

# PRIMERA LIGNINA PEROXIDASA IDENTIFICADA EN AGARICALES: DESDE LA IDENTIFICACIÓN DEL GEN EN EL GENOMA DE *Agrocybe pediades* HASTA LA DEMOSTRACIÓN DE SU CAPACIDAD PARA OXIDAR Y TRANSFORMAR LA LIGNINA

M.I. SÁNCHEZ-RUIZ<sup>1</sup>, I. AYUSO-FERNÁNDEZ<sup>1</sup>, J. RENCORET<sup>2</sup>; A.M. GONZÁLEZ-RAMÍREZ<sup>1</sup>, D. LINDE<sup>1</sup>, I. DAVÓ-SIGUERO<sup>1</sup>,  
A. ROMERO<sup>1</sup>, A. GUTIÉRREZ<sup>2</sup>, A.T. MARTÍNEZ<sup>1</sup>; F.J. RUIZ-DUEÑAS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS "MARGARITA SALAS" (CIB), CSIC, RAMIRO DE MAEZTU 9, E-28040, MADRID

<sup>2</sup>INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGÍA DE SEVILLA (IRNAS), CSIC, AVENIDA REINA MERCEDES 10, E-41012, SEVILLA

AGRADECIMIENTOS. Este trabajo ha sido financiado por el proyecto GENOBIOREF (BIO2017-86559-R) del Ministerio de Ciencia e Innovación (cofinanciado con fondos FEDER), por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (PIE-202120E019), y por la plataforma SusPlast



La biomasa vegetal es una materia prima renovable muy abundante de interés para el desarrollo del concepto de biorrefinería de la lignocelulosa. Está compuesta mayoritariamente por los polisacáridos celulosa y hemicelulosa, y por el polímero aromático de lignina. A diferencia de la celulosa, utilizada en la industria de la pasta y el papel, y en la producción de compuestos de valor añadido y biocombustibles, la lignina ha sido tradicionalmente infrutilizada, debido principalmente a su recalcitrancia. Por esta razón, los organismos capaces de modificar la lignina en la naturaleza están siendo ampliamente estudiados, ya sea para una degradación más ecológica del polímero o para la producción de compuestos aromáticos de valor añadido.

Los hongos de podredumbre blanca son los únicos organismos capaces de mineralizar significativamente la lignina. Utilizan una serie de herramientas enzimáticas oxidativas para su degradación extracelular, entre las que las peroxidases ligninolíticas juegan un papel clave. Estas enzimas son de interés biotecnológico para las biorrefinerías de la lignocelulosa. En concreto, las lignina peroxidases (LiPs) han recibido una atención especial por su capacidad para oxidar directamente este polímero aromático.

Hasta ahora las LiPs solo se habían identificado en basidiomicetos del orden Polyporales, donde se incluyen la mayoría de las especies degradadoras de madera. Tras la secuenciación del genoma de *Agrocybe pediades* (Fig. 1A), caracterizado por crecer sobre hojarasca, identificamos la primera enzima ligninolítica de esta familia (ApeLiP) en un hongo del orden Agaricales. La secuencia de ApeLiP se clonó, expresó en cuerpos de inclusión en *Escherichia coli* y replegó *in vitro*, obteniéndose así la enzima activa. Los estudios cristallográficos revelaron que ApeLiP está estructuralmente relacionada con las LiPs de Polyporales, incluyendo un grupo hemo como centro activo y un triptófano (Trp166) expuesto al solvente (Fig. 1B).

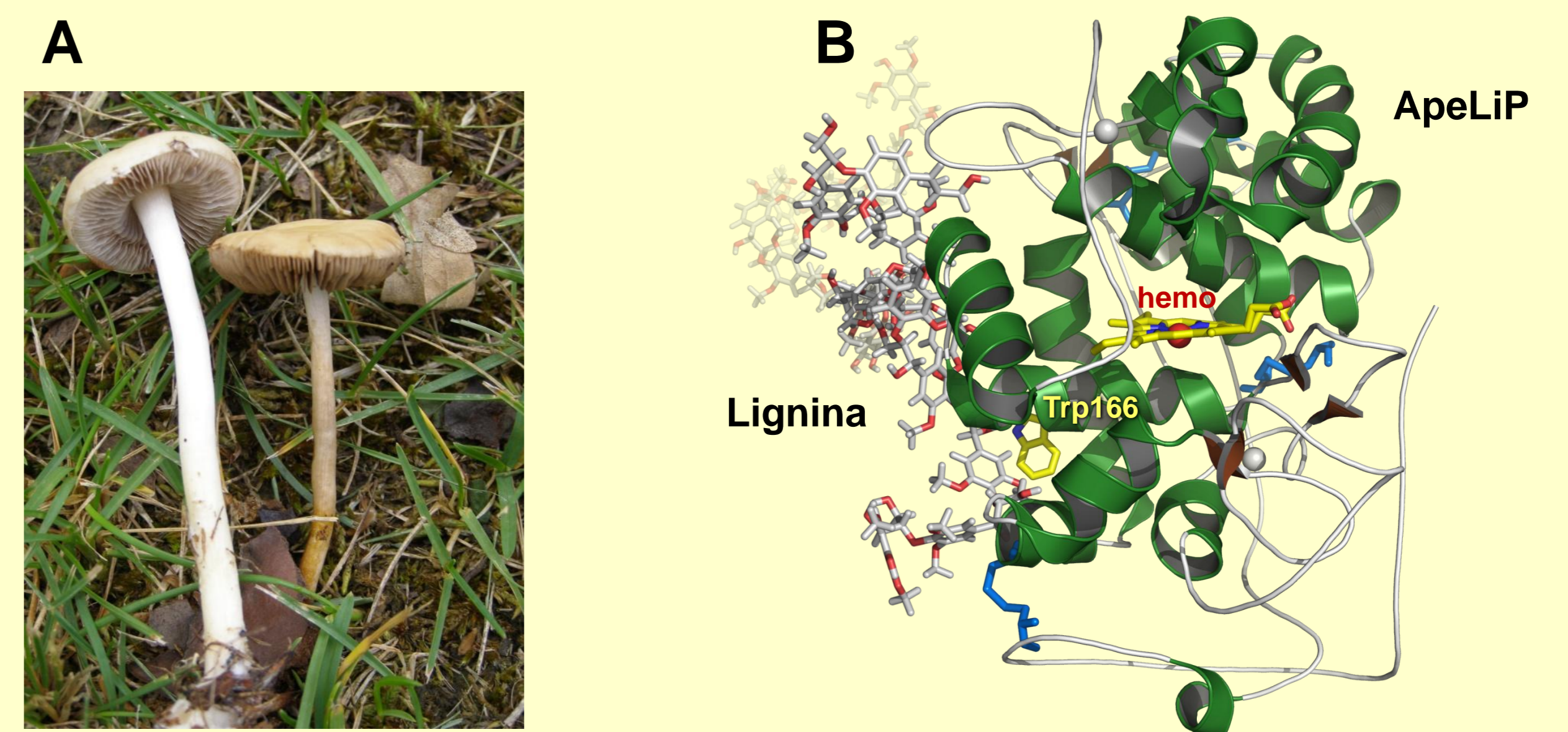


Fig. 1. (A) Cuerpos fructíferos de *Agrocybe pediades*; y (B) Estructura cristalina de la lignina peroxidasa (ApeLiP) (PDB: 7O05) codificada en su genoma (incluye un modelo molecular del polímero de lignina en contacto directo con el Trp166 expuesto al solvente).

ApeLiP es capaz de oxidar compuestos modelo de lignina fenólicos (2,6 dimetoxifenol, DMP) y no fenólicos (alcohol 3,4-dimetoxibencílico, VA), así como colorantes de alto (reactive Black 5, RB5) y bajo (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato, ABTS) potencial redox (Tabla 1). La oxidación del ABTS se ajustó a una curva cinética bifásica a partir de la cual se dedujo la existencia de dos sitios catalíticos, de alta y baja eficiencia, para este sustrato. La actividad sobre DMP, VA, RB5 (así como la oxidación de alta eficiencia del ABTS) se asoció al triptófano catalítico (Trp166) expuesto al solvente (Fig. 1B) tras verificar la pérdida de la capacidad oxidativa de la variante W166A sobre estos sustratos (Tabla 1).

Tabla 1. Constantes cinéticas del estado estacionario  $-K_M$  ( $\mu\text{M}$ ),  $k_{\text{cat}}$  ( $\text{s}^{-1}$ ) and  $k_{\text{cat}}/K_M$  ( $\text{s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$ ) para las reacciones de ApeLiP y su variante W166A con ABTS, DMP, VA y RB5

		ABTS <sup>a</sup>				
		Baja Eficiencia	Alta Eficiencia	DMP	VA	RB5
ApeLiP	$K_M$	693 ± 63	8.1 ± 0.6	37 ± 5.6	(29.6 ± 4.6) × 10 <sup>3</sup>	14 ± 1.4
	$k_{\text{cat}}$	179 ± 5	42 ± 1.8	68.6 ± 2.8	4.3 ± 0.3	21 ± 1.5
	$k_{\text{cat}}/K_M$	258 ± 25	5,130 ± 460	1,910 ± 310	0.15 ± 0.03	1,540 ± 115
W166A	$K_M$	1,150 ± 190	-	-	-	-
	$k_{\text{cat}}$	117 ± 10	-	-	-	-
	$k_{\text{cat}}/K_M$	102 ± 19	-	-	-	-

Reacciones en tartrato sódico 100 mM a 25°C en condiciones de saturación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.4 mM para ApeLiP y 1 mM para W166A). La oxidación de ABTS, DMP y RB5 se registró a pH 3.0, y la oxidación de VA a pH 4.0. <sup>a</sup>Cinéticas bifásicas que dieron lugar a dos juegos de constantes. -, sin actividad.

Con objeto de evaluar la contribución de ApeLiP a las capacidades ligninolíticas de *A. pediades*, analizamos la capacidad de la enzima para sustraer electrones de la lignina mediante espectrofotometría rápida de flujo detenido. Para ello nos centramos en la etapa limitante de su ciclo catalítico utilizando, como sustrato, lignosulfonatos nativos y acetilados (con los grupos hidroxilos de la fracción fenólica minoritaria bloqueados por enlaces éster) de madera blanda (*Picea abies*) y de madera dura (*Eucalyptus grandis*). La Tabla 2 muestra que ApeLiP oxida los lignosulfonatos nativos y acetilados, aunque es mejor actuando sobre los nativos, con valores de eficiencia ( $k_{3\text{app}}$ ) similares para las ligninas de madera blanda y dura. Comparada con otras peroxidases ligninolíticas, ApeLiP es en general más eficiente que la VP de *Pleurotus eryngii* y la LiP de *Phanerochaete chrysosporium* oxidando los lignosulfonatos nativos y acetilados (Tabla 2). La pérdida de actividad de la variante W166A confirmó el papel clave del Trp166 en la oxidación de lignina tanto fenólica como no fenólica.

Tabla 2. Constantes cinéticas del estado transitorio  $-K_{D3}$  ( $\mu\text{M}$ ),  $k_3$  ( $\text{s}^{-1}$ ) and  $k_{3\text{app}}$  ( $\text{s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$ ) para la reducción del CII (etapa limitante del ciclo catalítico) de ApeLiP, su variante W166A, VPL de *Pleurotus eryngii* y LiPA (isoenzima H8) de *Phanerochaete chrysosporium* por lignosulfonatos nativos y acetilados de madera blanda (*P. abies*) y dura (*E. grandis*).

		Lignina de madera blanda		Lignina de madera dura	
		Nativa	Acetilada	Nativa	Acetilada
ApeLiP	$K_{D3}$	ns <sup>a</sup>	31 ± 6.9	156 ± 25	89 ± 14
	$k_3$	ns	26 ± 1.7	163 ± 38	56 ± 4.6
	$k_{3\text{app}}$	926 ± 47	830 ± 195	957 ± 270	630 ± 111
W166A	$K_{D3}$	-	-	-	-
	$k_3$	-	-	-	-
	$k_{3\text{app}}$	0	0	0	0
<i>P. eryngii</i> VPL	$K_{D3}$	143 ± 19	24 ± 1.9	14 ± 1	21 ± 2.5
	$k_3$	48 ± 2	14 ± 0.4	14 ± 2	12 ± 0.5
	$k_{3\text{app}}$	340 ± 30	599 ± 31	990 ± 80	592 ± 52
<i>P. chrysosporium</i> LiPA	$K_{D3}$	95 ± 26	na <sup>b</sup>	19 ± 2	na
	$k_3$	25 ± 4	na	14 ± 0	na
	$k_{3\text{app}}$	263 ± 83	na	764 ± 86	na

Reacciones en tartrato sódico 0,1 M, pH 3, a 25°C. <sup>a</sup>ns, cinética no saturada. <sup>b</sup>na, no disponible.

Finalmente se analizaron los cambios en la estructura de los lignosulfonatos tratados con la enzima durante 24 h mediante espectroscopia 2D-NMR HSQC. La Fig. 2 muestra las señales de las principales unidades aromáticas, y de los enlaces entre las cadenas laterales de las unidades que componen los lignosulfonatos de las maderas dura y blanda, antes y después del tratamiento enzimático. Un análisis semicuantitativo de las señales aromáticas, referido al control sin enzima, permitió calcular la descomposición de la lignina y la modificación de la relación S/G y de los enlaces de las cadenas laterales. La acción de ApeLiP provocó una disminución del 71% de las señales aromáticas de las unidades G en el lignosulfonato de madera blanda y una disminución aún mayor (92% de las unidades G y 82% de las unidades S) en el lignosulfonato de madera dura (su relación S/G pasó de 2,2 a 4,7). Sin embargo, los enlaces de la cadena lateral por unidad aromática apenas se modificaron (del 38% al 31% en el lignosulfonato de madera blanda y del 35% al 32% en el lignosulfonato de madera dura) y las abundancias relativas de las diferentes subestructuras (A, B y C) básicamente se mantuvieron.

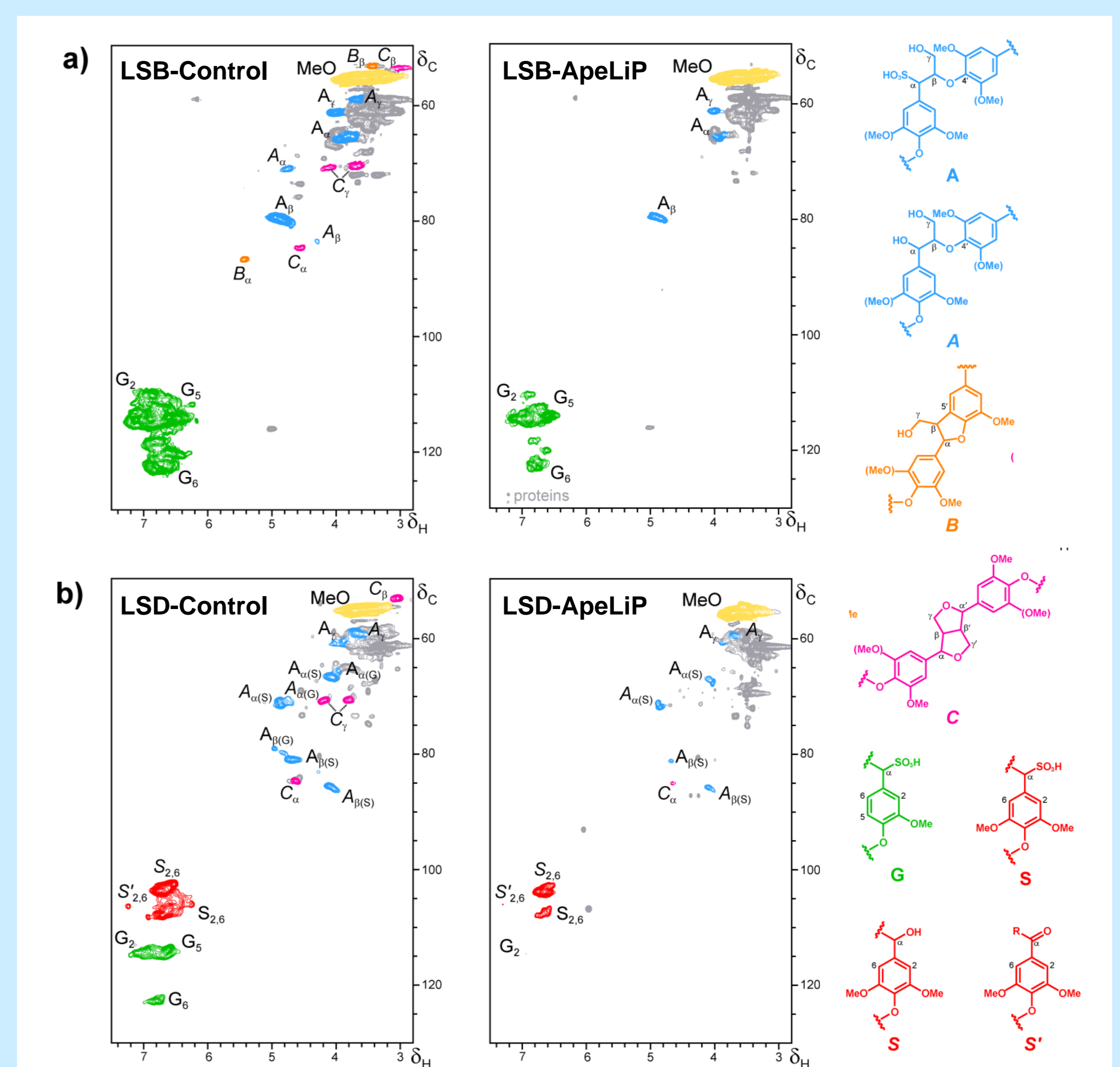


Fig. 2. Espectros normalizados de resonancia magnética nuclear (RMN) HSQC de lignosulfonatos de madera blanda, LSB (*P. abies*, a) y de madera dura, LSD (*E. grandis*, b) tratados con ApeLiP durante 24 horas (derecha) y no tratados (izquierda), con las fórmulas de las principales subestructuras indicadas a la derecha. Las señales corresponden a las correlaciones <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C en las diferentes posiciones de las unidades guayacilo Cα-sulfonadas (G); unidades siringilo Cα-sulfonadas, no-sulfonadas y Cα-oxidadas (S, S', respectivamente); subestructuras β-O-4' Cα-sulfonadas y no sulfonadas (A y A', respectivamente), subestructuras de fenilcumarano (B) y resinol (C); y metoxilos (MeO). Los espectros corresponden a la misma cantidad inicial de lignosulfonato (40 mg) en las muestras control y tratadas con enzimas, y sus intensidades normalizadas se refieren a la señal (no mostrada) del DMSO residual no deuterado.

**Conclusiones.** La estructura cristalina, la caracterización cinética y el estudio exhaustivo de su capacidad ligninolítica muestran que ApeLiP es capaz de oxidar tanto compuestos modelo de lignina fenólica y no fenólica como lignina real, esta última en grado similar o superior a otras peroxidases ligninolíticas conocidas. Por lo tanto, no sólo los Polyporales degradadores de madera, sino también los hongos Agaricales, tienen enzimas con gran relevancia tanto para el reciclaje de carbono en la naturaleza como para la modificación biotecnológica de la lignina.