. La Figura 9 muestra cómo ésta aumentó a lo largo del cultivo a medida que la lignina Klason iba disminuyendo. Esto sugiere que durante la degradación de lignina, ésta se modifica dando lugar a compuestos de menor peso molecular.

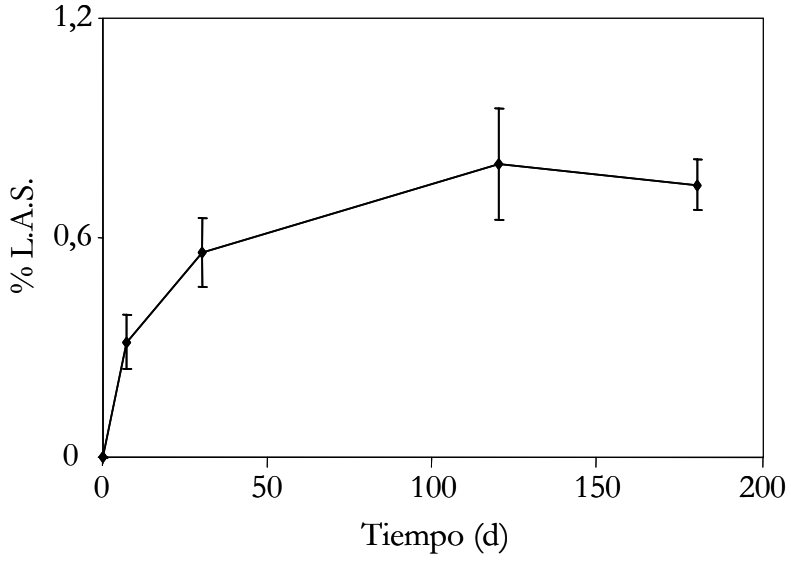

Figura 9. Solubilización de la lignina a lo largo del tiempo de cultivo medida como porcentaje de lignina ácido-soluble (L.A.S.). Medias e intervalos de confianza del 95%.

También se estudió la modificación de la fracción polisacarídica que, como se muestra en la Figura 10, no se vio prácticamente alterada. Durante la SSF, *C. subvermispora* degradó la fracción lipofílica y una parte de la lignina de la madera sin prácticamente alterar las fibras, cuya composición polisacarídica no sufrió variaciones significativas a lo largo del tiempo.

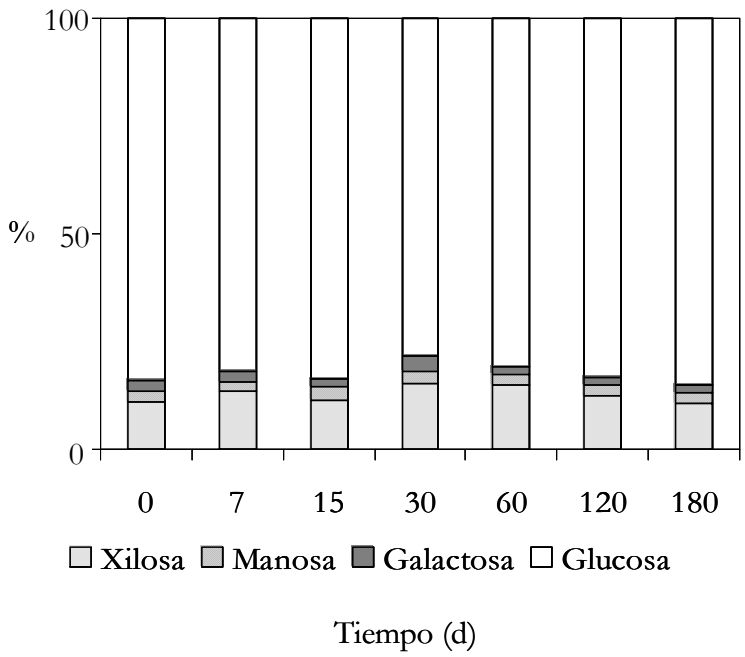

Figura 10. Composición de la fracción polisacarídica de la madera de *E. globulus* a lo largo del cultivo con *C. subvermispora* (SSF).

2.3.2 Evolución de las actividades enzimáticas a lo largo del cultivo de *C. subvermispora*

La Figura 11 muestra las actividades enzimáticas en los cultivos de *C. subvermispora* en condiciones de SSF. Tanto la actividad MnP como lacasa aparecieron desde los primeros momentos y aumentaron hasta los 30 días, disminuyendo posteriormente.

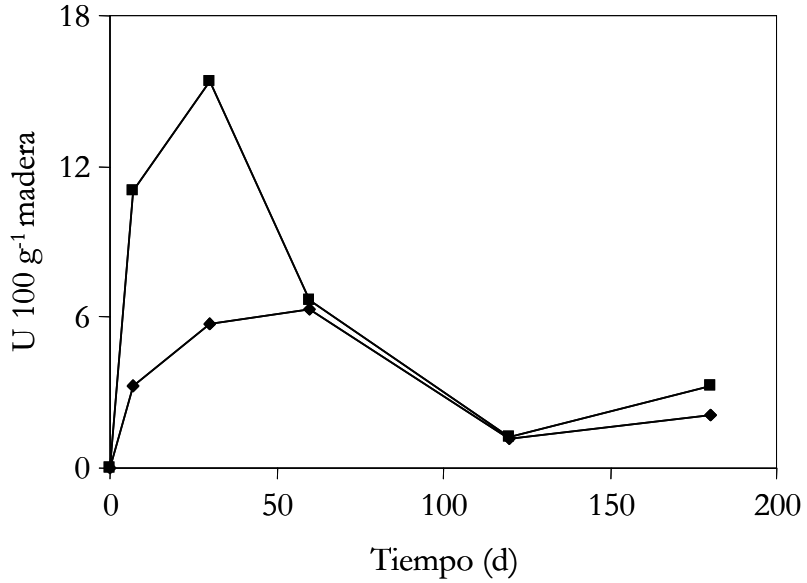

Figura 11. Actividades enzimáticas, MnP (■) y lacasa (♦) valoradas con DMP, en cultivos de *C. subvermispora* sobre madera de *E. globulus*.

2.3.3. Ensayos de peroxidación de lípidos

2.3.3.1 Reacciones de peroxidación en cultivos de *C. subvermispora*

Con el fin de intentar relacionar la producción de ácidos alquilitacónicos con la degradación de lignina, se investigó la existencia de reacciones de peroxidación en los cultivos de *C. subvermispora*, mediante el análisis de especies reactivas con el ácido tiobarbitúrico (TBARS). La Figura 12 muestra el perfil de producción de TBARS en el control de madera sin inocular y en las muestras tratadas con *C. subvermispora.*

El control presentó un nivel basal de TBARS debido a cierta peroxidación de los lípidos presentes en la madera. En las muestras tratadas con *C. subvermispora* existió un aumento progresivo de TBARS hasta los 120 días. Estos resultados sugieren la existencia de procesos de peroxidación de lípidos en los cultivos de *E. globulus* tratados con *C. subvermispora*. El aumento de TBARS fue paralelo a la síntesis y acumulación de ácidos alquilitacónicos (Fig. 5). Sin embargo, tanto el aumento de TBARS como el aumento de ácidos alquilitacónicos coincidieron con la disminución de las actividades enzimáticas (Fig. 11).

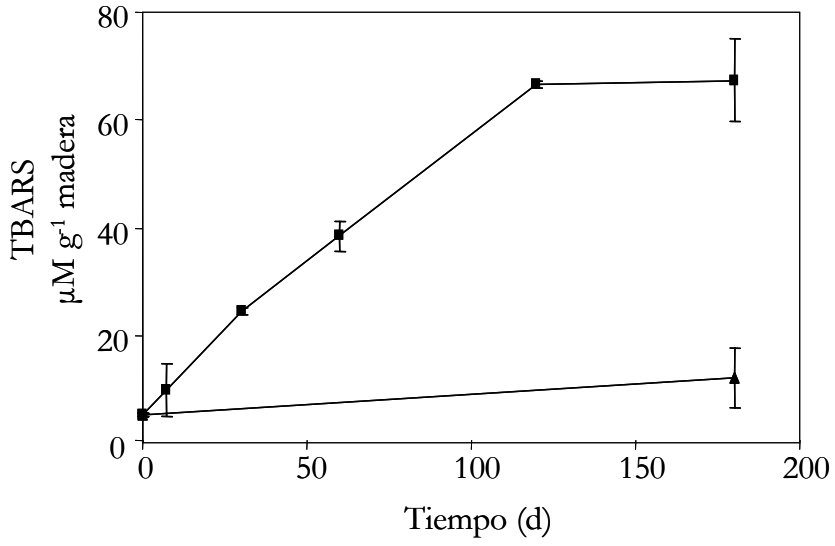

Figura 12. Medida de TBARS en la madera de *E. globulus* sin inocular (▲) y en la madera tratada con *C. subvermispora* (■). Medias e intervalos de confianza del 95%.

2.3.3.2. Estudios de peroxidación de los ácidos alquilitacónicos

Para estudiar la posible implicación de los ácidos alquilitacónicos en los procesos de peroxidación, se evaluó su capacidad para ser peroxidados. Se llevaron a cabo ensayos con los tres ácidos alquilitacónicos mayoritarios y ácido linoleico como control positivo, cuyos resultados se muestran en la Figura 13. Se utilizó VP como enzima desencadenante de la peroxidación en presencia de Mn^{2+}.

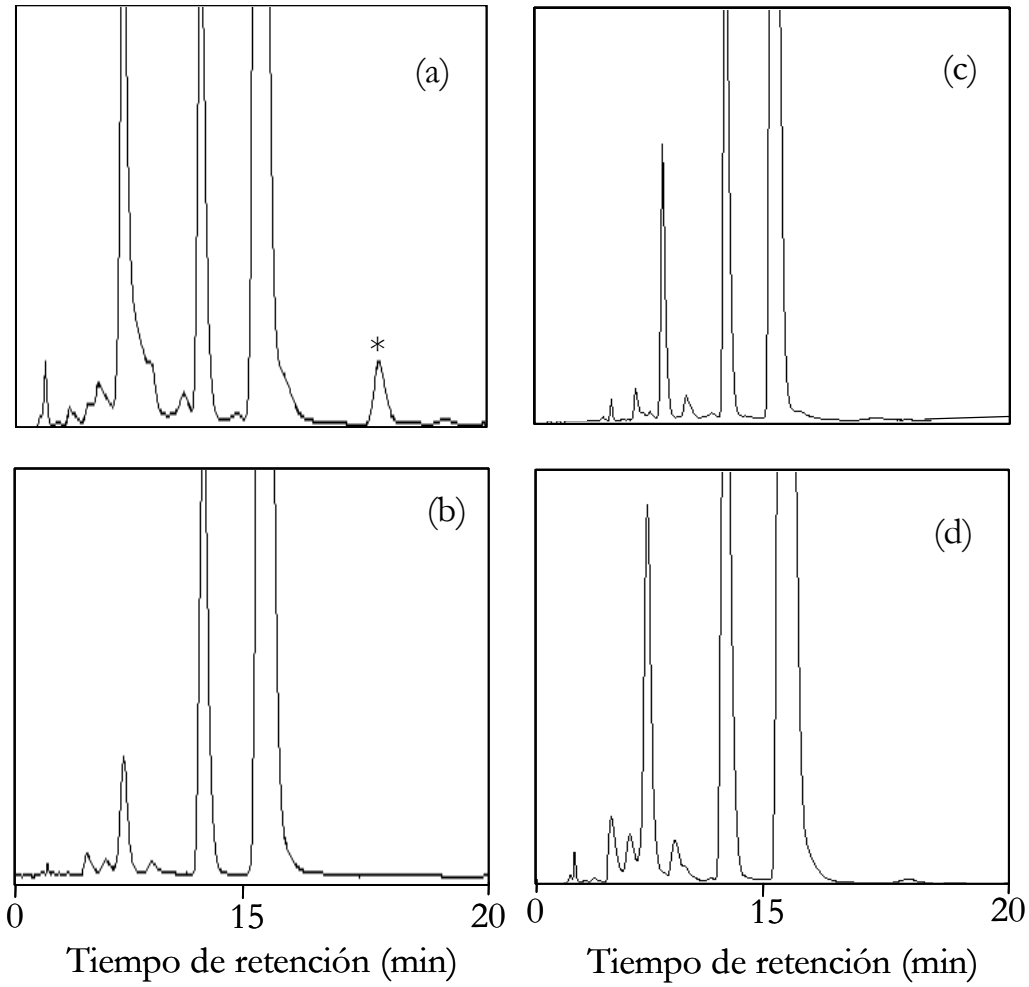

Figura 13. Perfiles cromatográficos en los que se muestran la producción del complejo hexanal-dinitrofenilhidrazona (*) a partir de los productos de la peroxidación de lípidos: a) control positivo con ácido linoleico, b) reacción con el ácido tetradecilitacónico, c) reacción con el ácido 7-hexadecenilitacónico y d) reacción con el ácido hexadecilitacónico.

Sólo en el caso del ácido linoleico se pudo observar la formación del complejo hexanal-dinitrofenilhidrazona, indicando que los ácidos alquilitacónicos, o bien no se peroxidan o bien no forman hexanal como producto de su peroxidación. Con el fin de investigar esta última posibilidad se realizaron las mismas reacciones pero esta vez se utilizó el ensayo de TBARS (Fig. 14). Éste mide la presencia de malondialdehído, pero también reacciona con otros aldehídos o productos de peroxidación. En este caso se evaluó la peroxidación de un extracto que contenía los tres ácidos alquilitacónicos mayoritarios y no la de cada uno de ellos en forma individual. Las mismas reacciones se llevaron a cabo con ácido oleico y ácido linoleico. En la reacción con los ácidos alquilitacónicos no se observó producción de TBARS, al igual que en el caso del ácido oleico, y a diferencia del ácido linoleico. Estos resultados parecen indicar que los ácidos alquilitacónicos no sufren peroxidaciones y que, de estar implicados en la degradación de la lignina, no lo hacen a través de procesos peroxidativos.

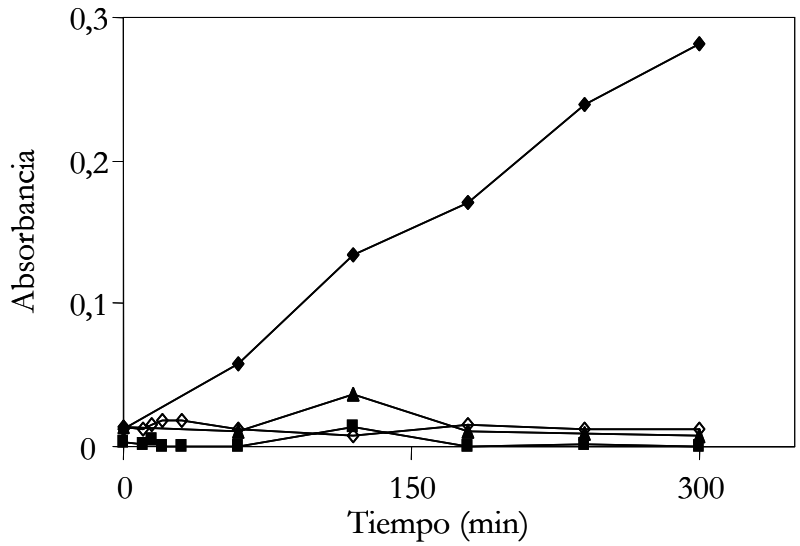

Figura 14. Medida de reacciones de peroxidación mediante producción de TBARS. Reacciones con ácido linoleico (♦), ácido oleico (■), los tres ácidos alquilitacónicos mayoritarios (◊) y control sin enzima (▲).

2.3.4 Ensayos de degradación de compuestos lipídicos

Para comprobar la posible influencia de los ácidos alquilitacónicos en la degradación de la fracción lipídica de la madera, se evaluó la capacidad de estos ácidos para actuar como mediadores de la VP y la lacasa. Las reacciones se llevaron a cabo con sitosterol al que se añadió una mezcla de los tres ácidos alquilitacónicos mayoritarios. Como control negativo se llevaron a cabo reacciones únicamente con sitosterol. En el caso de la lacasa se realizó un control positivo con sitosterol y HBT.

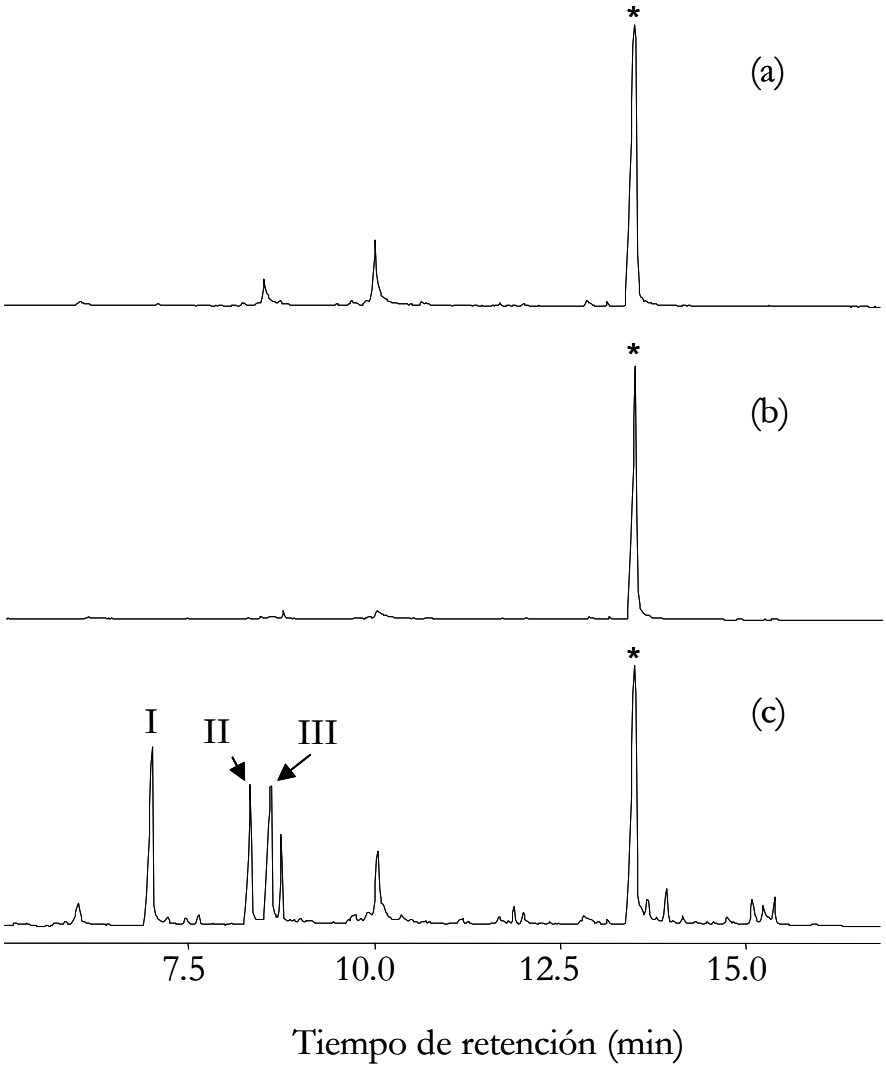

Figura 15. Cromatogramas de: a) control con sólo sitosterol (*), b) sitosterol (*) y VP, y c) sitosterol (*), VP y los 3 ácidos alquilitacónicos mayoritarios, tetradecilitacónico (I), 7-hexadecenilitacónico (II) y hexadecilitacónico (III).

Como se observa en las Figuras 15 y 16, los ácidos alquilitacónicos no participaron como mediadores en la degradación del sitosterol cuya concentración permaneció constante tras las reacciones enzimáticas. A su vez los ácidos alquilitacónicos no fueron ni degradados ni modificados por las enzimas, presentando tras la reacción la misma concentración y el mismo patrón de fragmentación en GC/MS que en el control.

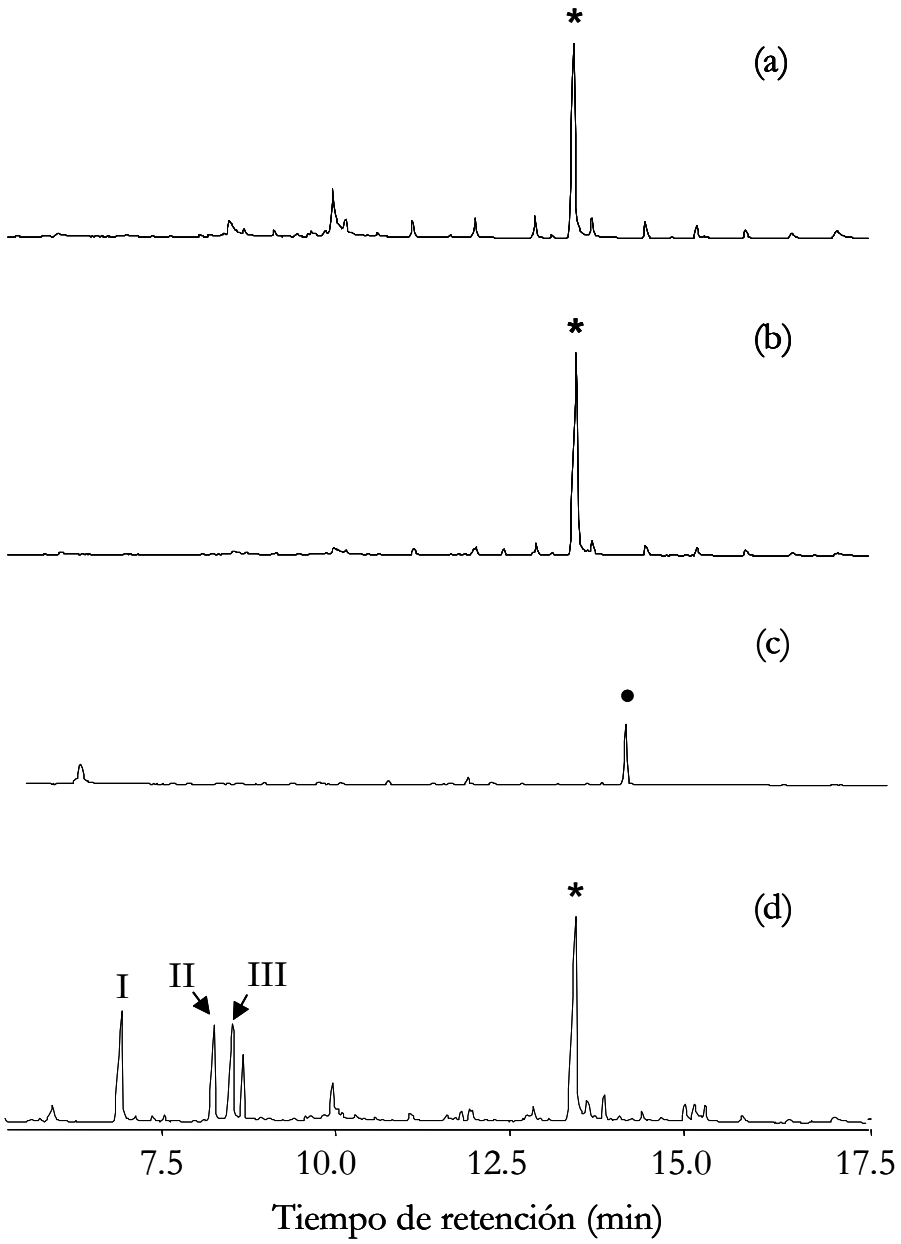

Figura 16. Cromatogramas de: a) control con sólo sitosterol (*), b) sitosterol (*) y lacasa, c) sitosterol (*), lacasa y HBT como mediador, y d) sitosterol (*), lacasa y los 3 ácidos alquilitacónicos mayoritarios, tetradecilitacónico (I), 7-hexadecenilitacónico (II) y hexadecilitacónico (III) (•, estigmasta-3,5-dien-7-ona).

Finalmente, para confirmar que los ácidos alquilitacónicos no reaccionaban con ninguno de los compuestos de la fracción lipofílica, se llevaron a cabo reacciones con VP/Mn^{2+} y lacasa sobre un extracto de madera de *E. globulus* tratada con *C. subvermispora* en el que coexistían ácidos alquilitacónicos y los principales lípidos de la madera. Los ácidos alquilitacónicos no contribuyeron a la degradación de los compuestos lipofílicos de la madera. Ninguno de éstos, incluyendo los mismos ácidos alquilitacónicos, presentó cambios ni en su concentración ni en el patrón de fragmentación en GC/MS tras el tratamiento enzimático (Fig. 17).

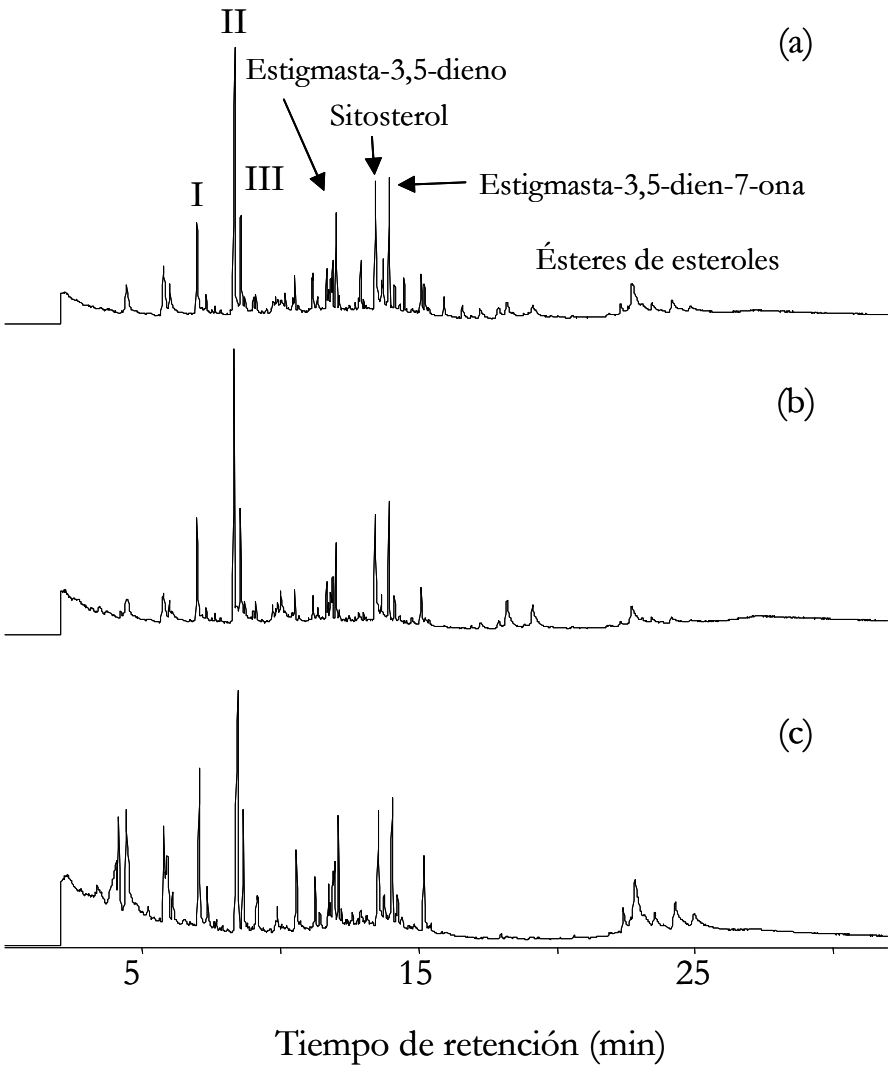

Figura 17. Cromatograma tras el tratamiento enzimático del extracto lipídico de la madera de *E. globulus* (previamente tratada con *C. subvermispora* en condiciones de SSF): a) extracto control conteniendo ácidos tetradecilitacónico (I), 7-hexadecenilitacónico (II) y hexadecilitacónico (III), b) extracto tratado con VP/Mn^{2+} y c) extracto tratado con lacasa.

2.3.5 Ensayos de degradación de un dímero modelo de lignina

Los ensayos de degradación se llevaron a cabo con el dímero modelo arilglicerol-β-aril éter y MnP/Mn^{2+}. Como control positivo se realizó una reacción con Tween 80, que aporta ácidos grasos insaturados peroxidables. La MnP, a través del Mn^{3+}, peroxida al Tween 80, generándose radicales libres. Estos radicales oxidan el dímero de lignina dando lugar mayoritariamente a su cetona (Fig. 18), junto a compuestos minoritarios que probablemente incluyan el 4-etoxi-3-metoxibenzaldehído y el ácido 4-etoxi-3-metoxibenzoico. Se evaluó por un lado el posible efecto directo del ácido tetradecilitacónico en la oxidación del dímero y por otro el efecto indirecto del ácido tetradecilitacónico en la oxidación del dímero durante la peroxidación del Tween 80. Esta última reacción contenía ácido tetradecilitacónico y Tween 80.

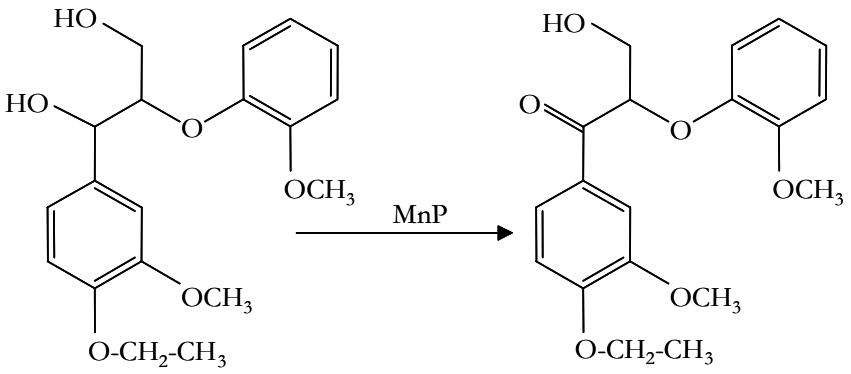

Figura 18. Reacción de oxidación del dímero arilglicerol-β-aril éter.

En el control positivo con Tween 80 se observó la oxidación del dímero, siendo su cetona el compuesto mayoritario (Figs. 19a y 20a). Por el contrario, en la reacción que contenía únicamente ácido tetradecilitacónico no se observó ningún efecto sobre el dímero (Fig. 19b). En la reacción con Tween 80 y ácido tetradecilitacónico se observó entre el 25-50 % de inhibición en la producción de la cetona y otros compuestos minoritarios por la presencia de ácidos alquilitacónicos (Fig. 20b).

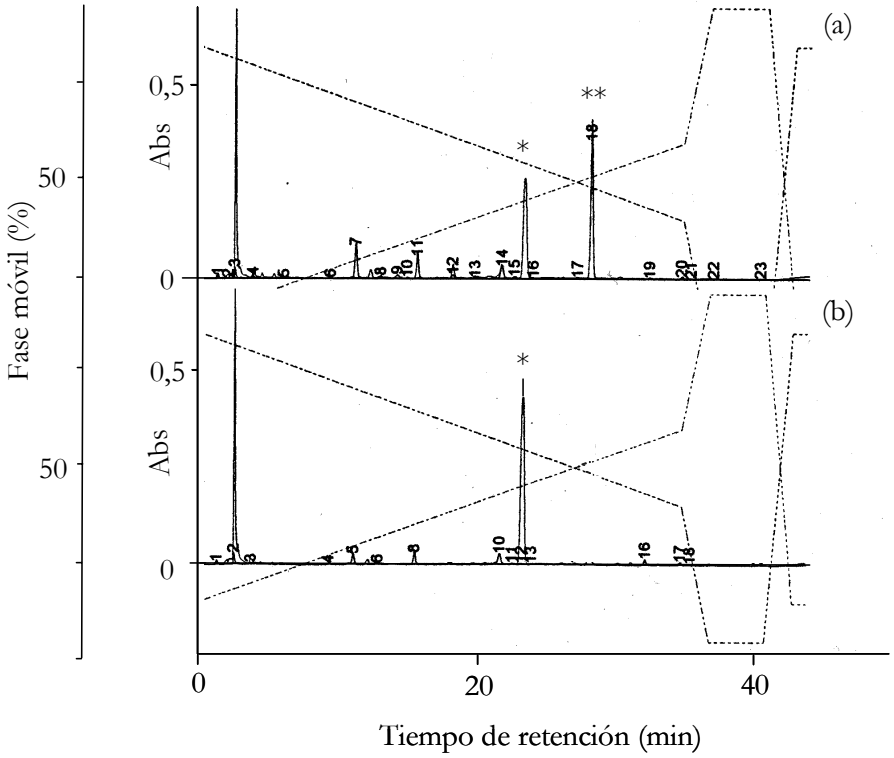

Figura 19. HPLC tras las reacciones del dímero arilglicerol-β-aril éter (*) con MnP/Mn^{2+}: a) con Tween 80; y b) con ácido tetradecilitacónico (**, cetona del dímero).

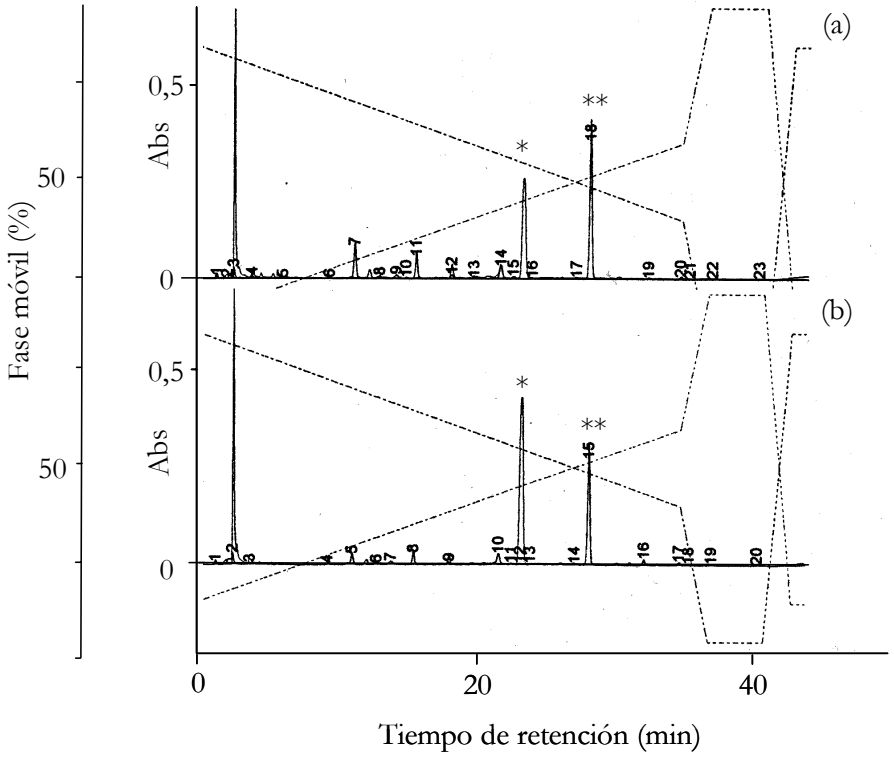

Figura 20. HPLC tras las reacciones del dímero arilglicerol-β-aril éter (*) con MnP/Mn^{2+}: a) con Tween 80; b) con Tween 80 y ácido tetradecilitacónico (**, cetona del dímero).

3. DISCUSIÓN

Durante el tratamiento de la madera de eucalipto (*E. globulus*) con el hongo de podredumbre blanca *C. subvermispora* se produjo la degradación de la fracción lipofílica del sustrato y la síntesis de nuevos lípidos por el hongo, como pusieron de manifiesto los análisis de GC/MS. La fracción lipofílica de la madera de *E. globulus* se compone de: i) sitosterol y otros esteroles minoritarios (como estigmastanol, citrostadienol, fucosterol, cicloartenol y 24-metilencicloartanol), bien libres o esterificados con ácidos grasos saturados o insaturados; ii) ácidos grasos libres tanto saturados como insaturados, principalmente ácidos oleico, linoleico, palmítico y en menor cantidad esteárico; iii) diferentes hidrocarburos esteroidales como el estigmasta-3,5-dieno y cetonas esteroidales como estigmastan-3-ona, estigmast-4-en-3-ona, estigmasta-3,5-dien-7-ona, estigmast-4-en-3,6-diona y estigmasta-3,6-diona; y iv) escualeno (Gutiérrez *et al.*, 1999a). En la madera degradada también se detectó ergosterol, principalmente en forma esterificada. El ergosterol es un constituyente característico de las membranas celulares de los hongos (Gao *et al.*, 1993) y fue utilizado para estimar la biomasa fúngica durante el tratamiento de la madera de eucalipto. Los análisis de biomasa indicaron que la presencia de *C. subvermispora* se mantiene tras la fase de colonización.

Durante el tratamiento de la madera se observó un incremento inicial de los ácidos grasos insaturados (probablemente debido a la hidrólisis de los ésteres de esteroles) que fueron posteriormente degradados o utilizados en rutas de síntesis. Un segundo grupo de compuestos lipídicos, que aumentaron durante las fases intermedias de degradación, fueron las cetonas esteroidales. Estos productos de oxidación de los esteroles pueden ser intermediarios en las rutas de biodegradación, tal como se discute en el Capítulo 2. El alto porcentaje de eliminación de esteroles por *C. subvermispora* constituye una interesante característica de este basidiomiceto frente a los inóculos comerciales disponibles para el control del "pitch" que se basan en ascomicetos, incapaces de degradar los esteroles (Gutiérrez *et al.*, 1999b). Paralelamente a la degradación de la fracción lipídica de la madera, *C. subvermispora* sintetizó una serie de ácidos alquilitacónicos que, en los últimos estadios de degradación, llegaron a ser los lípidos mayoritarios. Inicialmente se consideró que los nuevos lípidos podían proceder de la degradación de la fracción lipofílica de la madera ya que se acumulaban cuando ésta era degradada. Sin embargo, una vez

determinada su estructura química (tal como se describe en el Capítulo 3) se encontró que eran nuevos compuestos derivados de la actividad biosintética fúngica.

Respecto a la posible función de los ácidos alquilitacónicos en la biodegradación de la madera, la primera hipótesis fue que pudiesen actuar como fuente de radicales lipídicos en reacciones de peroxidación (del Río *et al.*, 2002; Gutiérrez *et al.*, 2002). Estos radicales libres, que se forman a partir de lípidos insaturados mediante reacciones químicas o enzimáticas, son fuertes oxidantes capaces de degradar dímeros modelo de lignina (de tipo no fenólico) y otros compuestos aromáticos recalcitrantes (Moen y Hammel, 1994; Bao *et al.*, 1994; Bogan *et al.*, 1996; Kapich *et al.*, 1999b). Junto con la existencia de una/dos insaturaciones, la presencia de grupos carboxílicos libres en los ácidos alquilitacónicos podría también contribuir a su peroxidación iniciada por Mn^{3+} según algunos autores (Watanabe *et al.*, 2000). La presencia de TBARS (Esterbauer y Cheeseman, 1990; Kikugawa *et al.*, 1992), una característica de los últimos estadios de transformación de la madera de eucalipto por *C. subvermispora*, sugería la existencia de procesos de peroxidación de lípidos. Además de por lipoxigenasas, la peroxidación de lípidos puede ser también iniciada por el Mn^{3+} (producido por la MnP o la VP) (Moen y Hammel, 1994; Bao *et al.*, 1994) y por la lacasa en presencia de mediadores redox (Bohmer *et al.*, 1998; Srebotnik y Boisson, 2005). Los radicales formados son capaces de oxidar otras moléculas de lípidos, propagándose de esta manera la reacción de degradación. En este sentido, existen estudios que explican la degradación de la lignina por *C. subvermispora* mediante reacciones de peroxidación en las que estaría implicada la MnP (Bao *et al.*, 1994; Jensen *et al.*, 1996; Srebotnik *et al.*, 1997). El aumento de TBARS en los cultivos de este hongo sobre madera de eucalipto fue paralelo al aumento de ácidos alquilitacónicos, lo que apoyaba que estos compuestos pudieran estar implicados en las reacciones de peroxidación junto con el ácido oleico, linoleico y otros ácidos grasos insaturados.

Con objeto de investigar esta hipótesis y la posible implicación de los ácidos alquilitacónicos en la degradación de lignina y/o de los lípidos recalcitrantes se evaluó la capacidad de estos ácidos para ser peroxidados. Estos estudios revelaron que, en principio, los ácidos alquilitacónicos no son peroxidados por la MnP, ya que no se observó la presencia de hexanal ni de TBARS. El ácido 7-hexadecenilitacónico presenta una insaturación en su cadena alquílica, al igual que el ácido oleico, y con ninguno de ellos

se observó producción de TBARS. Por el contrario, el ácido linoleico (con dos insaturaciones) sí se peroxidó. Esto indica que la insaturación en la cadena alquílica del ácido 7-hexadecenilitacónico, más la del grupo metileno de la porción itacónica, no son suficientes para que tenga lugar la peroxidación en las condiciones utilizadas.

Ante la eventualidad de que los productos de peroxidación u otras modificaciones enzimáticas de los ácidos alquilitacónicos no fuesen detectables en las reacciones anteriores (formación de TBARS y hexanal) se investigó directamente el efecto de los ácidos alquilitacónicos en la degradación enzimática (por lacasa y VP o MnP) de lípidos modelo o compuestos modelo de lignina. Los resultados obtenidos utilizando sitosterol y una mezcla de lípidos permitieron concluir que los ácidos alquilitacónicos no participan en la degradación de la fracción lipídica de la madera de *E. globulus*, ya que en su presencia ni la lacasa ni la VP degradaron ni modificaron ninguno de los compuestos del extracto lipídico de la madera. Su posible efecto en presencia de lacasa y mediador no pudo ser evaluado ya que este sistema degrada directamente los lípidos de la madera de eucalipto, tal como se ha demostrado recientemente (Gutiérrez *et al.*, 2006b).

Durante el tratamiento de la madera de eucalipto con *C. subvermispora* se observó una degradación continua de la lignina. Como se ha dicho anteriormente, *C. subvermispora* carece de las enzimas necesarias (VP o LiP) para el ataque directo a las unidades no fenólicas (que son mayoría en la lignina) aunque produce MnP y lacasa tal como se ha visto en el presente estudio y descrito por otros autores (Rüttimann *et al.*, 1992). Sin embargo, estas dos últimas enzimas no son capaces de degradar las unidades no fenólicas de forma directa (Kawai *et al.*, 1987a; 1987b; Périé y Gold, 1991). Para explicar el mecanismo de degradación de la lignina por *C. subvermispora*, y dado que los ácidos alquilitacónicos continúan su síntesis a lo largo de todo el cultivo, se estudió la influencia de los mismos en la degradación de la lignina. Con este fin se llevaron a cabo reacciones con un dímero no fenólico (arilglicerol-β-aril éter), MnP y ácido tetradecilitacónico. Los resultados obtenidos mostraron que la MnP en presencia del ácido alquilitacónico no degrada ni modifica el dímero de lignina. Se puede concluir que los ácidos alquilitacónicos no están implicados en la degradación de lignina, al menos en las condiciones en las que se realizaron los experimentos. Otros lípidos insaturados pueden participar en estas reacciones, siendo los responsables de los niveles de

TBARS observados en los cultivos de *C. subvermispora* sobre madera de eucalipto.

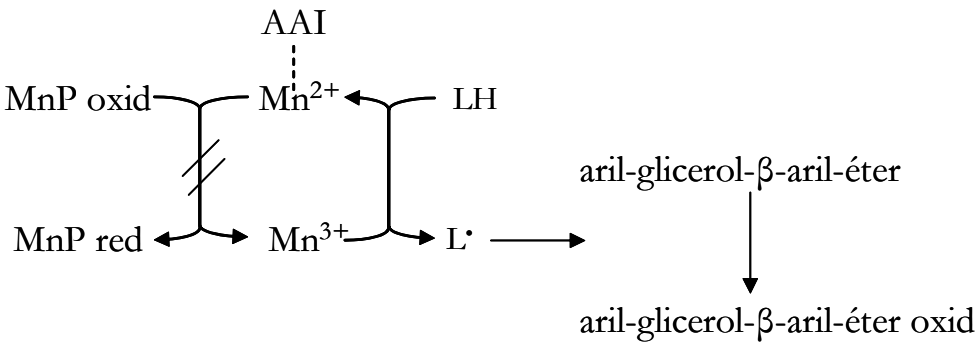

Figura 21. Oxidación del dímero arilglicerol-β-aril éter por la MnP, a través de Mn^{3+} y radicales de lípidos (L·), y posible inhibición de esta reacción por el ácido tetradecilitacónico (AAI).

Por el contrario, en la reacción de oxidación del dímero modelo de lignina por la MnP en presencia de Tween 80, como fuente de lípidos peroxidables, se observó que la adición de ácido tetradecilitacónico producía una inhibición respecto a la reacción llevada a cabo en su ausencia. La explicación más probable de esta inhibición es que el ácido tetradecilitacónico, con sus dos grupos carboxilo, actúe como quelante del manganeso impidiendo la iniciación de la peroxidación del Tween 80. El Mn^{3+} formado por la MnP o la VP presenta un alto potencial redox (1,54 V) pero es inestable en medio acuoso. Para que pueda actuar como oxidante es necesario que se una a quelantes suaves. Los hongos de podredumbre blanca secretan ácido oxálico y otros ácidos orgánicos que forman quelatos con el Mn^{3+}. Estos compuestos actúan estabilizando el Mn^{3+} o favoreciendo su disociación del centro activo de la enzima (Wariishi *et al.*, 1992; Kuan y Tien, 1993). Sin embargo, existen quelantes fuertes que además de unirse al Mn^{3+} lo hacen también al Mn^{2+}, impidiendo de este modo que se una al centro activo de la enzima (Zapanta y Tien, 1997). El ácido tetradecilitacónico actuaría como un quelante fuerte del Mn^{2+}. De esta forma se impediría su oxidación y por tanto la producción de radicales para la oxidación del dímero (Fig. 21).

Durante el tratamiento de la madera, *C. subvermispora* degradó la lignina sin atacar significativamente a la celulosa. Este patrón corresponde a lo

que se ha descrito como degradación selectiva, que generalmente da como resultado la separación de las fibras de la madera y obtención de un material rico en celulosa con características semejantes a la pasta de papel (Otjen y Blanchette, 1986; Barrasa *et al.*, 1992). Estos resultados coinciden con lo descrito para la degradación de otras maderas por este basidiomiceto, que ha sido seleccionado para estudios de *biopulping* (Blanchette *et al.*, 1992) y posteriormente evaluado a nivel piloto en la obtención de pastas bio-mecánicas y también bio-químicas (Young y Akhtar, 1998; Idarraga *et al.*, 2001; Bajpai *et al.*, 2001; Mendonca *et al.*, 2004).

Se han realizado diferentes intentos para explicar la degradación selectiva de la lignina por algunos basidiomicetos de podredumbre blanca, como *Ganoderma australe* (Martínez *et al.*, 1995), *Pleurotus eryngii* (Martínez *et al.*, 1994) y *C. subvermispora* (Bao *et al.*, 1994), y las explicaciones aportadas son diversas. Éstas incluyen la producción de bajos niveles de celulasas por el hongo, la composición de la lignina (abundancia de unidades siringilo) o las características anatómicas (presencia de gruesas paredes secundarias) de ciertas maderas, las condiciones ambientales de humedad y temperatura, etc. Tal como se ha mencionado anteriormente, en *C. subvermispora* la degradación de la lignina se ha asociado a la producción de oxidantes químicos (radicales libres) y lo mismo se ha propuesto para *P. eryngii*. Una diferencia entre ambos es que el primero produce radicales de oxígeno (y en particular radical hidroxilo) (Guillén *et al.*, 2000) utilizando un sistema de producción continua de H_2O_2 (Gutiérrez *et al.*, 1994; Guillén y Evans, 1994), mientras que en el segundo se ha propuesto que son radicales de lípidos (tipo peroxilo o alcoxilo) los que participan en la degradación de la lignina (Bao *et al.*, 1994). Ambos tipos de radicales son oxidantes fuertes y no se ha descrito que uno sea más selectivo que otro en su ataque a la lignina o la celulosa. Es más, el radical hidroxilo es producido por hongos de podredumbre parda, en los que se supone desempeña un papel central en el inicio del ataque a la celulosa, a través de un mecanismo (Kerem *et al.*, 1999) similar al descrito previamente por Guillén *et al.* (1997) para los de podredumbre blanca.

Se ha sugerido que serían los ácidos alquilitacónicos los responsables de la degradación selectiva de la lignina por *C. subvermispora* (Watanabe *et al.*, 2002). Estos autores sugieren que los ácidos alquilitacónicos inhibirían la producción de radical hidroxilo por el hongo y, de esta forma, evitarían el ataque a la celulosa. El radical hidroxilo se genera a través de la reacción

de Fenton, en la que el Fe^{2+} reacciona con H_2O_2 dando lugar a Fe^{3+} y radical hidroxilo. Para que la producción de radical sea continua es necesaria la reducción del Fe^{3+}. Durante la degradación de lignina los hongos producen compuestos capaces de reducirlo, entre los que se encuentra el $CO_2^{\bullet}$ (Zapanta y Tien, 1997; Hofrichter *et al.*, 1998), el anión superóxido procedente de reacciones de *redox-cycling* de quinonas derivadas de la lignina, o las mismas semiquinonas formadas en estas reacciones (Gómez-Toribio *et al.*, 2001). Watanabe y colaboradores (Watanabe *et al.*, 2002; Enoki *et al.*, 2002) sugieren que los ácidos alquilitacónicos mediante sus dos grupos carboxilo establecerían enlaces de coordinación covalente (quelación) con el Fe^{3+}, inhibiendo su reducción y por tanto la producción del radical hidroxilo.

Sin embargo, esta última hipótesis se basa exclusivamente en resultados obtenidos *in vitro* y entra en conflicto con varios resultados obtenidos en el presente estudio. Tal como se describe en el Capítulo 3, entre los basidiomicetos que producen ácidos alquilitacónicos (y compuestos relacionados), existen hongos de podredumbre parda (como *Postia placenta y Laetiporus sulphureus*) que degradan extensivamente la celulosa. Por otro lado, la inhibición de la degradación del dímero modelo de lignina al añadir ácidos alquilitacónicos a la reacción catalizada por MnP/Mn^{2+} y Tween 80 indica que, además de poder inhibir la degradación de la celulosa, los ácidos alquilitacónicos inhiben también la degradación de lignina. La inhibición de la degradación de ambos polímeros se produciría por mecanismos semejantes, la quelación de iones metálicos (Fe^{2+} o Mn^{2+}) por estos ácidos dicarboxílicos. Ambos hechos ponen en duda la implicación específica de los ácidos alquilitacónicos en la protección de la celulosa frente al ataque radicalario. Los estudios realizados sugieren que los ácidos alquilitacónicos bien cumplen alguna función aun por establecer en la degradación de la madera por *C. subvermispora* o bien son un producto sin una función específica dentro de su metabolismo secundario.

Capítulo 5

Material y métodos

Resumen. En este Capítulo se describen las metodologías utilizadas en la presente Tesis que incluyen el cultivo de los hongos, y las técnicas analíticas empleadas para la caracterización química de los componentes de la madera durante la degradación fúngica de la misma y la caracterización de los metabolitos presentes en dichos cultivos.

1. ORIGEN Y MANTENIMIENTO DE CEPAS

En este trabajo se utilizaron 18 cepas fúngicas pertenecientes a las divisiones Basidiomicota y Deuteromicota, procedentes de las colecciones de cultivos del Centro de Investigaciones Biológicas (IJMF), del Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) y de la American Type Culture Collection (ATCC). Su origen, identificación y posición taxonómica se recogen en la Tabla 1.

Los hongos se conservaron a 4 ºC en agar-malta con cloranfenicol (12 μg/mL), dieldrin (40 μg/mL), y benomilo (3 mg/mL). Los dos primeros compuestos impiden el crecimiento de bacterias y ácaros respectivamente, mientras que el benomilo restringe el crecimiento de los hongos ascomicetos.

2. MEDIOS DE CULTIVO

A continuación se describen los diferentes medios de cultivo empleados, tanto sólidos como líquidos.

2.1. Medios de cultivo para basidiomicetos

2.1.1. Medio sólido

Se utilizó el medio agar-malta, que contenía, por litro de agua destilada, 12,5 g de extracto de malta y 15 g de agar. El pH se ajustó a 5,5 con KOH 2 M. La composición del extracto de malta incluye: 9,5 % de proteína, un porcentaje de H_2O menor de un 3,5 % y un porcentaje de cenizas inferior a un 2 %. El medio se esterilizó por calor húmedo a 121 ºC durante 20 min.

Este medio se utilizó para la conservación de las cepas en tubos inclinados, así como para la preparación de inóculos en placas de Petri.

2.1.2. Medio líquido

El medio líquido utilizado contenía, por litro de agua destilada: 20 g de glucosa, 5 g de peptona, 2 g de extracto de levadura, 1 g de KH_3PO_4, y 0,5 g de $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$. El pH se ajustó a 5,5 con HCl 10 M. El medio se esterilizó por calor húmedo a 110 ºC durante 30 min (Kimura *et al.*, 1991).

Tabla 1. Relación de cepas fúngicas utilizadas en este trabajo.

	Familia	**Cepas (IJFM)**
Basidiomicota		
Bjerkandera adusta[1]	Coriolaceae	A660 (CBS 507.85)
Ceriporiopsis subvermispora[1]	Coriolaceae	A661 (CBS 347.63)
Coniophora olivacea[2]	Coriophoraceae	A664 (CBS 709.85)
Coniophora puteana[2]	Coriophoraceae	A676
Fomitopsis palustris[2]	Coriolaceae	A783
Ganoderma australe[1]	Ganodermataceae	A130
Gleophyllum trabeum[2]	Coriolaceae	A780
Laetiporus sulfureus[2]	Coriolaceae	A663 (CBS 816.88)
Lentinus degener[2]	Lentinaceae	A564 (CBS 244.39)
Neolentinus lepidens[2]	Lentinaceae	A782
Phanerochaete chrysosporium[1]	Coriolaceae	A547 (ATCC 24725)
Phlebia radiata[1]	Merulinaceae	A588 (CBS 184.83)
Pleurotus eryngii[1]	Lentinaceae	A169 (CBS 613.91)
Pleurotus pulmonarius[1]	Lentinaceae	A578
Postia placenta[2]	Coriolaceae	A781
Trametes versicolor[1]	Coriolaceae	A136
Deuteromicota		
Chaetomella acutiseta		A777 (ATCC 42868)
Chaetomella acutiseta		A779 (ATCC 74113)

2.2. Medios de cultivo para deuteromicetos

2.2.1. Medio sólido

Se utilizó el medio agar-malta-extracto de levadura, que contenía, por litro de agua destilada, 10 g de extracto de malta, 20 g de extracto de levadura y 20 g de agar. Se esterilizó por calor húmedo durante 20 min a

[1] Hongos de podredumbre blanca (*white-rot fungi*)
[2] Hongos de podredumbre parda (*brown-rot fungi*)

121 ºC. Este medio se utilizó para la conservación de las cepas en tubos inclinados así como para la preparación de inóculos en placas de Petri.

2.2.2. Medio líquido

El medio líquido utilizado contenía, por litro de agua destilada, 5 g de *corn steep liquor*, 40 g de zumo de tomate, 10 g de harina de avena, 10 g de glucosa y 10 mL de elementos traza[3]. El pH se ajustó a 6,8 con NaOH 10 M y se esterilizó por calor húmedo a 121 ºC durante 20 min.

3. FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO (SSF)

Su finalidad es la de asemejar en el laboratorio las condiciones de los procesos degradativos que suceden en los ecosistemas terrestres. Para ello, los microorganismos se cultivan sobre un sustrato sólido donde el contenido líquido no supera la capacidad de retención del mismo, pero asegura la actividad de agua necesaria para su crecimiento y metabolismo celular.

3.1. Fermentación en estado sólido para basidiomicetos

3.1.1. Medio de cultivo

El medio sólido utilizado para la SSF de basidiomicetos, tanto para los estudios de degradación de la madera *in vitro* como para la producción de diferentes compuestos, estaba constituido por astillas de madera de *E. globulus* de 14 años, suministradas por el grupo empresarial ENCE. Toda la madera utilizada pertenecía al mismo lote y se conservó hasta su utilización a -20 ºC. La madera se molió primero en un molino Sprout-Waldron, y, a continuación, en un molino Retsch y, posteriormente, se pasó por un tamiz de 40 mesh para obtener un tamaño de astilla de unos 1-2 x 10-20 mm. Una vez molida y tamizada, se añadió agua destilada en una relación 2:1 (agua: madera), se esterilizó a 120 ºC durante 20 min y se mantuvo dentro del autoclave hasta su enfriamiento, para evitar pérdidas de humedad. La

[3] Composición de elementos traza para un litro de solución en HCl 0,6 M: 1 g de $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 1 g de $MnSO_4 \cdot 4\ H_2O$, 0,025 g de $Cl_2Cu \cdot 2\ H_2O$, 0,1 g de $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$, 0,056 g de H_3BO_3, 0,019 g de $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4\ H_2O$, 0,2 g de $ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$.

humedad de la madera tras el proceso de esterilización fue de un 50-60 %, calculado como la diferencia de peso entre la madera antes y después del proceso de esterilización.

Los experimentos se realizaron en botellas Roux de 5 L, y en matraces Erlenmeyer de diferentes volúmenes, en los experimentos de menor escala. En todos los casos la cantidad de madera utilizada fue de 0,22 g de madera (peso seco) por cm^2 de superficie del matraz.

3.1.2. Obtención del inóculo

Para obtener el preinóculo, se tomó un disco de 0,5 cm de diámetro a partir de las cepas crecidas en placa con medio sólido, con el que se inocularon matraces Erlenmeyer de 1 L con 200 mL de medio Kimura. Los preinóculos se incubaron a 28 ºC de 4 a 5 días con una agitación de 170 rpm. Una vez crecido, el preinóculo se homogeneizó en un triturador Sorvall Omni-mixer (modelo AC50/60 CY) durante 30 s a velocidad mínima.

Para obtener el inóculo, se inocularon matraces Erlenmeyer de 1 L, que contenían 200 mL de medio Kimura, con 5 mL del homogeneizado. El inóculo se incubó 4 días a 28 ºC con una agitación de 170 rpm.

Antes de sembrar la madera, el inóculo de la cepa correspondiente se lavó con agua destilada estéril para eliminar los restos de medio Kimura y se resuspendió en 25 mL de agua destilada estéril.

3.1.3. Condiciones de cultivo

La madera se sembró con 0,75 mL de inóculo por gramo de madera (peso seco), lo que suponía unos 6 mg de micelio por gramo de madera (peso seco). Los cultivos se incubaron a 28 ºC durante un tiempo variable según los diferentes ensayos. Se tomaron muestras a diferentes tiempos, con controles sin inocular a tiempo cero y al término del proceso fermentativo. El porcentaje de masa fúngica fue medido a partir del porcentaje de ergosterol libre y esterificado, tomando como referencia el contenido de ergosterol total en un inóculo de *P. chrysosporium* (0,4 mg por gramo de micelio) (Davis y Lamar, 1992).

3.2. Escalado en fermentador

Para optimizar la producción de nuevos compuestos, se procedió al escalado de las botellas Roux de 5 L a un fermentador rotatorio compuesto por 6 botellas de 2 L cada una, que se disponían de forma horizontal y paralelas al eje de giro.

3.2.1. Medio de cultivo

Cada botella contenía 200 g de astillas de *E. globulus* (peso seco), obtenidas como se describe en el apartado 3.1.1.

3.2.2. Obtención del inóculo

El inóculo se obtuvo según se describe en el apartado 3.1.2.

3.2.3. Condiciones de cultivo

Las botellas se inocularon con 200 mL de inóculo y se incubaron a 28 ºC durante un tiempo variable, según los ensayos. Como control se utilizó una botella sin inocular. Con el fin de mantener la proporción de humedad inicial entre un 50 % y 60 %, la aireación se llevó a cabo con aire húmedo a un flujo de 160 mL/min en cada botella, controlándose de forma individual por válvulas a la entrada de cada una de ellas. Tanto la entrada como salida del aire se realizaban en condiciones de esterilidad a través de filtros de 0,22 μm de diámetro de poro.

3.3. Fermentación en estado sólido para deuteromicetos

En el caso de las cepas de *C. acutiseta*, la fermentación se llevó a cabo en un medio de arroz, ya que estos microorganismos no son capaces de crecer sobre sustratos lignocelulósicos.

3.3.1. Medio de cultivo

La fermentación con deuteromicetos se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 100 mL. El medio utilizado contenía, por matraz: 5 g de arroz integral; 0,01 g de KH_2PO_4; 0,01 g de tartrato sódico; 15 mL de agua

destilada; y 0,02 g de extracto de levadura disueltos en 20 mL de agua destilada. El medio se esterilizó a 121 ºC durante 20 min.

3.3.2. Obtención del inóculo

Se tomó un disco de 0,5 cm de diámetro a partir de la cepa crecida en el medio sólido (apartado 2.2.1), con el que se inocularon matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 50 mL del medio líquido descrito en el apartado 2.2.2. El inóculo se mantuvo 72 h a 25 ºC, con una agitación de 220 rpm.

3.3.3. Condiciones de cultivo

El medio de arroz se sembró con 2 mL de inóculo. La fermentación se realizó por triplicado, manteniéndose durante 15 días a 25 ºC sin agitación, con dos controles sin inocular, uno a tiempo cero y el otro al final del proceso (Lingham *et al.*, 1993).

3.3.4. Obtención del extracto lipídico de cultivos de deuteromicetos

Una vez finalizada la fermentación, el contenido de cada matraz se extrajo con 150 mL de metiletilcetona durante 20 min, a temperatura ambiente y con una agitación de 120 rpm (Singh *et al.*, 1993). El extracto se filtró a través de un filtro de nailon de 45 μm de diámetro de poro, los restos de humedad se eliminaron añadiendo Na_2SO_4 anhidro y, posteriormente, el extracto se llevó a sequedad con nitrógeno. El análisis se realizó por GC/MS, como se describe en los apartados 6.4.1 y 6.5.

4. DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS

4.1. Obtención del crudo enzimático

Una vez finalizada la fermentación, las muestras de madera se extrajeron con tampón tartrato 100 mM, pH 5,5, durante 4 h, con una agitación de 160 rpm y a temperatura ambiente. Una vez finalizada la extracción, las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm durante 3 min a 4 ºC, descartándose el precipitado. El sobrenadante se utilizó para valorar espectrofotométricamente las diferentes actividades enzimáticas, utilizando

un espectofotómetro Shimadzu UV-160, realizándose todos los ensayos a temperatura ambiente. Una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria para obtener 1 μmol de producto en un minuto.

4.2. Actividad manganeso peroxidasa (MnP)

Se determinó de dos formas diferentes, por la oxidación de Mn^{2+} y por la transformación de 2,6-DMP, en ambos, en tampón tartrato sódico 100 mM, pH 5,5 (Martínez *et al.*, 1996).

- Oxidación de Mn^{2+}, generándose Mn^{3+} que se combina con el tartrato del tampón dando lugar a un complejo con un máximo de absorción a 238 nm (Paszczynski *et al.*, 1988) y un coeficiente de extinción molar (ε_{238}) de 6.500 $M^{-1}cm^{-1}$. La reacción contenía $MnSO_4$ a una concentración final de 0,1 mM y H_2O_2 a una concentración final de 0,1 mM.
- Transformación de 2,6-DMP, cuyo producto de oxidación es la cerulignona. Este compuesto presenta un máximo de absorción a 469 nm, con un coeficiente de extinción molar (ε_{469}) de 27.500 M^{-1} cm^{-1}, referida a la concentración de sustrato. La reacción contenía 0,1 mM de 2,6-DMP, 0,1 mM de $MnSO_4$ y 0,1 mM de H_2O_2.

4.3. Actividad lacasa

Se determinó midiendo la oxidación de los sustratos ABTS y 2,6-DMP en tampón acetato 100 mM, pH 5,5 (Muñoz *et al.*, 1997).

- Oxidación de ABTS, cuyo producto de oxidación es su radical catiónico, que presenta un máximo de absorción a 436 nm, y un coeficiente de extinción molar (ε_{436}) de 29.300 M^{-1} cm^{-1}. La reacción contenía ABTS a una concentración final de 5 mM.
- Oxidación de 2,6-DMP, a una concentración final de 0,1 mM.

4.4. Actividad peroxidasa versátil (VP)

Se determinó midiendo el complejo Mn^{3+}-tartrato generado por la oxidación de Mn^{2+} en presencia de H_2O_2 y de tartrato sódico (Ruiz-Dueñas

et al., 1999). Este complejo presenta un máximo de absorción a 238 nm con un coeficiente de extinción molar (ε_{238}) de 6.500 $M^{-1}cm^{-1}$. La reacción se llevó a cabo en tampón tartrato sódico 100 mM, pH 5,5, a una concentración final de 0,1 mM de $MnSO_4$ y 0,1 mM de H_2O_2.

5. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA GENERAL

5.1. Análisis químico de la madera

Una vez finalizada la fermentación, se retiró el contenido de los matraces y se llevaron a cabo los análisis que se describen a continuación.

5.1.1. Porcentaje de humedad y pérdida de peso

Las muestras de madera se secaron en una estufa de aireación a 60 ºC hasta obtener un peso constante, que denominamos peso seco. El grado de humedad se calculó por diferencia de peso de la madera antes y tras el secado. La pérdida de peso se calculó por diferencia entre el peso de la madera inicial y el peso de la madera tras el periodo de SSF, todo ello medido como peso seco.

5.1.2. Obtención del extracto lipídico

Tras secar las muestras hasta peso constante, éstas se trituraron en un molino refrigerado hasta obtener un polvo homogéneo. Una vez trituradas, se introdujeron en un cartucho de papel Whatman^{3MM} (previamente extraído con acetona durante 4 h) y, a continuación, se procedió a la extracción en Soxhlet durante 8 h, utilizando acetona como disolvente. El extracto en acetona se recogió y se llevó hasta sequedad con nitrógeno. Finalmente la fracción lipídica (soluble en cloroformo) se analizó por GC y GC/MS como se describe en los apartados 6.3.1 y 6.4.

5.1.3. Fracción hidrosoluble

Se determinó siguiendo la norma Tappi om-88 (Tappi, 2004). Una vez secos, los cartuchos con las muestras extraídas en acetona se extrajeron de nuevo con 100 mL de agua destilada a 100 ºC, durante 3 h. Transcurrido

este tiempo se secaron tanto el extracto como el contenido del cartucho, y se determinaron gravimétricamente.

5.1.4. Lignina Klason

Se determinó según la norma Tappi 222-om88 (Tappi, 2004). Para ello, la muestra de madera seca, libre de compuestos lipídicos e hidrosolubles, se sometió a una hidrólisis ácida completa. Se tomaron 300 mg de madera y se trataron con H_2SO_4 al 72 %, durante 1 h a 30 ºC y agitación suave. Posteriormente se añadió agua destilada hasta alcanzar una concentración de H_2SO_4 de un 4 %, manteniéndose durante 1 h a 110 ºC. Una vez que el hidrolizado se atemperó, se filtró a través de filtros de vidrio poroso (previamente tarados), obteniéndose un hidrolizado ácido a partir del cual se realizaron los análisis de la lignina ácido soluble y de la composición de polisacáridos. El filtro que contenía el residuo se lavó con agua destilada hasta alcanzar un pH neutro y se secó a 100 ºC, durante 4 h. El porcentaje de lignina Klason fue calculado gravimétricamente por diferencia de peso.

5.1.5. Lignina ácido-soluble

Una muestra del hidrolizado ácido obtenido en el apartado anterior se midió en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160 a 205 nm. El porcentaje de lignina ácido soluble (L.A.S.) se calculó según la siguiente fórmula:

$$\%\,\text{L.A.S} = \frac{A_{205} \times V}{1100 \times M}$$

A_{205} corresponde a la absorbancia medida a 205 nm, V al volumen final del hidrolizado (mL), y M al peso del material de partida (g).

5.1.6. Composición de polisacáridos

Se determinó mediante la norma Tappi 249 om-85 (Tappi, 2004). Esta técnica permite analizar los cinco azúcares principales que forman la fracción polisacarídica de la madera de eucalipto (glucosa, xilosa, manosa, galactosa y arabinosa), en forma de acetatos de aditol.

Se tomaron 3 mL del hidrolizado ácido obtenido en el apartado 5.1.4, añadiéndose 1 mL de inositol con una concentración de 1 mg/mL como

patrón interno. La mezcla se neutralizó con $BaCO_3$ hasta alcanzar un pH de 7. Se centrifugó a 9.000 rpm utilizando un rotor SS-34 (Sorwall), durante 5 min y a 4 ºC de temperatura. El precipitado se descartó y el sobrenadante se evaporó en rotavapor a 50 ºC. Una vez seco, se añadió 1 mL de agua destilada y 40 mg de $NaBH_4$ para reducir la muestra, dejándolo actuar durante 12 h. Transcurrido este tiempo, se llevó a pH ácido con HCl 10 M y, de nuevo, se evaporó en un rotavapor a 50 ºC. El residuo seco se lavó tres veces con 2 mL de metanol para eliminar el exceso de $NaBH_4$, y se evaporó en rotavapor a la misma temperatura. A continuación, las muestras se acetilaron y se analizaron por GC, como se describe en el apartado 6.4.2.

5.1.7. Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Durante la peroxidación de los ácidos grasos insaturados se originan hidroperóxidos inestables que dan lugar a aldehídos de bajo peso molecular, siendo el más abundante el malondialdehído (MDA). La cuantificación de estos aldehídos se utiliza como una medida de procesos peroxidativos (Cheeseman, 1990).

A partir de una alícuota de 100 µL del extracto en acetona obtenido en el apartado 5.1.2, se llevó a cabo la reacción con 1,1 mL de una solución de ácido acético al 20 % (v/v) ajustado a un pH de 3,5 con NaOH 2 M, 1,3 mL de la solución de ácido tiobarbitúrico (TBA) (8,5 mg TBA/mL H_2O) y 40 µL de hidroxitolueno butilado al 0,8 % (p/v) en ácido acético. La mezcla de reacción se calentó a 100 ºC durante 60 min y una vez enfriadas, las muestras se extrajeron con butanol. Para ello, se añadieron 3 mL de butanol y se centrifugaron a 2.000 x g durante 10 min. La fase orgánica se valoró a temperatura ambiente a una longitud de onda de 532 nm, en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160.

La cantidad de TBARS se expresó en unidades de concentración de MDA formado por gramo de madera (peso seco), para lo que fue necesario la realización de una recta patrón con 1,1,3,3-tetrametoxipropano (malondialdehído bis (dimetil acetal)). La recta utilizada fue: A_{532}= 10,502 ·x [MDA] (R^2= 0,998), lineal entre 0 y 0,8 unidades de absorbancia.

5.2. Ensayos de peroxidación de ácidos alquilitacónicos

5.2.1. Determinación de reacciones de peroxidación mediante la formación de TBARS

La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 4 mL, glicolato sódico 20 mM, pH 4,5, 0,1 % Tween 20 (p/v), una mezcla de los tres ácidos alquilitacónicos mayoritarios 0,33 mM, $MnSO_4$ 0,2 mM y H_2O_2 0,4 mM. La reacción se inició al añadir 5 U de VP de *P. eryngii* expresada en *E. coli* [4] sobre 0,5 mL de la solución anterior. Se tomaron muestras a diferentes tiempos midiendo la concentración de MDA mediante el test de los TBARS, como se indica en el apartado 5.1.7. La reacción se llevó a cabo en idénticas condiciones con ácido oleico 0,33 mM y con ácido linoleico 0,33 mM.

5.2.2. Determinación de reacciones de peroxidación mediante la producción de hexanal

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 mL que contenían: glicolato sódico 20 mM, pH 4,5, 0,1 % Tween 20 (p/v), cada uno de los tres ácidos alquilitacónicos 0,33 mM y $MnSO_4$ 0,2 mM. La reacción se inició con la adición de 5 U de VP y se mantuvo a temperatura ambiente durante 18 h. Transcurrido este tiempo, se añadió HCl 1 M, saturado con 2,4-dinitrofenilhidrazina, y se agitó durante 1 h. A continuación, la fase orgánica se extrajo con tetracloruro de carbono cuatro veces consecutivas y, posteriormente, se lavó dos veces con una solución de HCl 1 M. Para eliminar los restos de humedad se añadió Na_2SO_4 anhidro.

El extracto orgánico se llevó a sequedad en un rotavapor y una vez seco, se resuspendió en 0,5 mL de metanol, se filtró a través de un filtro de nailon de 0,45 μm de diámetro de poro y se analizó por HPLC como se describe en el apartado 6.2.3. Como control positivo la reacción se llevó a cabo en idénticas condiciones con ácido linoleico 0,33 mM (Moen y Hammel, 1994).

[4] La enzima VP recombinante se expresa en *E. coli* en forma de cuerpos de inclusión y, tras su lavado y replegado *in vitro*, se purifica en un único paso cromatográfico utilizando un cartucho de intercambio aniónico (Q-Resource, Amersham Pharmacia) acoplado a un equipo de HPLC (AKTA *purifier*, Amersham Pharmacia) (Pérez-Boada *et al.*, 2002).

5.3. Ensayos de degradación en presencia de ácidos alquilitacónicos

5.3.1 Ensayos de degradación de un dímero de lignina

El dímero modelo utilizado fue el arilglicerol-β-aril éter, que al ser oxidado da lugar a su cetona, que puede ser cuantificada por HPLC. El dímero se resuspendió, a una concentración de 400 μM, en 1 ml de tartrato sódico 20 mM, pH 4,5, que contenía 1 mM de $MnSO_4$, 1 % Tween 80 (p/v) y 2,5 mg del ácido tetradecilitacónico. Se llevaron a cabo tres reacciones diferentes: el control positivo, que contenía únicamente Tween 80, una reacción con el ácido tetradecilitacónico y finalmente una reacción que contenía a ambos. Las reacciones comenzaron al añadir 0,3 U de MnP recombinante de *P. chrysosporium*. Las reacciones se desarrollaron en agitación suave durante 72 h a 40 ºC. Transcurrido este tiempo, se añadieron 0,2 U adicionales de enzima, manteniéndose en las mismas condiciones durante 48 h. Finalizado este tiempo, las muestras se filtraron a través de un filtro de nailon, de 0,5 μm de diámetro de poro, y se analizaron por HPLC, como se describe en el apartado 6.2.4. (Kapich *et al.*, 1999b).

5.3.2. Degradación de ácidos alquilitacónicos por la VP y la lacasa

Las reacciones se llevaron a cabo con lacasa y con VP en un volumen final de 14 mL, con una concentración final de tampón tartrato 50 mM, pH 4,0, y con 10 mg de un extracto que contenía ácido tetradecilitacónico, ácido 7-hexadecenilitacónico y ácido hexadecilitacónico. En el caso de la lacasa, se utilizaron 500 U/g de sustrato de un preparado comercial de lacasa de *Pycnoporus cinnabarinus*, producida a partir de la cepa monocariótica superproductora ss3 (Herpoël *et al.*, 2000). La reacción se incubó durante 2 h a 50 ºC, 120 rpm y con corriente húmeda de oxígeno.

En el caso de la VP, las reacciones se llevaron a cabo utilizando 10 U/g de sustrato, 0,2 mM de $MnSO_4$ y 0,4 mM de H_2O_2. La reacción se incubó durante 2 h a 50 ºC y 120 rpm (Buchert *et al.*, 2002). Una vez finalizado el tiempo de reacción las muestras se extrajeron tres veces, con 14 mL de metil *ter*-butil éter. La fase orgánica resultante de las tres extracciones se secó con nitrógeno y se analizó mediante GC y GC/MS como se describe en los apartados 6.3.1 y 6.4.

5.3.3. Degradación de lípidos en presencia de ácidos alquilitacónicos

Se evaluó el efecto de los ácidos alquilitacónicos en la degradación de sitosterol por la VP recombinante de *P. eryngii* y la lacasa de *P. cinnabarinus*. El sitosterol se disolvió previamente en acetona a una concentración de 20 g/L, y se añadió a la reacción hasta alcanzar una concentración de 400 mg/L obteniéndose una dispersión coloidal. Las reacciones se llevaron a cabo y se analizaron como se describe en el apartado anterior. Como control positivo en el caso de la lacasa, se llevó a cabo la reacción con sitosterol y HBT 3 mM, como mediador.

6. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

6.1. Extracción en fase sólida (SPE)

Esta técnica permite separar los diferentes tipos de compuestos lipídicos presentes en la madera atendiendo a su polaridad (Gutiérrez *et al.*, 1998). En el presente trabajo se utilizó como paso previo a la purificación de los ácidos alquilitacónicos por HPLC. Se utilizaron cartuchos Sep-Pak (Waters) con 500 mg de fase aminopropilo. El extracto lipídico obtenido en el apartado 5.1.2 se resuspendió en hexano-cloroformo (4:1) a una concentración de 30 g/L. La columna, previamente equilibrada con 4 mL de hexano, se cargó con 500 µL de muestra. Para eluir las distintas fracciones lipídicas se utilizaron disolventes de polaridad creciente: 10 mL de cloroformo, 10 mL de éter etílico/ácido acético (98:2) y, finalmente, se añadieron 10 mL de acetona.

6.2. Cromatografía líquida de altas prestaciones (HPLC)

6.2.1. Purificación de ácidos alquilitacónicos

Esta técnica se utilizó para la separación en forma individual de los tres ácidos alquilitacónicos mayoritarios, tras una separación previa por SPE.

Se utilizó una columna de fase reversa Discovery C_8 (5 µm de diámetro de partícula, 15 cm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno, Supelco). La muestra se eluyó en condiciones isocráticas, utilizando como fase móvil: acetonitrilo:tetrahidrofurano:ácido acético al 0,1 %, (50,4: 21,6: 28), con un

flujo de 1 mL/min y una temperatura de 40 ºC. La monitorización se llevó a cabo a 205 y 215 nm de longitud de onda.

Una vez estandarizadas las condiciones analíticas, se procedió a la purificación en condiciones preparativas, con una columna Discovery C_8 (5 μm de diámetro de partícula, 20 cm de longitud y 10 mm de diámetro interno, Supelco). Tanto la fase móvil como la temperatura utilizada fueron las mismas que en condiciones analíticas y en este caso se utilizó un flujo de 3,4 mL/min.

6.2.2. Purificación del ácido agarícico

El ácido agarícico sintetizado por *P. placenta* se purificó directamente por HPLC. El material de partida fue el extracto lipídico obtenido como se describe en el apartado 5.1.2.

Se utilizó una columna de fase reversa Discovery C_8 (5 μm de diámetro de partícula, 15 cm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno, Supelco). La fase móvil fue metanol ácido acético al 0,1 % (v/v). La muestra se eluyó utilizando el siguiente gradiente: durante los primeros 5 min la proporción de metanol fue de un 20 %, llegando al 100 % en 10 min y manteniéndose a este porcentaje durante 5 min. La monitorización se llevó a cabo a dos longitudes de onda, 215 y 225 nm. El flujo fue de 1 mL/min y la temperatura de 40 ºC.

6.2.3. Determinación de hexanal

Se utilizó una columna de fase reversa Spherisorb C_{18} (5 μm de diámetro de partícula, 25 cm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno, HiChrom). La muestra se eluyó con metanol:agua (3:1) en condiciones isocráticas, a un flujo de 1 mL/min y temperatura ambiente. La monitorización se llevó a cabo a 360 nm de longitud de onda.

El estándar utilizado fue hexanal-2,4-dinitrofenilhidrazona, a una concentración de 0,05 g/L.

6.2.4. Análisis de la oxidación del dímero arilglicerol-β-aril éter

Se utilizó una columna de fase reversa Vydac 201TP104 C_{18} (10 μm de diámetro de partícula, 25 cm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno). La fase móvil utilizada fue metanol: ácido fórmico al 0.1 % (v/v). La muestra se eluyó utilizando el siguiente gradiente: durante los primeros 5 min la

proporción de metanol fue de un 25 %, llegando al 50 % en 40 min y alcanzando el 100 % en 2 min. La monitorización se llevó a cabo 280 nm de longitud de onda. El flujo fue de 1 mL/min y a temperatura ambiente.

6.3. Cromatografía de gases (GC)

6.3.1. Análisis de lípidos

El extracto lipídico seco obtenido como se describe en los apartados 3.3.4 y 5.1.2, se solubilizó en cloroformo y se analizó en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard HP 5890, equipado con un detector FID. Se usó una columna capilar (DB-5HT, J&W Scientific) de 5 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,1 μm de espesor de película, y helio como gas portador. Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 300 ºC y 350 ºC, respectivamente. El horno se programó inicialmente a 100 ºC durante 1 min, alcanzándose los 350 ºC con un incremento de 15 ºC/min, que se mantuvieron durante 3 min.

6.3.2. Análisis de la composición de polisacáridos

La composición de polisacáridos de la madera se analizó en un cromatógrafo Perkin Elmer Sigma 3 equipado con un detector FID, utilizando una columna de 2 m de longitud y 2 mm de diámetro interno, con un 3 % de SP-2340 sobre 100/120 Supelcoport como fase estacionaria, y nitrógeno como gas portador a un flujo de 30 mL/min. La temperatura del horno al inicio fue de 200 ºC que se mantuvo durante 3 min, alcanzándose los 230 ºC con un aumento de 10 ºC/min, que se mantuvieron durante 8 min. La cuantificación de los azúcares se realizó atendiendo al área de los picos y a los factores de respuesta obtenidos con los siguientes monosacáridos: arabinosa, xilosa, manosa, galactosa, y glucosa.

6.4. Cromatografia de gases/espectrometría de masas (GC/MS)

Los análisis se realizaron en un cromatógrafo Varian Star 3400 equipado con un detector ITD (Varian Saturn 2000), utilizando una columna capilar (DB-5HT, J&W Scientific) de 15 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno, y 0,1 μm de espesor de película, usando helio como gas portador.

La temperatura del inyector al inicio fue de 120 ºC (1 min), alcanzando los 380 ºC con un aumento de 200 ºC/min. La temperatura del horno se programó a 120 ºC, manteniéndose durante 1 min hasta alcanzar los 380 ºC con un aumento de 10 ºC/min, que se mantuvieron durante 5 min. La temperatura de la trampa de iones y de la línea de transferencia se programaron a 200 ºC y 300 ºC, respectivamente, inyectándose la muestra en modo de *splitless*.

6.4.1. Identificación de compuestos

Los compuestos lipofílicos se identificaron comparando sus espectros de masas con las librerías de espectros Wiley y NIST, por los tiempos de retención y por espectros de diferentes estándares utilizados en GC/MS.

6.4.2. Localización de la posición de dobles enlaces de los ácidos alquilitacónicos

Para la identificación de la posición del doble enlace de los ácidos alquilitacónicos se utilizó el método de McCloskey y McClelland (1965). La muestra previamente se metiló, como se describe en el apartado 6.4.4. A continuación, se añadieron 2 mg del compuesto metilado y 2 mg de OsO_4 a una solución de piridina:dioxano (1:8), manteniéndose a temperatura ambiente durante 1 h. Una vez finalizado este tiempo, se añadieron 6 mL de una solución de Na_2SO_3, que contenía un 16 % (p/v) de Na_2SO_3, 8,5 mL de H_2O y 2,5 mL de metanol. La reacción se mantuvo durante 1,5 h y posteriormente se centrifugó, descartándose el precipitado. El sobrenadante se evaporó con nitrógeno y a continuación se resuspendió en cloroformo. La fracción soluble en cloroformo se evaporó y se silanizó (6.4.4), analizándose por GC/MS como se describe en el apartado 6.4. (McCloskey y McClelland, 1965).

6.4.3. Cuantificación de los compuestos lipofílicos

La cuantificación se llevó a cabo atendiendo al área de los picos y a los factores de respuesta obtenidos con diferentes patrones. Los patrones utilizados fueron el ácido palmítico, el sitosterol, la triheptadecanoína, y el colesteril oleato, en un rango de concentraciones de 0,1 a 1 mg/mL. En todos los casos los coeficientes de correlación fueron superiores al 98 %.

6.4.4. Metodología de derivatización

La técnica de formación de derivados se aplica con distintos fines, como: i) aumentar la volatilidad de determinados compuestos que presentan una volatilidad reducida por lo que no pueden analizarse de forma adecuada por GC; ii) para aumentar la estabilidad, ya que los análisis por GC implican la utilización de altas temperaturas y algunos compuestos pueden sufrir una degradación térmica por la presencia de grupos termosensibles; iii) para obtener más información sobre el número y tipos de grupos reactivos presentes, por comparación de los compuestos en forma libre con los obtenidos tras uno o más procesos de derivatización.

Los tipos de derivatizaciones utilizados en este trabajo fueron las siguientes:

- **Metilación:** Implica la unión de grupos metilo a grupos carboxilo y grupos hidroxilo de tipo fenólico, dando lugar a enlaces éster o éter respectivamente.
  Las reacciones de metilación se llevaron a cabo partir del extracto lipídico obtenido en el apartado 5.1.2, resuspendido en cloroformo. Una alícuota de 100 µL de este extracto se secó con nitrógeno y se añadió 25 µL del agente metilante (trimetilsilil diazometano) 2 M en hexano y 100 µL de metanol (Takuo *et al.*, 1981). Se agitó suavemente durante 1 min[5] y se evaporó con nitrógeno. De nuevo se resuspendió en 100 µL de cloroformo. Una alícuota de 1 µL se analizó por GC/MS, como se describe en el apartado 6.4.

- **Silanización:** Supone la unión de grupos trimetilsililo a grupos hidroxilo libres, dando lugar a enlaces éter.
  Como en el caso anterior se tomó una alícuota de 100 µL a partir del extracto lipídico obtenido en el apartado 5.1.2. Una vez seca la muestra se silanizó con 100 µL de BSTFA, utilizando como catalizador 100 µL de piridina (Knapp, 1979). La reacción se mantuvo durante 120 min a 70 ºC, tras lo cual se llevó a sequedad con nitrógeno. Una vez seca, se resuspendió en 100 µL de cloroformo y se analizó un alícuota de 1 µL mediante GC/MS como se describe en el apartado 6.4.

[5] El tiempo de incubación con el agente metilante fue variable según los casos, de 1-10 min, salvo que se indique lo contrario fue de 1 min.

- **Acetilación:** Se basa en la unión de grupos acetilo a grupos hidroxilo libres de compuestos aromáticos y alifáticos formando enlaces éster.

  Este tipo de derivatización se realizó únicamente en el análisis de los polisacáridos de la madera. A la muestra seca, obtenida en el apartado 5.1.6, se añadió 1 mL de piridina-anhídrido acético (1:1), se incubó durante 1 h a 100 ºC y transcurrido este tiempo se llevó a sequedad, y se analizó mediante GC como se describe en el apartado 6.3.2.

7. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (NMR)

Para la realización de los espectros de NMR se tomaron 2 mg de los compuestos purificados (ver apartados 6.2.1. y 6.2.2.) a analizar y se solubilizaron en cloroformo deuterado.

Los espectros de NMR se registraron en un espectrómetro Bruker AVANCE 500 MHz, equipado con una sonda triple con gradientes en el eje z, a una temperatura de 298 K. Las asignaciones de las señales se realizaron empleando las secuencias estándar, HSQC y HMBC, proporcionadas por Bruker. El experimento HSQC se realizó con 16 acumulaciones, usando una matriz de datos de 256 incrementos en la dimensión indirecta y adquiriendo 2048 puntos en la dimensión de adquisición. La anchura espectral fue de 140 ppm en la dimensión indirecta y de 8 ppm, en la de adquisición. El experimento HMBC se realizó con 32 acumulaciones, respectivamente, usando una matriz de datos de 256 incrementos en la dimensión indirecta y adquiriendo 2048 puntos en la dimensión de adquisición. La anchura espectral fue de 180 ppm en la dimensión indirecta y de 8 ppm en la de adquisición.

Conclusiones

1. Los basidiomicetos son capaces de degradar eficazmente los principales compuestos lipofílicos presentes en la madera de eucalipto, incluyendo esteroles libres y esterificados, alcanzándose una degradación de sitosterol y ésteres de sitosterol superior al 98 % en las maderas tratadas con *Trametes versicolor*, *Ceriporiopsis subvermispora* y *Phlebia radiata*.

2. Durante el tratamiento de la madera aparecieron varias cetonas esteroidales, las estigmast-4-en-3-ona y estigmasta-3,5-dien-7-ona así como las dicetonas esteroidales (incluyendo estigmasta-3,6-diona y estigmast-4-en-3,6-diona). El perfil de distribución de las cetonas esteroidales sugiere la existencia de rutas distintas de degradación de esteroles por los hongos de podredumbre parda (7 especies investigadas) y podredumbre blanca (8 especies investigadas) con participación de enzimas de tipo esterol oxidasa y oxidorreductasa de alto potencial redox (incluyendo sistemas lacasa-mediador) que finalmente dieron lugar a una acumulación de cetonas esteroidales por el primer grupo de basidiomicetos y a su degradación por el segundo.

3. Simultáneamente con la degradación y transformación de los extraíbles lipofílicos de la madera de eucalipto, se detectó la síntesis de nuevos metabolitos fúngicos, incluyendo hasta nueve ácidos alquilitacónicos por *Ceriporiopsis subvermispora*, dos ácidos alquilcítricos (norcaperático y agarícico) por *Postia placenta* y tres anhídridos alquilitacónicos por *Laetiporus sulphureus*, cuyas estructuras fueron inicialmente establecidas por espectrometría de masas de los compuestos originales y derivados.

4. La estructura química de los ácidos alquilitacónicos y del ácido agarícico ha sido definitivamente confirmada mediante NMR bidimensional (de ^{1}H y ^{13}C) en experimentos HMBC y HSQC, una vez que estos compuestos fueron extraídos de la madera de eucalipto tratada con los hongos en condiciones de fermentación en estado sólido y purificados utilizando SPE y HPLC, proponiéndose a continuación rutas de biosíntesis e interconversión de los diferentes ácidos y anhídridos alquil-di/tri-carboxílicos.

5. Tras una variedad de estudios (incluyendo análisis de lignina, polisacáridos y lípidos; detección de enzimas y productos de peroxidación en cultivos sobre madera; peroxidación *in vitro;* y degradación enzimática de compuestos modelo) no ha sido posible determinar con certeza el papel de los ácidos alquilitacónicos en el crecimiento del hongo sobre la madera. Sin embargo, la inhibición parcial de la oxidación de un dímero modelo de lignina (en presencia de lípidos insaturados y una peroxidasa capaz de iniciar su peroxidación) sugiere que los ácidos alquilitacónicos no sólo pueden inhibir la degradación de la celulosa como habían sugerido otros autores, sino también la degradación de la lignina a través de radicales de lípidos. Estos resultados, junto con la presencia de compuestos similares en cultivos de hongos de podredumbre parda y su ausencia en otros hongos capaces de degradar la lignina selectivamente, pone en entredicho la hipotética asociación entre los ácidos alquilitacónicos y la producción de un patrón de biodegradación selectiva sobre la madera.

Bibliografía

Adler, E. (1977) Lignin chemistry - Past, present and future. Wood Sci. Technol. 11: 169-218.

Aho, L. y Kurkela, R. (1978) Free fatty acids of wood mushrooms. Nahrung 22: 603-607.

Akhtar, M., Attridge, M.C., Myers, G.C. y Blanchette, R.A. (1993) Biomechanical pulping of loblolly pine chips with selected white-rot fungi. Holzforschung 47: 36-40.

Allen, L.H. (2000) Pitch control in paper mills. En: Pitch control, wood resin and deresination. (Eds.: Back, E.L. y Allen, L.H.), TAPPI Press, Atlanta, pp. 307-328.

Araki, T., Yamazaki, Y. y Suzuki, N. (1957) Studies on the Violet root of sweet potatoes caused by *Helicobasidium mompa*. Ist. Agric. Sci. Jpn. Ser. 8: 53-59.

Aue, W.P., Bartholdi E. y Ernst, R.R. (1976) Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance. J. Chem. Phys. 64: 2229-2246.

Bajpai, P., Bajpai, P.K., Akhtar, M. y Jauhari, M.B. (2001) Biokraft pulping of eucalyptus with selected lignin-degrading fungi. J. Pulp Paper Sci. 27: 235-239.

Bao, W.L., Fukushima, Y., Jensen, K.A., Moen, M.A. y Hammel, K.E. (1994) Oxidative degradation of non-phenolic lignin during lipid peroxidation by fungal manganese peroxidase. FEBS Lett. 354: 297-300.

Barrasa, J.M., González, A.E. y Martínez, A.T. (1992) Ultrastructural aspects of fungal delignification of Chilean woods by *Ganoderma australe* and *Phlebia chrysocrea*: A study of natural and *in vitro* degradation. Holzforschung 46: 1-8.

Baucher, M., Monties, B., van Montagu, M. y Boerjan, W. (1998) Biosynthesis and genetic engineering of lignin. Crit. Rev. Plant Sci. 17: 125-197.

Benoit, F. y Holmes, J.L. (1969) The mass spectra of carboxylic acids I: fragmentation mechanisms in maleic and fumaric acids and related compounds. Org. Mass Spectr. 2: 591-601.

Betts, W.B., Dart, R.K., Ball, A.S. y Pedlar, S.L. (1991) Biosynthesis and structure of lignocellulose. En: Biodegradation: Natural and synthetic materials. (Ed.: Betts, W.B.), Springer-Verlag, London, pp. 139-155.

Blanchette, R.A., Burnes, T.A., Eerdmans, M.M. y Akhtar, M. (1992) Evaluating isolates of *Phanerochaete chrysosporium* and *Ceriporiopsis subvermispora* for use in biological pulping processes. Holzforschung 46: 109-115.

Blanchette, R.A., Leatham, G.F., Attridge, M., Akhtar, M. y Myers, G.C. (1990) Biomechanical pulping with *C. subvermispora*. Patent (International) 5,055,159.

Bogan, B.W., Lamar, R.T. y Hammel, K.E. (1996) Fluorene oxidation in vivo by *Phanerochaete chrysosporium* and in vitro during manganese-dependent lipid peroxidation. Appl. Environ. Microbiol. 62: 1788-1792.

Bohmer, S., Messner, K. y Srebotnik, E. (1998) Oxidation of phenanthrene by a fungal laccase in the presence of 1-hydroxybenzotriazole and unsaturated lipids. Biochem. Biophys. Res. Commun. 244: 233-238.

Bonnarme, P., Gillet, B., Sepulchre, A.M., Role, C. y Ducrocq, C. (1995) Itaconate biosynthesis in *Aspergillus terreus*. J. Bacteriol. 177: 3573-3578.

Bourbonnais, R. y Paice, M.G. (1990) Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. FEBS Lett. 267: 99-102.

Buchert, J., Mustranta, A., Tamminen, T., Spetz, P. y Holmbom, B. (2002) Modification of spruce lignans with *Trametes hirsuta* laccase. Holzforschung 56: 579-584.

Buetow, D.E. y Levedahl, B.H. (1964) Responses of microorganisms to sterols and steroids. Ann. Rev. Microbiol 18: 167-194.

Buswell, J.A. y Odier, E. (1987) Lignin biodegradation. Crit. Rev. Biotechnol. 6: 1-60.

Calam, C.T., Oxford, A.E. y Rastrick, H. (1939) Studies in the biochemistry of microorganisms. Itaconic acid, a metabolic product of a strain of *Apergillus terreus* thom. Biochem. J. 33: 1488-1495.

Calero-Rueda, O., Plou, F.J., Ballesteros, A., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (2002) Production, isolation and characterization of a sterol esterase from *Ophiostoma piceae*. BBA Proteins Proteomics 1599: 28-35.

Call, H.P. y Mücke, I. (1997) History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym(R)-process). J. Biotechnol. 53: 163-202.

Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (2005) Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. Appl. Environ. Microbiol. 71: 1775-1784.

Camarero, S., Sarkar, S., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (1999) Description of a versatile peroxidase involved in natural degradation of lignin that has both Mn-peroxidase and lignin-peroxidase substrate binding sites. J. Biol. Chem. 274: 10324-10330.

Capek, A., Hanc O. y Tadra M. (1966) Microbial transformations of steroids. DR. W. Junk, Publishers The hague.

Charney, W. y Herzog, H.L. (1967) Microbial transformation of steroids. Academic Press, New York and London.

Chasles, W. (1964) Chemistry of the steroids II. London Butterworths 2: 1-63.

Cheeseman, K.H. (1990) Methods of measuring lipid peroxidation in biologycal systems: an overview. En: Free radicals, lipoproteins, and membrane lipids. (Eds.: Crastes de Paulet, A., Douste-Blazy, L. y Paoletti, R.), Plenum Press, New York, pp. 143-152.

Chen, T.Z.Y. (1994) Wood extractives and pitch problems: analysis and partial removal by biological treatment. Abs. 48th Appita Annu. Gen. Confer. Melbourne.

Christie, W.W. (1994) Gas Chromatography and Lipids: A Practical Guide. The Oily Press, Dundee.

Crawford, R.L. (1981) Lignin Biodegradation and Transformation. Wiley Interscience, New York.

Dart, R.K. (1976) Effect of temperature on the fatty-acid composition of *Sporotrichum thermophile*. Trans. Br. Mycol. Soc. 66: 532-533.

Dart, R.K. y Stretton, R.J. (1976) Fatty acid composition of *Sporotrichum* species. Trans. Br. Mycol. Soc. 66: 529-532.

Davis, M.W. y Lamar, R.T. (1992) Evaluation of methods to extract ergosterol for quantitation of soil fungal biomass. Soil Biol. Biochem. 24: 189-198.

del Río, J.C., Gutiérrez, A. y Martínez, A.T. (2004) Identifying acetylated lignin units in non-wood fibers using pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 18: 1181-1185.

del Río, J.C., Gutiérrez, A., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (2002) Identification of a novel series of alkylitaconic acids in wood cultures of *Ceriporiopsis subvermispora* by gas chromatography/mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 16: 62-68.

Donaldson, L., Hague, J. y Snell, R. (2001) Lignin distribution in coppice poplar, linseed and wheat straw. Holzforschung 55: 379-385.

Dutta, R.K., Roy, M.K. y Singh, H.D. (1992) Metabolic blocks in the degradation of β-sitosterol by a plasmid-cured strain of *Arthrobacter oxydans*. J. Basic Microb. 32: 167-176.

Enoki, M., Honda, Y., Kuwahara, M. y Watanabe, T. (2002) Chemical synthesis, iron redox interactions and charge transfer complex formation of alkylitaconic acids from *Ceriporiopsis subvermispora*. Chem. Phys. Lipids 120: 9-20.

Enoki, M., Watanabe, T., Honda, Y. y Kuwahara, M. (2000) A novel fluorescent dicarboxylic acid, (*Z*)-1,7-nonadecadiene-2,3-dicarboxylic acid, produced by white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispora*. Chem. Lett. 54-55.

Eriksson, K.-E.L. (1990) Biotechnology in the pulp and paper industry. Wood Sci. Technol. 29: 79-101.

Eriksson, K.-E.L., Blanchette, R.A. y Ander, P. (1990) Microbial and enzymatic degradation of wood components. Springer-Verlag, Berlin.

Esterbauer, H. y Cheeseman, K.H. (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Methods Enzymol. 186: 407-421.

Evans, C.S., Dutton, M.V., Guillén, F. y Veness, R.G. (1994) Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocellulose degradation. FEMS Microbiol. Rev. 13: 235-240.

Evans, C.S., Gallagher, I.M., Atkey, P.T. y Wood, D.A. (1991) Localisation of degradative enzymes in white-rot decay of lignocellulose. Biodegradation 2: 93-106.

Farrell, R.L.A.S. (1994) Cartapip: a biological product for control of pitch in pulp mills. Abs. 80th Annu. Meeting Technical Section, Montreal.

Fengel, D. y Wegener, G. (1984) Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions. De Gruyter, Berlin.

Fujita, M. y Harada, H. (1991) Ultrastructure and Formation of Wood Cell Wall. En: Wood and Cellulosic Chemistry. (Eds.: David N.-S.Hon y Nobuo Shirashi), Marcel Dekker Inc., New York, pp. 3-57.

Fujita, Y., Awaji, H., Matsukura, M. y Hata, K. (1991) Enzymic pitch control in papermaking process. Kami Pa Gikyoshi 45: 905-921.

Gandarias, J.M., Lacort, M., Martínez, M.J., Fernández, C.J. y Ochoa, B. (1987) Kinetic properties and solubilization of microsomal cholesterol ester hydrolase from rat liver. Steroids 49: 403-417.

Gao, Y., Chen, T. y Breuil, C. (1993) Ergosterol - A measure of fungal growth in wood for staining and pitch control fungi. Biotechnol. Tech. 7: 621-626.

Gill, M. (1982) 3-[(7Z)-hexadecenyl]-4-methylfuran-2,5-dione from *Piptoporus australiensis*. Phytochemistry 21: 1786-1788.

Glenn, J.K., Morgan, M.A., Mayfield, M.B., Kuwahara, M. y Gold, M.H. (1983) An extracellular H_2O_2-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 114: 1077-1083.

Gómez-Toribio, V., Martínez, M.J., Martínez, A.T. y Guillén, F. (2001) Quinone redox cycling as a mechanism for extracellular hydroxyl radical production by white-rot fungi. Abs. 8th Intern. Conf. Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, Helsinki, 4-8 June.

Guevarra, E.D. y Tabuchi, T. (1990) Accumulation of itaconic, 2-hydroxyparaconic, itatartaric and malic acids by strains of de genus Ustilago. Agric. Biol. Chem. 54: 2353-2358.

Guillén, F. y Evans, C.S. (1994) Anisaldehyde and veratraldehyde acting as redox cycling agents for H_2O_2 production by *Pleurotus eryngii*. Appl. Environ. Microbiol. 60: 2811-2817.

Guillén, F., Gómez-Toribio, V., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (2000) Production of hydroxyl radical by the synergistic action of fungal laccase and aryl alcohol oxidase. Arch. Biochem. Biophys. 383: 142-147.

Guillén, F., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (1992) Aryl-alcohol oxidase from *Pleurotus eryngii*: substrate specificity and H_2O_2-producing system. En: Biotechnology in pulp and paper industry. (Eds.: Kuwahara, M. y Shimada, M.), UNI Pub. Co., Ltd., Tokyo, pp. 371-376.

Guillén, F., Martínez, M.J., Muñoz, C. y Martínez, A.T. (1997) Quinone redox cycling in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii* leading to extracellular production of superoxide anion radical. Arch. Biochem. Biophys. 339: 190-199.

Gutiérrez, A., Caramelo, L., Prieto, A., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (1994) Anisaldehyde production and aryl-alcohol oxidase and dehydrogenase activities in ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*. Appl. Environ. Microbiol. 60: 1783-1788.

Gutiérrez, A., del Río, J.C., González-Vila, F.J. y Martín, F. (1998) Analysis of lipophilic extractives from wood and pitch deposits by solid-phase extraction and gas chromatography. J. Chromatogr. 823: 449-455.

Gutiérrez, A., del Río, J.C., González-Vila, F.J. y Martín, F. (1999a) Chemical composition of lipophilic extractives from *Eucalyptus globulus* Labill. wood. Holzforschung 53: 481-486.

Gutiérrez, A., del Río, J.C., Ibarra, D., Rencoret , J., Romero, J., Esperanza, M., Camarero, S., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (2006a) Enzymatic removal of free and conjugated sterols forming pitch deposits in enviromentally-sound bleaching of eucalypt paper pulp. Environ. Sci. Technol. 40: 3416-3422.

Gutiérrez, A., del Río, J.C. y Martínez, A.T. (2004) Chemical analysis and biological removal of wood lipids forming pitch deposits in paper pulp manufacturing. En: Protocols in Environmental Microbiology. (Ed.: Spencer, J.F.T.), Humana Press, Totowa, USA.

Gutiérrez, A., del Río, J.C., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (1999b) Fungal degradation of lipophilic extractives in *Eucalyptus globulus* wood. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1367-1371.

Gutiérrez, A., del Río, J.C., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (2001) The biotechnological control of pitch in paper pulp manufacturing. Trends Biotechnol. 19: 340-348.

Gutiérrez, A., del Río, J.C., Martínez-Íñigo, M.J., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (2002) Production of new unsaturated lipids during wood decay

by ligninolytic basidiomycetes. Appl. Environ. Microbiol. 68: 1344-1350.

Gutiérrez, A., del Río, J.C., Rencoret, J., Ibarra, D. y Martínez, A.T. (2006b) Main lipophilic extractives in different paper pulp types can be removed using the laccase mediator system. Appl. Microbiol. Biotechnol. 72: 845-851.

Gutiérrez, A. y Martínez, A.T. (1996) Biodegradación de la lignina: Una perspectiva actual. Rev. Iberoam. Micol. 13: 18-23.

Gutiérrez, A., Martínez, M.J., del Río, J.C., Romero, J., Canaval, J., Lenon, G. y Martínez, A.T. (2000) Fungal pretreatment of *Eucalyptus* wood can strongly decreases the amount of lipophilic extractives during chlorine-free kraft pulping. Environ. Sci. Technol. 34: 3705-3709.

Hammel, K.E. (1997) Fungal degradation of lignin. En: Plant litter quality and decomposition. (Eds.: Cadisch, G. y Giller, K.E.), CAB International, London, pp. 33-45.

Haskins, R.H., Thor, H. y Boots, J.-W.P. (1995) Metabolic porducts of *Ustilago zeae* in submerged culture. J. Microbiol 1: 749-756.

Hatakka, A., Vares, T. y Lundell, T. (1994) Lignin-transforming enzyme systems produced by white-rot fungi. Abs. 5th Intern. Mycol. Congr., Vancouver, 14-21 August 86.

Herpoël, I., Moukha, S., Lesage-Meessen, L., Sigoillot, J.C. y Asther, M. (2000) Selection of *Pycnoporus cinnabarinus* strains for laccase production. FEMS Microbiol. Lett. 183: 301-306.

Higuchi, T. (1990) Lignin biochemistry: Biosynthesis and biodegradation. Wood Sci. Technol. 24: 23-63.

Higuchi, T. (1997) Biochemistry and Molecular Biology of Wood. Springer Verlag, London.

Hillis, W.E. (1962) Wood extractives. Academic Press, London.

Hillis, W.E. y Sumimoto, M. (1989) Effect of extractives on pulping. En: Natural products of woody plants. II. (Ed.: Rowe, J.W.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 880-920.

Hofrichter, M., Ziegenhagen, D., Vares, T., Friedrich, M., Jäger, M.G., Fritsche, W. y Hatakka, A. (1998) Oxidative decomposition of malonic acid as basis for the action of manganese peroxidase in the absence of hydrogen peroxide. FEBS Lett. 434: 362-366.

Huneck, S., Schreiver, K., Hoefle, G. y Snatzke, G. (1979) Neodihydromurol and murolic acid two new γ–lactone-carboxylic acids from *Lecanora muralis*. J. Hattori Bot. Lab. 45: 1-23.

Idarraga, G., Ramos, J., Young, R.A., Denes, F. y Zuniga, V. (2001) Biomechanical pulping of *Agave sisalana*. Holzforschung 55: 42-46.

Izuka, H. y Naito, A. (1968a) Microbial transformation of steroids and alkaloids. University of Tokyo Press and University Park Press (State College, Pennsylvania), Tokyo-USA.

Izuka, H. y Naito, A. (1968b) Microbial transformation of steroids and alkaloids. University of Tokyo Press and University Park Press (State College, Pennsylvania), Tokyo-USA.

Jansson, M.B., Wormald, P. y Dahlman, O. (1995) Reactions of wood extractives during ECF and TCF bleaching of kraft pulp. Pulp Paper Can. 96: T134-T137.

Jensen, K.A., Houtman, C.J., Ryan, Z.C. y Hammel, K.E. (2001) Pathways for extracellular Fenton chemistry in the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. Appl. Environ. Microbiol. 67: 2705-2711.

Jensen, K.A.Jr., Bao, W., Kawai, S., Srebotnik, E. y Hammel, K.E. (1996) Manganese-dependent cleavage of non-phenolic lignin structures by *Ceriporiopsis subvermispora* in the absence of lignin peroxidase. Appl. Environ. Microbiol. 62: 3679-3686.

Joseleau, J.P., Gharibian, S., Comtat, J., Lefebvre, A. y Ruel, K. (1994) Indirect involvement of ligninolytic enzyme systems in cell wall degradation. FEMS Microbiol. Rev. 13: 255-264.

Käärik, A. (1965) The identification of the mycelia of wood-decay fungi by their oxidation reactions with phenolic compounds. Stud. For. Suec. 31: 3-81.

Kapich, A., Hofrichter, M., Vares, T. y Hatakka, A. (1999a) Coupling of manganese peroxidase-mediated lipid peroxidation with destruction of nonphenolic lignin model compounds and ^{14}C-labeled lignins. Biochem. Biophys. Res. Commun. 259: 212-219.

Kapich, A.N., Jensen, K.A. y Hammel, K.E. (1999b) Peroxyl radicals are potential agents of lignin biodegradation. FEBS Lett. 461: 115-119.

Kapich, A.N. y Shishbina, L.N. (1995) Lipid peroxidation and its regulation in the mycelium of xylotrophic basidiomycetes. Microbiology-Engl. Tr. 64: 266-271.

Karhunen, P., Rummakko, P., Sipila, J., Brunow, G. y Kilpeläinen, I. (1995) The formation of dibenzodioxocin structures by oxidative coupling. A model reaction for lignin biosynthesis. Tetrahedron Lett. 36: 4501-4504.

Kawai, S., Umezawa, T. y Higuchi, T. (1987a) *p*-Benzoquinone monoketals, novel degradation products of β-O-4 lignin model compounds by *Coriolus versicolor* and lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Lett. 210: 61-65.

Kawai, S., Umezawa, T., Shimada, M., Higuchi, T., Koide, K., Nishida, T., Morohoshi, N. y Haraguchi, T. (1987b) C_α-C_β cleavage of phenolic β-1 lignin substructure model compound by laccase of *Coriolus versicolor*. Mokuzai Gakkaishi 33: 792-797.

Keogh, M.F. y Zurita, M.E. (1977) α-(15-Hydroxyhexadecyl)itaconic acid from *Usnea aliphatica*. Phytochemistry 16: 134-135.

Kerem, Z., Jensen, K.A. y Hammel, K.E. (1999) Biodegradative mechanism of the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*: Evidence for an extracellular hydroquinone-driven Fenton reaction. FEBS Lett. 446: 49-54.

Kersten, P.J. y Kirk, T.K. (1987) Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H_2O_2 production by *Phanerochaete chrysosporium*. J. Bacteriol. 169: 2195-2201.

Kikugawa, K., Kojima, T., Yamaki, S. y Kosugi, H. (1992) Interpretation of the thiobarbituric acid reactivity of rat liver and brain homogenates in the presence of ferric ion and ethylenediaminetetraacetic acid. Anal. Biochem. 202: 249-255.

Kimura, Y., Asada, Y., Oka, T. y Kuwahara, M. (1991) Molecular analysis of a *Bjerkandera adusta* lignin peroxidase gene. Appl. Microbiol. Biotechnol. 35: 510-514.

Kinoshita, K. (1931) Über eine neue *Aspergillus* Art, *A. itaconicus*. Bot. Mag. Tokyo 45: 45-60.

Kirk, T.K. (1983) Degradation and conversion of lignocelluloses. En: The Filamentous Fungi. Vol. 4. Fungal Technology. (Eds.: Smith, J.E., Berry, B.R. y Kristiansen, B.), Arnold, Londres, pp. 266-294.

Kirk, T.K., Connors, W.J. y Zeikus, J.G. (1976) Requirement for a growth substrate during lignin decomposition by two wood-rotting fungi. Appl. Environ. Microbiol. 32: 192-194.

Kirk, T.K., Schultz, 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.

Knapp, D.R. (1979) Handbook of analytical derivatization reactions. Jonh wiley and sons, New York.8-10.

Koenigs, J.W. (1974) Production of hydrogen peroxide by wood-rotting fungi in wood and its correlation with weight loss, depolymerization, and pH changes. Arch. Microbiol. 99: 129-145.

Kuan, I.C. y Tien, M. (1993) Estimulation of Mn-peroxidase activity: A possible role for oxalate in lignin biodegradation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 1242-1246.

Kubicek, C.P. (2001) The role of citric acid cycle in fungal organic acid fermentations. Biochem. Soc. Symp. 54: 113-126.

Kurek, B. (1992) Potential applications of fungal peroxidases in the biological processing of wood, lignocelluloses and related compounds. En: Plant peroxidases 1980-1990, topics and detailed literature on molecular, biochemical, and physiological aspects. (Eds.: Penel, C., Gaspar, T. y Greppin, H.), University of Geneva, Geneva, pp. 139-186.

Leach, J.M. y Thakore, A.N. (1976) Toxic constituents in mechanical pulping effluents. Tappi 59: 129-132.

Lee, K.H., Wi, S.G., Singh, A.P. y Kim, Y.S. (2004) Micromorphological characteristics of decayed wood and laccase produced by the brown-rot fungus *Coniophora puteana*. J. Wood Sci. 50: 281-284.

Leisola, M., Ulmer, D. y Fiechter, A. (1983) Problem of oxygen transfer during degradation of lignin by *Phanerochaete chrysosporium*. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 17: 113-116.

Lingham, R.B., Silverman, K.C., Bills, G.F., Cascales, C., Sánchez, M., Jenkins, R.G., Gartner, S.E., Martín, I., Diez, M.T., Peláez, F., Mochales, S., Kong, Y.-L., Burg, R.W., Meinz, M.S., Huang, L., Nallin-Omstead, M., Mosser, S.D., Schaber, M.D., Omer, C.A., Pompliano, D.L., Gibbs, J.B. y Singh, S.B. (1993) *Chaetomella acutiseta* produces chaetomellic acids A and B which are reversible inhibitors

of farnesyl-protein transferase. Appl. Microbiol. Biotechnol. 40: 370-374.

Liss, S.N., Bicho, P.A. y Saddler, J.N. (1997) Microbiology and biodegradation of resin acids in pulp mill effluents: a minireview. Can. J. Microbiol. 43: 599-611.

Lu, F. y Ralph, J. (2002) Preliminary evidence for sinapyl acetate as a lignin monomer in kenaf. Chem. Commun. (Camb.)90-91.

MacLatchy, D. y van der Kraak, G. (1995) The phytoestrogen β-sitosterol alters the reproductive endocrine status of gold fish. Toxicol. Appl. Pharmacol. 134: 305-312.

Madigan, M.T., Martinko, J.M. y Parker, J. (1997) Biología de los microorganismos. Brock, Octava edición.

Måhlén, A. (1971) Properties of 2-decylcitrate synthase from *Penicillium spiculisporum* Lehman. Eur. J. Biochem. 22: 104-114.

Måhlén, A. (1973) Purification and some properties of 2-decylhomocitrate synthase from *Penicillium spiculisporum*. Eur. J. Biochem. 38: 32-39.

Måhlén, A. y Gatenbeck, S. (1968) A metabolic variation in *Penicillium spiculisporum* Lehman. II. Purification and some properties of the enzyme synthesizing (-)-decylcitric acid. Acta Chem. Scand. 22: 2617-2623.

Malik, V.S. (1982) Aspects of biotechnology in steroid biotransformation. Z. Allg. Mikrobiol. 22: 261-266.

Marsheck, W.J., Kraychy, S. y Muir, R.D. (1972) Microbial degradation of sterols. Appl. Microbiol. 23: 72-77.

Martínez, A.T. (2002) Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. Enzyme Microb. Technol. 30: 425-444.

Martínez, A.T. (2006) Biodegradation of lignocellulosics: Microbiological, chemical and enzymatic aspects. Proc. IBBS-13 (13th Intern. Biodeter. Biodegr. Symp.), Madrid, 4-9 September.

Martínez, A.T., Barrasa, J.M., Martínez, M.J., Almendros, G., Blanco, M. y González, A.E. (1995) *Ganoderma australe*: A fungus responsible for extensive delignification of some austral hardwoods. En: *Ganoderma*. Systematics, Phytopathology and Pharmacology. (Eds.: Buchanan, P.K., Hseu, R.S. y Moncalvo, J.M.), National Taiwan University, Taipei, pp. 67-77.

Martínez, A.T., Barrasa, J.M., Prieto, A. y Blanco, M.N. (1991) Fatty acid composition and taxonomic status of *Ganoderma australe* from Southern Chile. Mycol. Res. 95: 782-784.

Martínez, A.T., Camarero, S., Guillén, F., Gutiérrez, A., Muñoz, C., Varela, E., Martínez, M.J., Barrasa, J.M., Ruel, K. y Pelayo, M. (1994) Progress in biopulping of non-woody materials: Chemical, enzymatic and ultrastructural aspects of wheat-straw delignification with ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*. FEMS Microbiol. Rev. 13: 265-274.

Martínez, A.T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F.J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, M.J., Gutiérrez, A. y del Río, J.C. (2005) Biodegradation of lignocellulosics: Microbiological, chemical and enzymatic aspects of fungal attack to lignin. Intern. Microbiol. 8: 195-204.

Martínez, M.J., Barrasa, J.M., Gutiérrez, A., del Río, J.C. y Martínez, A.T. (1999) Fungal screening for biological removal of extractives from *Eucalyptus globulus* Labill. wood. Can. J. Bot. 77: 1513-1522.

Martínez, M.J., Ruiz-Dueñas, F.J., Guillén, F. y Martínez, A.T. (1996) Purification and catalytic properties of two manganese-peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. Eur. J. Biochem. 237: 424-432.

Matsukura, M., Fujita, Y. y Sakaguchi, H. (1990) On the use of Resinase™ A for pitch control. Novo Publication A-6122: 1-7.

Mattsson, K., Tana, J., Engström, C., Hemming, J. y Lehtinen, K.J. (2001) Effects of wood-related sterols on the offspring of the viviparous blenny, *Zoarces viviparus* L. Ecotox. Environ. Safe. 49: 122-130.

McCloskey, J.A. y McClelland, M.J. (1965) Mass spectra of O-isopropylidene derivatives of unsaturated fatty acids. J. Am. Chem. Soc. 87: 5090-5093.

McCorkindale, N.J., Blackstock, W.P., Johnston, G.A., Roy, T.P. y Troke, J.A. (1978) In Proceedings of the 11th IUPAC International Symposium on Chemistry of Natural Products 1: 151

Mendonca, R., Ferraz, A., Kordsachia, O. y Patt, R. (2004) Alkaline sulfite/anthraquinone pulping of pine wood chips biotreated with *Ceriporiopsis subvermispora*. J. Chem. Technol. Biotechnol. 79: 584-589.

Messner, K. y Srebotnik, E. (1994) Biopulping - An overview of developments in an environmentally safe paper-making technology. FEMS Microbiol. Rev. 13: 351-364.

Miyata, J.T., Tyler, V.E. y Brady, L.R. (1966) The occurrence of norcaperatic acid in *Cantharellus floccosus*. Lloydia 29: 43.

Moen, M.A. y Hammel, K.E. (1994) Lipid peroxidation by the manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* is the basis for phenanthrene oxidation by the intact fungus. Appl. Environ. Microbiol. 60: 1956-1961.

Muñoz, C., Guillén, F., Martínez, A.T. y Martínez, M.J. (1997) Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii:* Characterization, catalytic properties and participation in activation of molecular oxygen and Mn^{2+} oxidation. Appl. Environ. Microbiol. 63: 2166-2174.

Okawa, Y. y Yamaguchi, T. (1977) Studies on sterol-ester hydrolase from *Fusarium oxysporum*. I. Partial purification and properties. J. Biochem. (Tokyo) 81: 1209-1215.

Otjen, L. y Blanchette, R.A. (1986) A discussion of microstructural changes in wood during decomposition by white rot basidiomycetes. Can. J. Bot. 64: 905-911.

Paice, M.G., Bourbonnais, R., Reid, I.D., Archibald, F.S. y Jurasek, L. (1995) Oxidative bleaching enzymes: A review. J. Pulp Paper Sci. 21: J280-J284.

Paszczynski, A., Crawford, R.L. y Huynh, V.-B. (1988) Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: Purification. Methods Enzymol. 161: 264-270.

Pérez-Boada, M., Doyle, W.A., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., Martínez, A.T. y Smith, A.T. (2002) Expression of *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase in *Escherichia coli* and optimisation of *in vitro* folding. Enzyme Microb. Technol. 30: 518-524.

Périé, F.H. y Gold, M.H. (1991) Manganese regulation of manganese peroxidase expression and lignin degradation by the white rot fungus *Dichomitus squalens*. Appl. Environ. Microbiol. 57: 2240-2245.

Peterson, G.E. y Davis, J.R. (1964) Cholesterol utilization by *Streptomices spp*. Steroids 4:5: 677-687.

Rayner, A.D. (1977) Fungal colonization of hardwood stumps from natural sources. II. Basidiomycetes. Trans. Br. Mycol. Soc. 69: 303-312.

Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J. y Martínez, A.T. (1999) Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. Mol. Microbiol. 31: 223-236.

Rüttimann, C., Schwember, E., Salas, L., Cullen, D. y Vicuña, R. (1992) Ligninolytic enzymes of the white rot basidiomycetes *Phlebia brevispora* and *Ceriporiopsis subvermispora*. Biotechnol. Appl. Biochem. 16: 64-76.

Sancholle, M. y Lösel, D. (1996) Lipids in fungal biotechnology. En: The Mycota. (Ed.: Kück, U.), Springer Verlag, Berlin, pp. 339-367.

Schwarze, F.W.M.R., Engels, J. y Mattheck, C. (2000) Fungal strategies of decay in trees. Springer, Berlin.

Shaw, R. (1966) The polyunsaturated fatty acids of microorganisms. Adv. Lipid Res. 4: 107-174.

Singh, S.B., Jayasuriya, H., Silverman, K.C., Bonfiglio, C.A., Williamson, J.M. y Lingham, R.B. (2000) Efficient syntheses, human and yeast farnesyl-protein transferase inhibitory activities of chaetomellic acids and analogues. Bioorg. Med. Chem. 8: 571-580.

Singh, S.B., Zink, D.L., Liesch, J.M., Goetz, M.A., Jenkins, R.G., Nallin-Omstead, M., Silverman, K.C., Bills, G.F., Mosley, R.T., Gibbs, J.B., Albers-Schonberg, G. y Lingham, R.B. (1993) Isolation and structure of chaetomellic acids A and B from *Chaetomella acutiseta*: Farnesyl pyrophosphate mimic inhibitors of Ras farnesyl-protein transferase. Tetrahedron 49: 5917-5926.

Srebotnik, E. y Boisson, J.N. (2005) Peroxidation of linoleic acid during the oxidation of phenols by fungal laccase. Enzyme Microb. Technol. 36: 785-789.

Srebotnik, E., Jensen, K.A., Kawai, S. y Hammel, K.E. (1997) Evidence that *Ceriporiopsis subvermispora* degrades nonphenolic lignin structures by a one-electron-oxidation mechanism. Appl. Environ. Microbiol. 63: 4435-4440.

Stadtman, C., Cherkes A. y Anfinsen C.B. (1953) Studies of the microbiological degradation of cholesterol. Steroids.511-523.

Swan, B. y Åkerblom, I.S. (1967) Wood extractives from *Eucalyptus globulus* Labill. Sven. Papperstidn. 70: 239-244.

Tabuchi, T. (1981) Itaconic acid fermentation by a yeast belonging to the genus *candida*. Agric. Biol. Chem. 45: 475-479.

Taketani, S., Nishino, T. y Katsuki, H. (1981) Purification and properties of sterol-ester hydrolase from *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biochem. (Tokyo) 89: 1667-1673.

Takuo, K., Takashi, S. y Toshihiko, O. (1981) New Methods and reagents in organic synthesis. A simple efficient preparation of methyl esters with trimethylsiliyldiazomethane and its application to gas chromatographic analysis of fatty acids. Chem. Pharm. Bull. 29: 1478.

Tappi. (2004) 2004-2005 TAPPI Test Methods. TAPPI Press, Norcoss, GA 30092, USA.

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

Turner, W.B. (1971) Fungal metabolites I. Academic Press, London.

Turner, W.B. y Aldridge, D.C. (1983) Fungal metabolites II. Academic Press, London.

Viikari, L., Kantelinen, A., Sundquist, J. y Linko, M. (1994) Xylanases in bleaching - from an idea to the industry. FEMS Microbiol. Rev. 13: 335-350.

Vilella, D., Sanchez, M., Platas, G., Salazar, O., Genilloud, O., Royo, I., Cascales, C., Martin, I., Diez, T., Silverman, K.C., Lingham, R.B., Singh, S.B., Jayasuriya, H. y Pelaez, F. (2000) Inhibitors of farnesylation of Ras from a microbial natural products screening program. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 25: 315-327.

Wariishi, H., Valli, K. y Gold, M.H. (1992) Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators. J. Biol. Chem. 267: 23688-23695.

Watanabe, T., Enoki, M., Sato, S., Honda, Y., Kuwahara, M., Shirai, N. y Messner, K. (2001) Free radical process controlled by manganese peroxidase and lipid-related metabolites produced by *Ceriporiopsis subvermispora*. IRG/WP 01-10412.

Watanabe, T., Katayama, S., Enoki, M., Honda, Y.H. y Kuwahara, M. (2000) Formation of acyl radical in lipid peroxidation of linoleic acid by manganese-dependent peroxidase from *Ceriporiopsis subvermispora* and *Bjerkandera adusta*. Eur. J. Biochem. 267: 4222-4231.

Watanabe, T., Teranishi, H., Honda, Y. y Kuwahara, M. (2002) A selective lignin-degrading fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*, produces alkylitaconates that inhibit the production of a cellulolytic active oxygen species, hydroxyl radical in the presence of iron and H_2O_2. Biochem. Biophys. Res. Commun. 297: 918.

Willke, K. y Vorlop, D. (2001) Biotechnological production of Itaconic acid. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56: 289-295.

Young, R.A. y Akhtar, M. (1998) Environmentally-friendly technologies for the pulp and paper industry. John Wiley and Sons, New York.

Zabel, R. y Morrell, J. (1992) Wood Microbiology: Decay and its prevention. Academic Press, London.

Zapanta, L.S. y Tien, M. (1997) The roles of veratryl alcohol and oxalate in fungal lignin degradation. J. Biotechnol. 53: 93-102.