

Tesis de Posgrado

Biodegradación de materiales lignocelulósicos por *Trametes trogii* (Aphylllophorales, Basidiomycetes)

Levin, Laura Noemí

1998

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Levin, Laura Noemí. (1998). Biodegradación de materiales lignocelulósicos por *Trametes trogii* (Aphylllophorales, Basidiomycetes). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3078_Levin.pdf

Cita tipo Chicago:

Levin, Laura Noemí. "Biodegradación de materiales lignocelulósicos por *Trametes trogii* (Aphylllophorales, Basidiomycetes)". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1998. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3078_Levin.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Biodegradación de materiales lignocelulósicos por *Trametes trogii*
(Aphyllophorales, Basidiomycetes).

Lic. Laura Noemí Levin

Directora : Prof. Dra. Flavia Forchiassin

TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR
DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Departamento de Ciencias Biológicas
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires

1998

2 26
#3 07 8

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Biodegradation of lignocellulosic materials by *Trametes trogii*
(Aphylophorales, Basidiomycetes).

Lic. Laura Noemí Levin

Director: Dr. Flavia Forchiassin

DOCTORAL THESIS

Departamento de Ciencias Biológicas
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires

1998

A la memoria de mi madre, quién me apoyó en éste y cada uno de mis otros proyectos, y me ayudó a criarlos con muchísimo amor.

AGRADECIMIENTOS.

A Flavia por haberme guiado y apoyado a lo largo de este trabajo de Tesis, por su eterna paciencia y buena disposición.

A María Esther, por hacerme un lugar entre su gente; a ellas y a todos mis compañeros de laboratorio: Marce, Diana, Pauli, Andrea, Teresa, Ale, Oscar, Luis, gracias por la compañía diaria, por su amistad, ayuda y comprensión, siempre y sobre todo en estos últimos “tiempos tormentosos” de mi vida.

A María Delia, quién me acogió en su laboratorio, me escuchó, aconsejó y apoyó durante todos estos años, un agradecimiento muy especial.

A Marylin Castro por su dirección en los estudios anatómicos y por esa hermosa amistad que nació entre nosotras.

A la Dra. Elena Ancibor por permitirme utilizar las instalaciones del laboratorio de Anatomía Vegetal, y por sus sabios consejos.

A los vecinos de los laboratorios 5 y 12 y aledaños por toda la ayuda prestada.

A todos los docentes e investigadores que han contribuido a mi formación, y en especial a los Dres. J.E. Wright y Miki Galvagno, por darme la oportunidad de formar parte del grupo de trabajo en Micología de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad de Buenos Aires y dar mis primeros pasos en investigación.

A la UBA, por el lugar de trabajo y la financiación de este proyecto, a través de las becas y subsidios.

A mis queridos amigos, y en especial a María Elisa, mi compañera de siempre, por el End Notes y por miles de otras cosas; a Marisa, mi hermana del alma, por todo.

A Marisol por su ayuda con la logística del hogar.

A mi querida y linda familia: papá, Alejandro, Mayra, Martín y Nicolás, por su inmenso amor, eterno apoyo e infinita paciencia, y sobre todo por la suerte de tenerlos.

A todos, muchas gracias.

RESUMEN

Biodegradación de materiales lignocelulósicos por *Trametes trogii* (Aphyllophorales, Basidiomycetes).

Los materiales lignocelulósicos se explotan en industrias tales como la madera, el papel y la agroindustria, cuyos residuos podrían transformarse en productos utilizables por bioconversión. Dentro de los hongos existen algunos con mayor capacidad degradativa de lignina, los que producen “pudrición blanca”. Uno de ellos es *Trametes trogii*. Experiencias previas en biopulpado con la cepa utilizada en este estudio, demostraron que reducía el consumo de energía y mejoraba la calidad del papel obtenido.

Este trabajo se inició con el objetivo de comprobar si dicho hongo es capaz de producir enzimas lignocelulolíticas *in vitro*, las cuales podrían utilizarse en procesos de bioconversión de materiales lignocelulósicos de desecho y otros procesos biotecnológicos. El mismo comprende la detección y el estudio de las enzimas involucradas en la conversión de materiales lignocelulolíticos por *T. trogii* (celulasas, xilanasas, pectinasas y enzimas que intervienen en la degradación de lignina), la investigación de las condiciones nutricionales y de cultivo que favorecen la producción de las distintas actividades enzimáticas, así como una caracterización de dichas actividades enzimáticas en el extracto crudo. Previamente a la aplicación industrial de los hongos de pudrición blanca, es necesario investigar el proceso de degradación y como éste afecta a los diferentes tipos celulares, por ello paralelamente se realizaron ensayos de degradación sobre madera y analizaron los cambios estructurales y ultraestructurales producidos por la acción de *T. trogii*.

Los resultados obtenidos permiten afirmar que *T. trogii* bajo condiciones adecuadas produce los sistemas enzimáticos extracelulares necesarios para degradar activamente los principales componentes de las paredes celulares de las plantas superiores. Teniendo en cuenta los altos títulos y la tolerancia a situaciones extremas registrados para algunas de dichas enzimas, se podría considerar que constituye una buena fuente para la obtención de los sistemas enzimáticos empleados en diferentes procesos de bioconversión.

Palabras clave: *Trametes trogii*, Aphyllophorales, Basidiomycetes, pudrición blanca, celulasas, xilanasas, pectinasas, ligninasas, estudios anatómicos.

ABSTRACT

Biodegradation of lignocellulosic materials by *Trametes trogii* (Aphyllphorales, Basidiomycetes).

Lignocellulosic materials are exploited in wood, paper and agroindustries, whose residues might be transformed in utilizable products by bioconversion. White-rot Basidiomycetes are the only type of wood-rotting fungi that can attack efficiently all wood components, including lignin. One of them is *Trametes trogii*. Biopulping research with the strain used in this study, showed that it reduces energy input and significantly improves strength characteristics of finished paper.

The aim of the present work was proving its ability to produce lignocellulolytic enzymes *in vitro*, which could be used in biotechnological processes. It comprises the detection and study of the enzymes involved in the conversion of lignocellulosic materials by *T. trogii* (cellulases, xylanases, pectinases and enzymes which participate in lignin degradation), the investigation of the nutritional and culture conditions that promote the production of such activities, as well as their characterization in a crude extract. Prior to application of white-rotters for industrial use, knowledge of how these fungi degrade different cells and the process responsible for the degradation is necessary, because of this, degradation assays on wood were done, and structural and ultrastructural changes caused by the action of *T. trogii* were analyzed.

The results obtained showed that under appropriate conditions *T. trogii* is capable of producing the enzymatic systems required to degrade the main components of plant cell walls. Taking into account the high titers and tolerance to adverse situations displayed by some of these enzymes, *T. trogii* might be considered a good source for the obtention of enzymatic systems employed in bioconversion processes.

Key words: *Trametes trogii*, Aphyllphorales, Basidiomycetes, white-rot, cellulases, xylanases, pectinases, ligninases, anatomical studies.

INDICE

Página

1. INTRODUCCION	1
1.1. CONSIDERACIONES GENERALES	1
1.2. ESTRUCTURA Y COMPOSICION QUIMICA DE LAS LIGNOCELULOSAS.....	5
1.2.1. Celulosa	8
1.2.2. Hemicelulosas.....	9
1.2.3. Compuestos pécticos	11
1.2.4. Lignina.....	12
1.3. BIODEGRADACION DE MATERIALES LIGNOCELULOSICOS.....	15
1.3.1. Enzimas que intervienen en la degradación de las lignocelulosas .	15
1.3.1.1. Celulasas.....	15
1.3.1.2. Xilanasas.....	25
1.3.1.3. Pectinasas	29
1.3.1.4. Enzimas involucradas en la degradación de lignina.....	32
1.3.2. Tipos de deterioro resultantes de la degradación fúngica de la madera.....	40
1.3.2.1. Pudrición blanca.....	41
1.3.2.2. Pudrición blanda.....	45
1.3.2.3. Pudrición castaña	47
1.3.3. Factores que afectan la degradación de las lignocelulosas.....	50
1.3.4. Consecuencias económicas del proceso de biodegradación de lignocelulosas (por hongos causantes de pudrición blanca).....	55
1.3.4.1. Deterioro de la madera	55
1.3.4.2. Pulpado	55
1.3.4.3. Blanqueado	56
1.3.4.4. Control de la polución.....	56
1.3.4.5. Mejoramiento de la digestibilidad	57

1.3.4.6. Bioconversión de la lignina.....	57
1.4. <i>TRAMETES TROGII</i> BERK. (POLYPORACEAE, APHYLLOPHORALES, BASIDIOMYCETES). DESCRIPCION	58
2. OBJETIVOS	60
3. MATERIALES Y METODOS.....	61
3.1. ORGANISMO	61
3.2. MANTENIMIENTO DE LA CEPA Y OBTENCION DEL INOCULO ..	61
3.3. MEDIOS DE CULTIVO	61
3.3.1. Medios sólidos.....	61
3.3.1.1. Medio Agar-Agua.....	61
3.3.1.2. Medio Malta	61
3.3.1.3. Medio Malta (Nobles)	62
3.3.2. Medios líquidos	62
3.3.2.1. Medio sintético basal.....	62
a- Fuentes de carbono.....	62
b- Fuentes de nitrógeno.....	63
c- Surfactantes	64
d- pH.....	64
3.3.2.2. Medio de cultivo seminatural.....	64
3.4. PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.....	64
3.5. CONDICIONES DE CULTIVO	65
3.6. METODOS ANALITICOS.....	66
3.6.1. Cosecha del micelio.....	66
3.6.2. Estimación del crecimiento vegetativo	66
a. Peso seco del micelio	66
b. Proteínas totales de micelio.....	66
3.6.3. Dosaje de proteínas en el sobrenadante	66

3.6.4.	Determinación de azúcares reductores.....	67
3.6.5.	Determinación del pH.....	67
3.6.6.	Medición de las actividades enzimáticas	67
3.6.6.1.	Actividades enzimáticas celulolíticas	67
a.	Actividad endo- β -D-1,4-glucanasa (EC 3.2.1.4).....	67
b.	Actividad exo- β -D-1,4-glucanasa (EC 3.2.1.91)	68
c.	Actividad β -glucosidasa (EC 3.2.1.21).....	68
3.6.6.2.	Actividades enzimáticas xilanolíticas	69
a.	Actividad endoxilanasas (EC 3.2.1.8).....	69
b.	Actividad β -xilosidasa (EC 3.2.1.37).....	69
3.6.6.3.	Actividades enzimáticas pectinolíticas	70
a,b.	Actividades poligalacturonásicas (EC 3.2.1.82)	70
c.	Actividad pectin liasa (EC 4.2.2.10).....	70
d.	Actividad pectato liasa (EC 4.2.2.9).....	70
3.6.6.4.	Actividades enzimáticas ligninolíticas.....	71
a.	Actividad lignin peroxidasa (LiP) (EC 1.11.1.14)	71
b.	Actividad lacasa (EC 1.10.3.2).....	71
c.	Actividad Mn-peroxidasa (MnP) (EC 1.11.1.13)	72
d.	Actividad Peroxidasa Mn-independiente (MIP)	72
3.6.6.5.	Actividades enzimáticas productoras de H ₂ O ₂	72
a.	Extracelulares:	
	Actividad glioxal oxidasa (GLOX) (EC 1.2.3.5)	72
b.	Intracelulares:	
	Actividad glucosa oxidasa	73
3.7.	CARACTERIZACIONES BIOQUIMICAS.....	74
3.7.1.	pH óptimo.	74
3.7.2.	Temperatura óptima.....	75
3.8.	ENSAYOS DE PUDRICION <i>IN VITRO</i> EN MADERA.....	75
3.8.1.	Pérdida de peso seco.....	75
3.8.2.	Análisis microscópico de las maderas	76

3.9. RESULTADOS	76
4. RESULTADOS Y DISCUSION.....	77
4.1. CELULASAS	77
4.1.1. Cinética de crecimiento y producción enzimática en condiciones estáticas y de agitación	77
4.1.2. Adición de un cosustrato	82
4.1.3. Efecto de la fuente de carbono	84
4.1.4. Efecto de la variación de la concentración de la fuente carbonada ..	89
4.1.5. Efecto de las fuentes nitrogenadas sobre la producción de celulasas.....	89
4.1.6. Efecto de la variación de la concentración de la fuente nitrogenada	95
4.1.7. Cinética de crecimiento y producción enzimática en un medio óptimo	95
4.1.8. Efecto de la temperatura y el pH sobre la producción enzimática ..	98
4.1.9. Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad enzimática.....	100
4.2. XILANASAS.....	102
4.2.1. Cinética de crecimiento y producción enzimática	102
4.2.2. Efecto de la fuente de carbono	102
4.2.3. Efecto de la variación de la concentración de la fuente de carbono	108
4.2.4. Efecto de la fuente nitrogenada.....	109
4.2.5. Efecto de la temperatura y el pH sobre la producción enzimática ..	109
4.2.6. Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad enzimática.....	111
4.3. PECTINASAS	114
4.3.1. Cinética de crecimiento y producción enzimática con diferentes fuentes de carbono	114
4.3.2. Cinética de crecimiento y producción enzimática con diferentes concentraciones de pectina.....	120

4.3.3.	Efecto de diferentes fuentes nitrogenadas.....	122
4.3.4.	Efecto de surfactantes.....	123
4.3.5.	Efecto del pH y la temperatura sobre la producción enzimática ...	126
4.4.	ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA DEGRADACION DE LIGNINA.....	129
4.4.1.	Cinética de crecimiento y producción enzimática en un medio sintético	129
4.4.2.	Cinética de producción enzimática en un medio seminatural.....	134
4.5.	ENSAYOS DE PUDRICION <i>IN VITRO</i> EN MADERA.....	136
4.5.1.	Pérdida de peso seco	137
4.5.2.	Anatomía normal de la madera.....	137
4.5.3.	Morfología del deterioro.....	137
4.5.4.	Deterioro en <i>Populus</i> sp	139
4.5.5.	Deterioro en <i>Salix</i> sp	141
5.	CONCLUSIONES	151
6.	BIBLIOGRAFIA	162

INTRODUCCION

1.1. CONSIDERACIONES GENERALES.

Los tejidos lignocelulósicos de las plantas terrestres superiores constituyen el mayor depósito de energía fotosintética y materia orgánica renovable, y siendo la celulosa y la lignina los biopolímeros más abundantes en la naturaleza, su descomposición a CO₂, H₂O y sustancias húmicas, constituye probablemente el evento biodegradativo más importante en el ciclo biosférico del carbono (Kirk, 1983).

La producción de grandes cantidades de materiales lignocelulósicos en la naturaleza, es explotada en industrias de diversos tipos, tales como las del papel, la madera y la agricultura. Los residuos lignocelulósicos de dichas industrias (residuos urbanos sólidos, aguas de desecho de las industrias del papel y la madera, residuos agrícolas como el bagazo de la caña de azúcar, rastrojos de cereales, estiércol, turba y otros) podrían transformarse en productos utilizables tales como proteína fúngica y forraje para el ganado, combustibles líquidos, ácidos orgánicos, glucosa, alcoholes, etc.

Una de las formas posibles es por bioconversión.

Los hongos tanto por su capacidad hidrolítica como por su distribución, son los organismos lignocelulolíticos por excelencia.

Entre ellos existen algunos con mayor capacidad degradativa de lignina: los que producen la llamada “pudrición blanca” que podrían utilizarse en el proceso de bioconversión. Esta categoría definida por el tipo de pudrición que causan en la madera contiene cientos de especies de Basidiomycetes. Todos son capaces de degradar la lignina, celulosa y hemicelulosa de la madera, pero la velocidad y extensión de la degradación de cada componente de la pared celular varía considerablemente.

Hasta el presente el organismo ligninolítico más estudiado ha sido *Phanerochaete chrysosporium*. Muy pocos trabajos se han realizado sobre el sistema ligninolítico presente en otras especies de hongos Basidiomycetes de pudrición blanca y en su mayoría sobre especies del Hemisferio Norte (Hatakka *et al.*, 1989). Sin embargo, otras especies de hongos causantes de

pudrición blanca fueron capaces de degradar la lignina tan eficientemente como *Phanerochaete chrysosporium* (Hatakka y Uusi-Rauva, 1983; Otjen *et al.*, 1987; Blanchette *et al.*, 1992b; Vares *et al.*, 1994), más aún ciertos hongos muestran mayor selectividad para la remoción de la lignina (Blanchette *et al.*, 1992b; Martinez *et al.*, 1994a; Messner y Srebotnik, 1994; Ruel *et al.*, 1994).

En el orden Aphyllophorales, la familia Polyporaceae incluye muchos activos degradadores de lignina: *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Cerrena unicolor*, *Ischnoderma resinsum*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Trametes gibbosa*, *Trametes hirsuta*, *Trametes versicolor* (Bondarcev, 1953; Blanchette, 1984b; Ryvarden y Gilbertson, 1993; 1994; Blanchette, 1995; Vares y Hatakka, 1997).

Trametes trogii, hongo causante de pudrición blanca, es uno de los más activos degradadores de la madera de salicáceas en nuestro país (Spegazzini, 1925; Wright *et al.*, 1973) y en el norte de Italia (Anselmi, 1990). Aparece tanto en madera caída como en árboles en pie. Según Spegazzini (1925), es un verdadero parásito de salicáceas por cuanto origina una enfermedad que él describiera como “piptostelechia”, consistente en un encurvamiento de los troncos y ramas grandes, la que no ha vuelto a ser estudiada (foto I₁).



Foto I₁: Comienzo y fin de la enfermedad (Piptostelechia del álamo blanco). Piptostelechia del álamo blanco: nombre derivado del griego que significa “tronco volteado”. Descripción de Spegazzini (1925) ... “Las plantas atacadas, especialmente el álamo blanco, ofrecen un tronco exteriormente (al menos en las primeras épocas) que aparenta ser sano, pero que bajo la acción de su propio peso, y probablemente debido al reblandecimiento de la madera causado por las enzimas del micelio invasor, se va arqueando o acodando hasta recostarse en el suelo, dentro de un plazo tanto más corto, cuanto más joven es el individuo afectado. La parte radical parece muy poco afectada, pues permanece casi totalmente sana. En el aparato foliar no se nota nada anormal”... “El duramen en todos los casos se halla profundamente alterado en las partes arqueadas y muy especialmente en los puntos acodados, el color no estaba muy cambiado, pero todas las capas lígneas habían perdido su resistencia y compacidad, habiéndose transformado en una masa seca, muy liviana y friable; debajo del microscopio se observaba que los elementos histológicos se hallaban desmineralizados y delignificados, conservando las formas pero ofreciendo carencia absoluta de substancia cementante y membranas sumamente adelgazadas, transparentes y a veces corroidas”... “Esta enfermedad aparece especialmente en álamo blanco (*Populus alba*), pero también se pudo constatar, aunque en menor escala en *Robinia pseudoacacia*, *Enterolobium contortciliquum*, *Populus tremula*, *Cupressus sempervirens* y hasta en *Pinus insignis*”.

La cepa de *T. trogii* utilizada en este trabajo fue aislada por micólogos de la Universidad de Buenos Aires y seleccionada entre 51 cepas de hongos de pudrición

blanca provenientes de colecciones de Argentina y Brasil, por su alta actividad peroxidasa, crecimiento rápido tanto en medios de laboratorio como en madera, producción de basidiocarpos *in vitro* y su selectividad respecto de la lignina (en 2 semanas de ataque reduce el peso de la madera cerca del 2% de base seca, de ese porcentaje 90% es lignina (Planes *et al.*, 1986)).

Investigaciones en biopulpado con esta cepa demostraron que reduce el consumo de energía y mejora la calidad del papel obtenido (Planes *et al.*, 1986; 1990). La aplicación a escala industrial del tratamiento se ve obstaculizada sin embargo por la duración del mismo, ya que los volúmenes procesados no permiten la acumulación de la madera durante los 10 días requeridos para la transformación por medio del hongo, el cual además puede atacar simultáneamente a la celulosa.

A diferencia del hongo, sus enzimas aisladas necesitan mucho menos tiempo para actuar, siendo además las ligninasas específicas.

El costo de las enzimas es uno de los factores que determinan la viabilidad económica de un proceso biocatalítico, y puede ser reducido encontrando condiciones óptimas para su producción, aislando mutantes hiperproductoras y (posiblemente) construyendo productores eficientes mediante ingeniería genética. El estudio de los mecanismos que regulan la producción enzimática constituye un prerrequisito.

Este trabajo comprende la detección y el estudio de las enzimas involucradas en la conversión de materiales lignocelulolíticos por *T. trogii* (celulasas, xilanasas, pectinasas y enzimas que intervienen en la degradación de lignina), la investigación de las condiciones nutricionales y de cultivo que favorecen la producción de las distintas actividades enzimáticas, así como una caracterización de dichas actividades enzimáticas en el extracto crudo. Previamente a la aplicación industrial de los hongos de pudrición blanca, es necesario investigar el proceso de degradación y como éste afecta a los diferentes tipos celulares (Otjen y Blanchette, 1986), por ello paralelamente se realizaron ensayos de degradación sobre madera y analizaron los cambios estructurales y ultraestructurales producidos por la acción de *T. trogii*.

1.2. ESTRUCTURA Y COMPOSICION QUIMICA DE LAS LIGNOCELULOSAS.

Las lignocelulosas están compuestas por polímeros estructurales: celulosa, lignina y hemicelulosas, las fibrillas de celulosa se hayan embebidas en una matriz amorfa de lignina y hemicelulosa. En su estado nativo las lignocelulosas están asociadas con varios componentes no estructurales (proteínas, lípidos, minerales, etc.). De los componentes estructurales la celulosa es el más abundante: constituye 40 a 45% del peso seco de la madera, mientras que las hemicelulosas usualmente conforman 20 a 40% y la lignina 15 a 35% (Eriksson *et al.*, 1990; Sjöström, 1993). Los tejidos inmaduros pueden contener un porcentaje importante de otro componente estructural: la pectina, pero dicho porcentaje disminuye significativamente durante el espesamiento secundario y lignificación de las paredes celulares vegetales. Las plantas acuáticas incluidas las algas marinas y los tejidos maduros de plantas terrestres ricos en células no lignificadas, contienen proporcionalmente más polisacáridos, pero en conjunto constituyen sólo una porción relativamente pequeña de la biomasa terrestre (Kirk, 1983).

La arquitectura de la pared celular vegetal, está en gran parte determinada por la celulosa (Fig. I₁). Este marco celulósico consta de un sistema de fibrillas, formado por moléculas de celulosa; las fibrillas son de diferente magnitud: macrofibrillas, microfibrillas y subunidades de microfibrillas. En la pared primaria las fibrillas de celulosa están orientadas al azar, y en la pared secundaria están en forma ordenada constituyendo distintas capas dada su diferente orientación. Tradicionalmente la pared celular de las plantas se ha dividido en tres regiones de acuerdo a su estructura y función: laminilla media, pared primaria y pared secundaria (Esau, 1977). La pared primaria es la primera que se deposita en las células aún en crecimiento activo; la zona en que se unen las paredes primarias de dos células contiguas se llama laminilla media. En muchos tipos celulares se depositan capas adicionales cuando ya ha terminado la elongación celular; éstas forman la pared secundaria. En las células de la madera (Fig. I₂) con paredes gruesas, la pared secundaria frecuentemente consiste en tres capas principales, comenzando con la

más externa estas capas se denominan S₁, S₂ y S₃. La separación en tres capas resulta principalmente de las diferentes orientaciones de las microfibrillas en cada una de ellas.

Las sustancias pécticas son los principales constituyentes de la laminilla media y elementos estructurales de la pared primaria. Las hemicelulosas son los componentes mayoritarios de la matriz de la pared primaria y secundaria, encadenando las fracciones péctica y celulósica. La lignina es el principal componente de la región de la laminilla media de la madera, pero la mayor parte de la lignina se encuentra en la pared secundaria. Está mezclada y covalentemente ligada a las hemicelulosas, contribuyendo a formar la matriz en la que se hallan inmersas las fibrillas de celulosa.

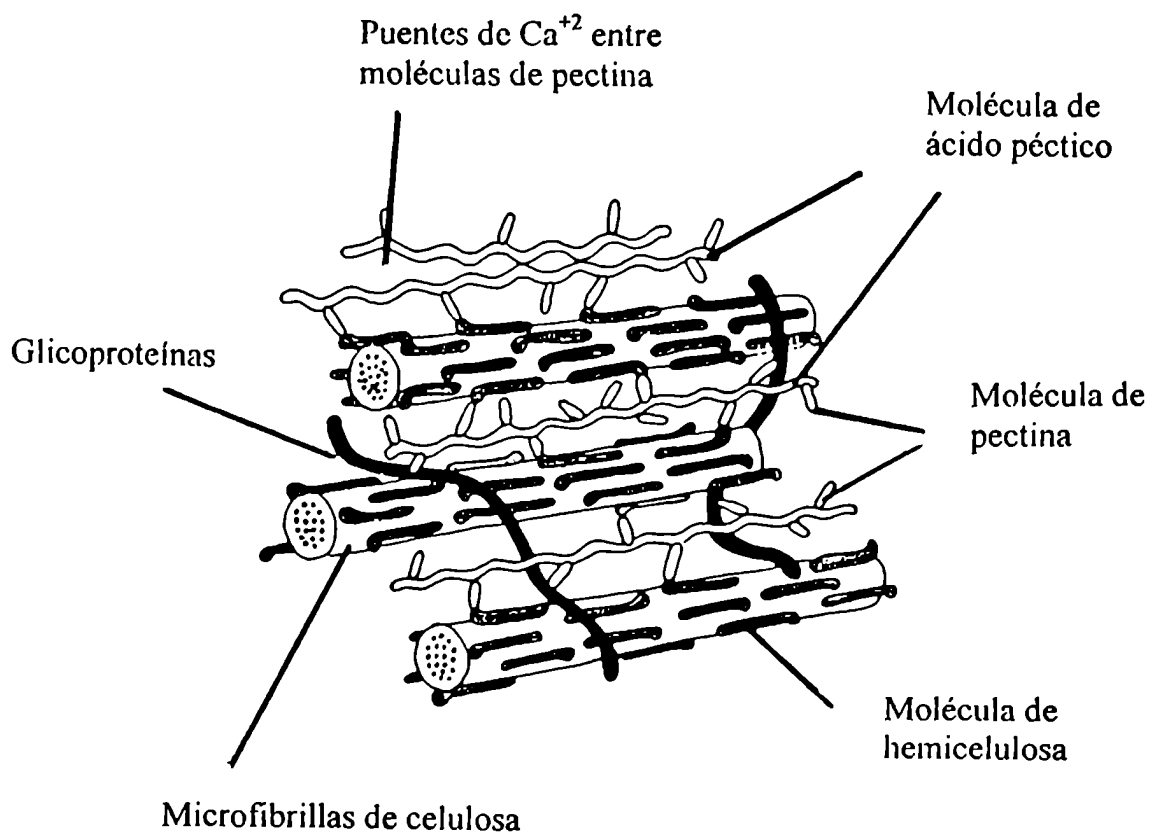


Figura I₁: Esquema de la interconexión existente en la pared celular primaria de vegetales superiores, entre las fibrillas de celulosa y la matriz de hemicelulosas y sustancias pécticas. Las moléculas de hemicelulosa (por ejemplo xilanos) se unen por puentes hidrógeno a la superficie de las microfibrillas de celulosa. Algunas de estas hemicelulosas se unen a las moléculas de ácido péctico a través de cadenas cortas de pectina. Existen glicoproteínas adheridas a las moléculas de pectina.

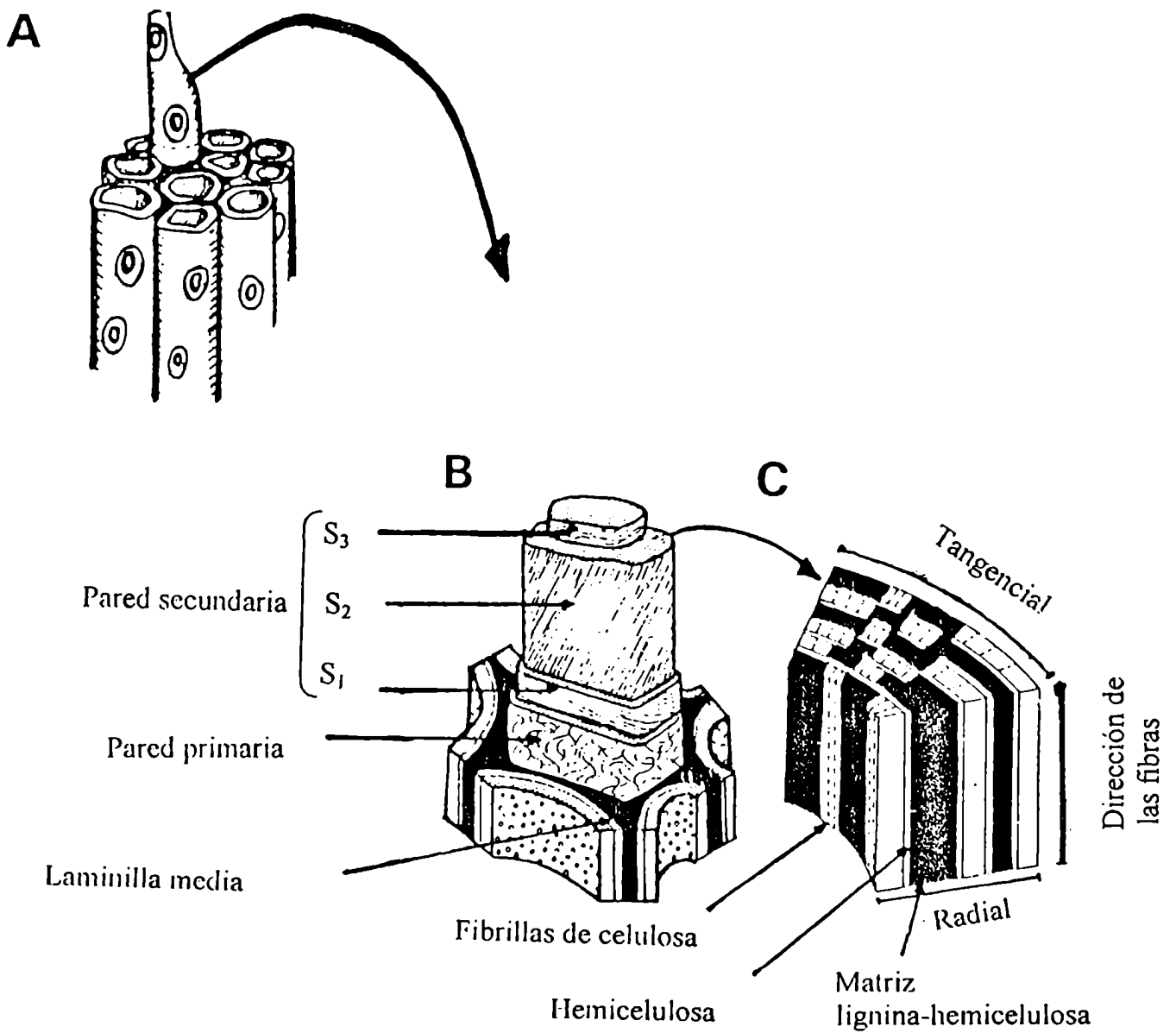


Figura 1₂: Arquitectura molecular de tejidos leñosos.

A. Haz de células leñosas contiguas. B. Corte de una célula leñosa mostrando las capas que constituyen la pared celular. C. Sección de la pared celular secundaria mostrando la relación de hemicelulosa y lignina con las fibras de celulosa (Kirk, 1983).

1.2.1 Celulosa.

La celulosa posee una estructura molecular relativamente sencilla, ya que es un polímero lineal de monómeros de glucosa unidos por enlaces β -1,4 y no presenta cadenas laterales. La longitud del polímero es altamente variable y dependiente del organismo del cual la celulosa haya sido obtenida, así como de la edad y estado metabólico al momento de la extracción (Chanzy, 1990; Markham y Bazin, 1991). Un grado de polimerización promedio de alrededor de 10000 se determinó para la celulosa de la madera (Zabel y Morrel, 1992; Sjöström, 1993). Cada monómero de glucosa presenta una rotación de 180° respecto de los residuos contiguos, estabilizada por la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares (Fig. I₃). La ausencia de cadenas laterales, unida a la estructura lineal de las cadenas β -1,4 glucano, permite la formación de agregados moleculares (microfibrillas) estabilizados por puentes de hidrógeno entre cadenas paralelas (Zarra y Revilla, 1993).

Las microfibrillas están conformadas por zonas cristalinas donde las moléculas de celulosa se hallan ordenadas y regiones paracristalinas donde se hallan desorganizadas. La estructura cristalina de la celulosa hace que la pared de la célula sea anisótropa y por consiguiente con doble refracción (birrefringente) cuando se mira con luz polarizada (Esau, 1977).

Se consideran dos tipos de celulosa: la nativa o cristalina, caracterizada por un alto grado de cristalinidad u ordenamiento y de polimerización, resultando así insoluble (ej.: avicel, fibras de algodón, papel de filtro, etc.); y la celulosa modificada, la cual resulta soluble como la celulosa amorfa, carboximetilcelulosa, celooligosacáridos, en las cuales el grado de cristalinidad y el grado de polimerización es menor.

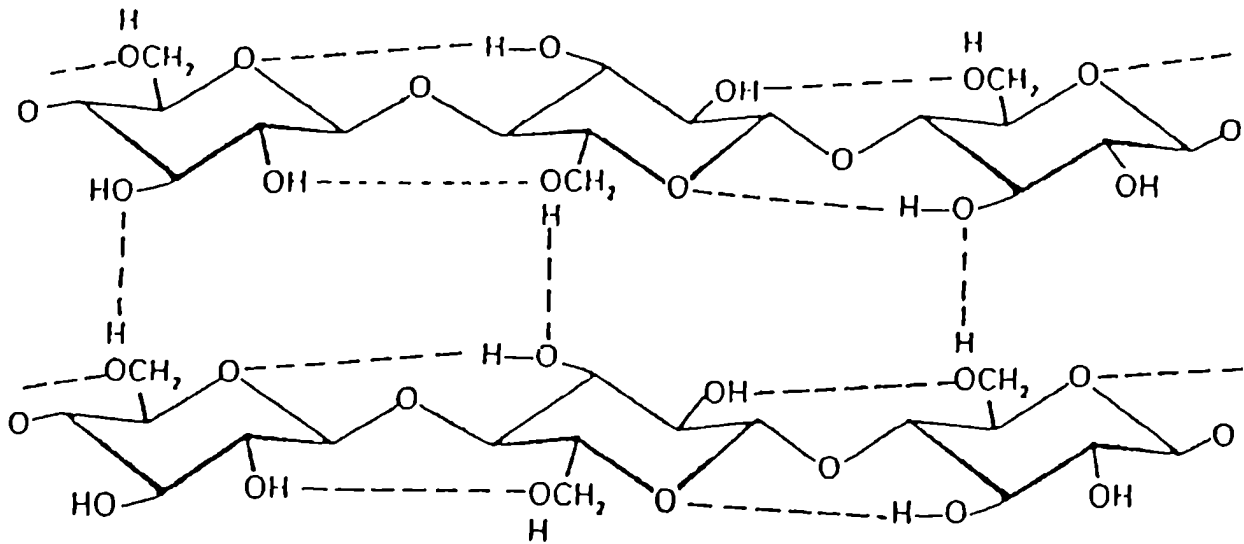


Figura 13: Conformación de las cadenas moleculares de celulosa mostrando los puentes de hidrógeno intra e intermoleculares.

1.2.2. Hemicelulosas.

El término hemicelulosa incluye la porción fácilmente hidrolizable de la pared celular en contraste con la celulosa que es más resistente (Puls y Poutanem, 1989). Las hemicelulosas son polímeros de diversas hexosas y pentosas (principalmente D-xilosa, L-arabinosa, D-manosa, D-glucosa, D-galactosa, y ácido D-glucururónico), que aparecen en las paredes celulares en forma amorfa (Eriksson *et al.*, 1990; Sjöström, 1993). La mayoría de las hemicelulosas ocurre como heteropolisacáridos, poseen una especie de columna vertebral formada por una cadena plana de azúcares unidos casi siempre por enlaces β -1,4 (de menor longitud que la de celulosa (grado de polimerización 100-200)), de la que pueden salir ramificaciones muy cortas, generalmente de un solo azúcar de longitud. Se clasifican usualmente de acuerdo a los azúcares residuales presentes. Los tipos y cantidades de hemicelulosas presentes en las paredes celulares de las maderas de angiospermas y coníferas son diferentes. Estas últimas contienen menos hemicelulosas, constituidas principalmente por glucomananos y galactoglucomananos (Zabel y Morrel, 1992; Joseleau y Ruel,

1994). En los glucomananos la cadena principal está formada por residuos alternos β -D-glucopiranosido y β -D-manopiranosido; en los galactoglucomananos, sustituyentes D-galactopiranosil terminales están asociados al O-6 de manosa o glucosa (Fig. I₅).

Los xilanos en cambio son las principales hemicelulosas en la madera de angiospermas (constituyen del 10 al 35% del peso seco) (Dekker y Richards, 1976; Zabel y Morrel, 1992; Joseleau y Ruel, 1994). Consisten de una cadena principal de unidades β -D-xilopiranosidos con uniones (1,4) y dependiendo de su origen esta cadena puede tener distintos sustituyentes y cadenas laterales. De acuerdo a ello se consideran tres familias principales de xilanos: el xilano de la madera de angiospermas es acetil-4-O-metilglucuronoxilano con un grado de polimerización de alrededor de 200. La madera de coníferas contiene 10 a 15% de xilano como arabino-4-O-metilglucuronoxilano con un grado de polimerización mayor de 120 y el xilano de los pastos es también arabino-4-O-metilglucuronoxilano pero con un grado de polimerización de 70 (Coughlan y Hazlewood, 1993; Puls y Schuseil, 1993).

Las hemicelulosas cubren y unen a las microfibrillas de celulosa en una matriz común. La corta extensión de las cadenas que incrementa la solubilidad de las hemicelulosas y la posición expuesta de las mismas en la superficie de las microfibrillas, explicaría porqué estos polímeros están entre los primeros componentes de la pared celular atacados por los hongos causantes de pudrición (Zabel y Morrel, 1992).

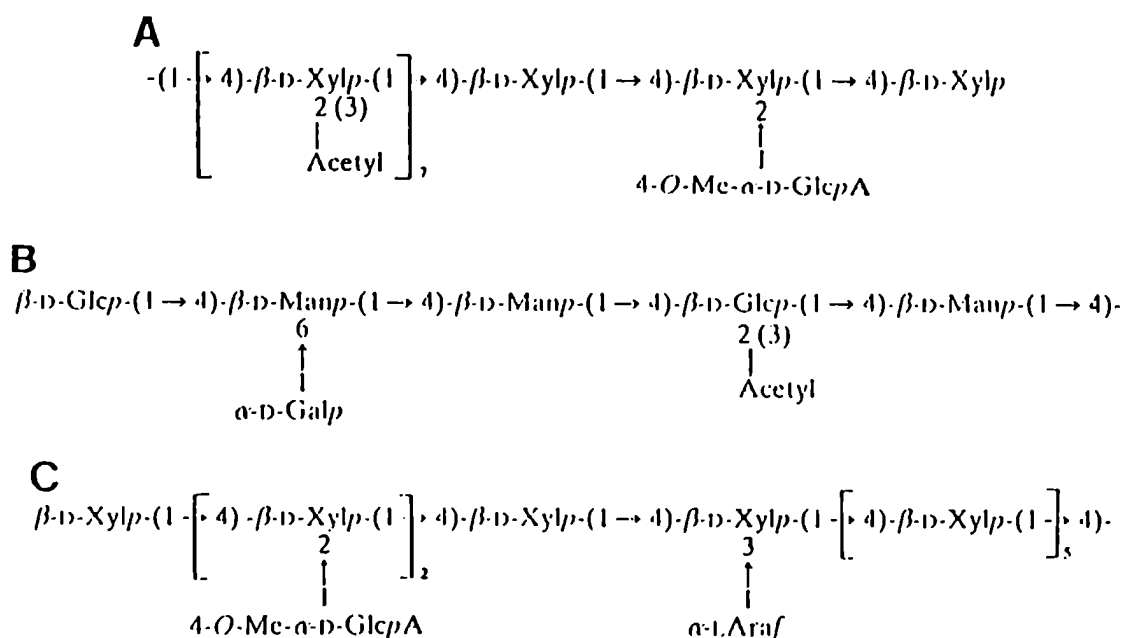
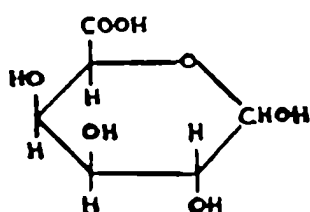


Figura 1g: Estructura química parcial de los polímeros hemicelulósicos predominantes, comúnmente hallados en la madera. **A**: un xilano de maderas de angiospermas (*O*-acetil-4-*O*-metilglucuronoxilano); **B**: un galactoglucomanano de maderas de coníferas (*O*-acetil-galactoglucomanano); **C**: un xilano de maderas de coníferas (arabino-4-*O*-metilglucuronoxilano) (Zabel y Morrel, 1992).

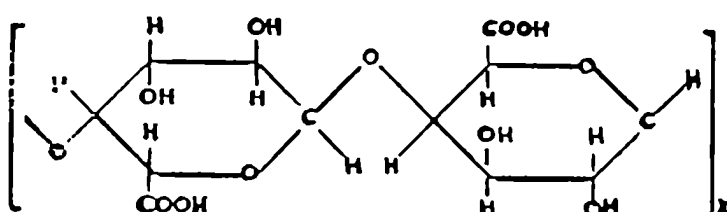
1.2.3. Compuestos pécticos.

Las sustancias pécticas, un grupo de derivados de carbohidratos de naturaleza coloidal, que ocurren en o son preparados a partir de plantas, son heteropolisacáridos ramificados de alto peso molecular, cuya cadena principal está formada por ácidos galacturónicos con uniones α -1,4 asociada a azúcares neutros. Los grupos carboxilo de los residuos ácido galacturónicos pueden estar parcialmente esterificados con metanol. El grado de esterificación, la proporción de sacáridos neutros en las cadenas laterales y el grado de polimerización, son los principales motivos de la heterogeneidad de los compuestos pécticos de diverso origen. Los compuestos pécticos se clasifican en: pectatos (ácido péctico: polímero de ácido poligalacturónico), pectinatos (pectina: ácido péctico parcialmente esterificado con metanol y conteniendo algunos azúcares neutros) y protopectina (es la sustancia péctica madre, insoluble en agua, presente en las plantas, la cual sufre

una conversión a pectatos y pectina (solubles en agua) y a sus productos de desdoblamiento) (Sakai *et al.*, 1993). Las sustancias pécticas se localizan principalmente en la laminilla media y la pared primaria de las células vegetales. En los árboles la laminilla media de los elementos xilemáticos jóvenes está constituida mayoritariamente por pectina, pero al envejecer éstos, se torna altamente lignificada (O'Neill *et al.*, 1990).



Acido D-Galacturónico



Acido pèctico

Figura 16: Estructura química del ácido D-galacturónico y del ácido pèctico.

1.2.4. Lignina.

La lignina es el componente de naturaleza no polisacárida más abundante de las paredes celulares. Es un polímero aromático complejo de alto peso molecular, amorfo, tridimensional, insoluble en agua, compuesto por unidades fenilpropano, que se sintetiza por polimerización oxidativa de los alcoholes *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico (Figura 17). La polimerización de la lignina se lleva a cabo luego de la deposición de los polisacáridos y se inicia por oxidación enzimática de los precursores a fenoxi radicales (por abstracción de un electrón). Estos radicales libres pueden reaccionar unos con otros en una gran variedad de formas y esto hace que la lignina no tenga una estructura única. La polimerización resulta en una estructura polifenilpropanoide (Fig. 18), en la cual las unidades básicas están ligadas entre sí por diferentes uniones C-C y uniones aril-éter (Sarkanen y Ludwig, 1971; Adler, 1977; Higuchi, 1985; 1990).

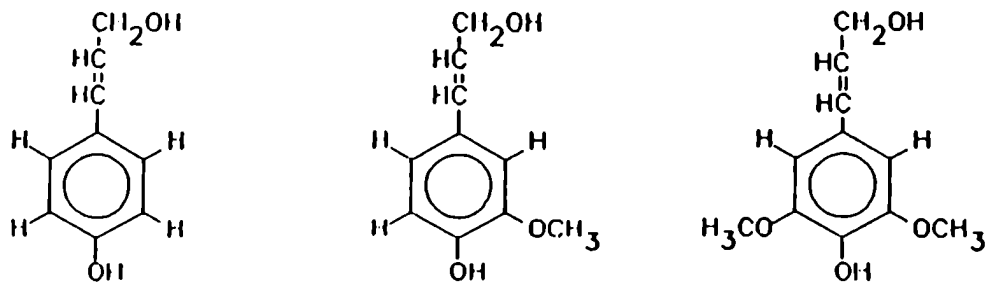


Figura 17: Precursores de la lignina: alcoholes (1) *p*-cumarílico, (2) coniferílico, (3) sinapílico (Eriksson *et al.*, 1990).

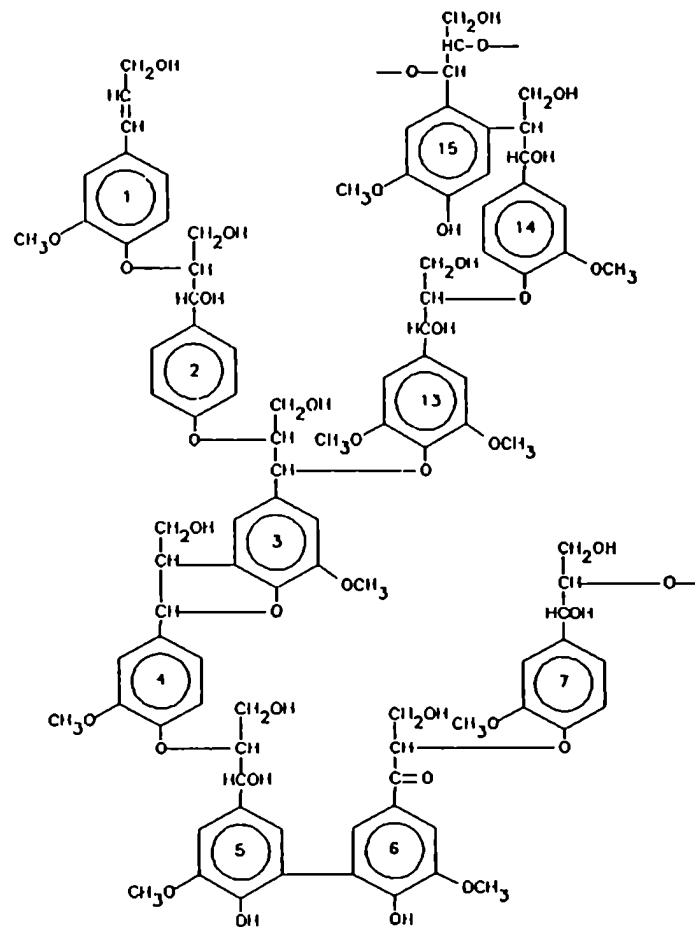


Figura 18: Estructura esquemática de la lignina de abeto (Adler, 1977).

Los tres precursores monoméricos están presentes en proporciones variables dependiendo de diversos factores que incluyen la especie vegetal, tipo de tejido y localización exacta de la lignina en la pared celular (Buswell y Odier, 1987). Las unidades de guayacil lignina (G) que se originan a partir del alcohol coniferílico predominan en las maderas de coníferas, en cambio las maderas de angiospermas contienen cantidades más o menos equivalentes de unidades guayacil y siringil (S-lignina, derivada del alcohol sinapílico) y la lignina de los pastos además de unidades guayacil y siringil contiene unidades *p*-hidroxifenil (que se originan del alcohol *p*-cumarílico) (Sarkanen y Ludwig, 1971; Reid, 1995).

La síntesis de lignina se inicia inmediatamente que comienza a formarse la pared secundaria, avanzando desde la laminilla media hacia el plasmalema. De esta forma, tanto la pared primaria como la secundaria, quedan impregnadas con esta sustancia rígida e hidrófoba que queda unida covalentemente a la matriz de polisacáridos. Tanto la laminilla media compuesta como la pared secundaria de las células vegetales contienen lignina, pero debido a que la pared secundaria constituye el mayor porcentaje del volumen total celular, la mayoría de la lignina se localiza en esa región. Sin embargo, la laminilla media y los ángulos celulares contienen la mayor concentración de lignina (Blanchette, 1991). Entre los diferentes tipos celulares dentro de una especie arbórea e incluso dentro de las diferentes capas de la pared de células específicas se detectan variaciones en la concentración y composición de la lignina. Por ejemplo, las paredes celulares de los elementos de vaso de *Acer*, *Betula*, *Tilia* y otras angiospermas son morfológicamente diferentes de las fibras y contienen mayores concentraciones de lignina con un mayor número de unidades guayacilpropano comparado con las paredes de las fibras (Obst, 1982; Blanchette *et al.*, 1988b; Eriksson *et al.*, 1990; Blanchette, 1994). La lignina imparte resistencia hacia la degradación microbiana de la madera. La íntima asociación espacial existente entre los polisacáridos y la lignina dentro de las paredes celulares de la madera provee una barrera protectora que impide la degradación de la celulosa. Una vez que la lignina que rodea a las fibrillas de celulosa es removida o modificada, la celulosa resulta más accesible a las enzimas microbianas y puede ser eficientemente degradada. Así la lignificación en muchas

plantas puede ser un mecanismo de resistencia a la enfermedad (Vance *et al.*, 1980) y se produce como un mecanismo de defensa hacia los hongos patógenos o en respuesta a heridas (Biggs, 1992; Blanchette, 1992).

Debido a su estructura la lignina es altamente resistente a la degradación, y hasta el momento los únicos organismos capaces de mineralizarla eficientemente llevándola a CO₂ y H₂O como productos finales son los hongos de pudrición blanca (Vares, 1996).

1.3. BIODEGRADACION DE MATERIALES LIGNOCELULOSICOS.

1.3.1. Enzimas que intervienen en la degradación de las lignocelulosas.

1.3.1.1. Celulasas.

La ruptura de la celulosa por los hongos, es el resultado de la acción sinérgica de enzimas principalmente hidrolíticas, pero enzimas oxidativas también se hallan involucradas en la degradación de celulosa. Además, sistemas oxidativos no enzimáticos, principalmente oxígenos activados pueden contribuir a la ruptura de los polisacáridos durante el ataque fúngico.

La producción de un sistema enzimático extracelular, capaz de hidrolizar la celulosa a productos solubles, es la característica que define a los organismos celulolíticos. Dicho sistema se conoce genéricamente con el nombre de “celulasa” y está constituido básicamente por tres grupos de enzimas:

1. Endoglucanasas (1,4-β-D-glucan 4-glucanohidrolasas) (EC 3.2.1.4), que producen una disminución en el grado de polimerización de la celulosa, por cortes al azar de la cadena glucosídica. Los sustratos sobre los que actúan las endoglucanasas incluyen carboximetilcelulosa, celulosa amorfa, celooligosacáridos; no atacando en forma significativa a la celulosa cristalina, como las fibras de algodón o el avicel.
2. Exoglucanasas, representadas por dos grupos de enzimas: exocelobiohidrolasas o celobiohidrolasas (CBH) (1,4-β-D-glucan celobiohidrolasas) (EC 3.2.1.91) y

exoglucosidasas (1,4-β-D-glucan glucohidrolasas) (EC 3.2.1.74). Estas enzimas liberan respectivamente celobiosa o glucosa a partir de extremos no reductores. Las celobiohidrolasas son las halladas más frecuentemente. El sustrato avicel es el más útil para la medición de dicha actividad enzimática (Archer y Wood, 1995).

3. β-glucosidasas (β-D-glucósido glucohidrolasas) (EC 3.2.1.21), que hidrolizan celobiosa y otros β-1,4-oligoglucósidos de cadena corta, para formar glucosa.

Los hongos de pudrición castaña producen endoglucanasas y β-glucosidasas, al igual que las especies que provocan pudriciones blancas y blandas, pero aparentemente no producen exoglucanasas (Highley, 1975). Estos llevarían a cabo la solubilización de la celulosa nativa por un mecanismo que involucra a la endoglucanasa y a factores no proteicos, entre ellos H₂O₂ y Fe(II) (Koenigs, 1975; Coughlan y Ljungdahl, 1988; Wood y García Campayo, 1990). Sin embargo, en *Coniophora puteana*, un hongo de pudrición castaña, se han purificado y caracterizado por primera vez dos exocelobiohidrolasas (Schmidhalter y Canevascini, 1993a).

En adición a los tres grupos principales de enzimas, se han encontrado en distintas especies fúngicas, especialmente en hongos de pudrición blanca, un número de actividades enzimáticas oxidativas auxiliares, las cuales no son esenciales para la hidrólisis de la celulosa pero pueden asistir a la descomposición del polímero llevando a cabo conversiones muy útiles, por ejemplo oxidaciones o la remoción de productos finales que pueden provocar represión catabólica o inhibición de la actividad de los grupos principales de enzimas celulolíticas (Coughlan y Ljungdahl, 1988; Markham y Bazin, 1991; Bao y Renganathan, 1992; Kremer y Wood, 1992b; Bao *et al.*, 1993b; Schmidhalter y Canevascini, 1993b; Roy *et al.*, 1994). Tales enzimas incluyen a la celobiosa deshidrogenasa (CDH, EC 1.1.99.18) previamente llamada celobiosa oxidasa, una hemoflavoenzima (Ayers *et al.*, 1978; Bao *et al.*, 1993b) que posee un dominio de unión a la celulosa. Esta enzima oxida celobiosa y celodextrinas a las correspondientes lactonas y utiliza O₂ entre otros aceptores electrónicos, produciendo H₂O₂ (Bao *et al.*, 1993b). La celobiosa quinona óxidorreductasa (CBQ, EC 1.1.5.1) (Westermarck y Eriksson, 1974), es una enzima

flavin dependiente que se considera ahora un producto del clivaje proteolítico de la CDH, oxida celobiosa y utiliza quinonas y radicales fenoxi como aceptores electrónicos. CDH y CBQ pueden ser distinguidas por diferencias en sus espectros y en sus propiedades catalíticas (Habu *et al.*, 1997). Una posible función de estas enzimas sería la de no permitir que se vuelvan a formar uniones β -1,4-glicosídicas, luego de que éstas fueron clivadas por la acción de la endoglucanasa, mediante la oxidación de los extremos reductores generados por ésta. Otra función de la CDH, tanto en la degradación de lignina como de celulosa, podría ser la generación de radicales hidroxílicos a través de la reducción de Fe(III) a Fe(II), que en presencia de H_2O_2 forma el reactivo de Fenton (Ander, 1994). Se ha demostrado que la CDH incrementa la degradación de celulosa cristalina por celulasas (Bao y Renganathan, 1992). Ambas enzimas se hallarían involucradas también en la degradación de lignina (véase punto 1.3.4.) pudiendo ser un nexo entre los procesos de hidrólisis de celulosa y lignina (Eriksson, 1978). Roy *et al.* (1994), proponen un modelo que interrelaciona los dos procesos de hidrólisis en *Trametes versicolor*.

Otra de las actividades enzimáticas encontradas son la de glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4), enzima flavin dependiente que transforma la glucosa en gluconolactona y utiliza al O_2 como aceptor electrónico, produciendo H_2O_2 , y la lactonasa (EC 3.1.1.17) que transforma a la celobionolactona y a la gluconolactona en los ácidos celobiónico y glucónico respectivamente.

Se ha demostrado que las enzimas celulolíticas presentan una multiplicidad de componentes enzimáticos (isoenzimas) (Coughlan, 1985; Wood y García Campayo, 1990; Beguin y Aubert, 1994; Tomme *et al.*, 1995; Carle-Urioste *et al.*, 1997), dependiendo el número de éstas, de la cepa y de la forma en que ha sido cultivada. Sólo algunos de estos componentes están genéticamente determinados. Otros resultan de una glicosilación diferencial de una cadena polipeptídica común (Wood y McCrae, 1972; Gum y Brown, 1977; Coughlan y Ljungdahl, 1988), de la proteólisis parcial de las enzimas (Nakayama *et al.*, 1976; Eriksson y Petterson, 1982; Stahlberg *et al.*, 1988; Mischak *et al.*, 1989), de la agregación de distintas enzimas entre sí o con la pared celular (Sprey y Lambert, 1983) o de la manipulación de las mismas durante su purificación (Enari y Niku-Paalova, 1987).

Esto hace que la elucidación de los mecanismos de acción sea extremadamente dificultosa, y por lo tanto existe una considerable discusión acerca de la especificidad de sustrato de las distintas enzimas, de su modo de acción (especialmente en el caso de las celobiohidrolasas) y de la naturaleza de la cooperación entre las distintas enzimas. En la actualidad existe bastante acuerdo acerca de que una conversión extensiva de celulosa cristalina a glucosa debe ser discutida en términos de la acción cooperativa de dos celobiohidrolasas no relacionadas inmunológicamente (llamadas CBH I y CBH II), una o más endoglucanasas y al menos una β -glucosidasa (Wood y García Campayo, 1990). Una de las representaciones esquemáticas comúnmente citadas para explicar la acción de las celulasas es la de White (1983) para *Trichoderma* (Figura I₉). La celulosa es atacada inicialmente por la endoglucanasa, la cual se liga al azar sobre las microfibrillas de celulosa en regiones amorfas, produciendo hidrólisis de los enlaces β -1,4 glucosídicos, generando así múltiples sitios de ataque para las exo-1,4- β -D-glucanasas, las cuales actúan sobre los extremos no reductores de la cadena, clivando una unidad de celobiosa. Existe una cooperación continuada entre la acción de ambas enzimas y la de la β -glucosidasa, la cual actúa sobre la celobiosa o también sobre pequeños oligómeros, produciéndose así moléculas de glucosa. El resultado de la acción de estas tres actividades enzimáticas es la degradación sinérgica de la celulosa.

Sin embargo este modelo es una simplificación de lo que realmente acontece durante la degradación biológica de celulosa ya que no tiene en cuenta la presencia de las actividades oxidativas auxiliares. Coughlan y Ljungdahl (1988) han propuesto un modelo para la degradación fúngica de la celulosa, teniendo en cuenta la actividad de las enzimas principales y accesorias encontradas en un gran número de especies fúngicas (Figura I₁₀). Los autores proponen como primer paso la amorfogénesis de la microfibrilla de celulosa, lo cual implica la ruptura de puentes de hidrógeno intermoleculares para producir la relajación de la estructura cristalina. La disgregación y subsecuente hidratación de las cadenas de celulosa fuertemente empaquetadas, es un prerrequisito para el clivaje ulterior de las uniones glicosídicas, por las enzimas celulolíticas. El descubrimiento de que las endoglucanasas y

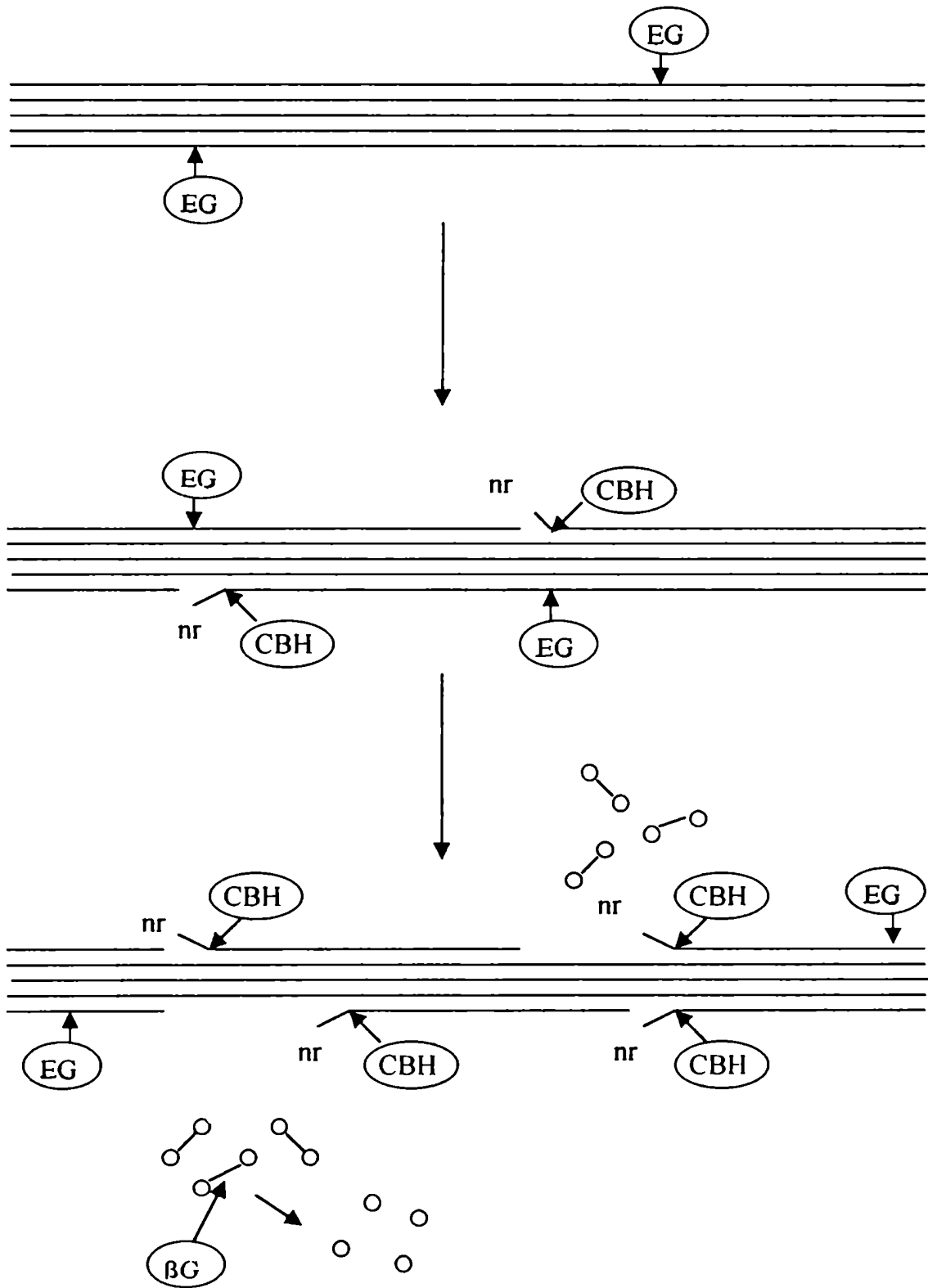


Fig. 19: Representación del modo de acción de las celulasas, según White, 1983. nr: extremo no reductor, EG: endoglucanasa, CBH: celobiohidrolasa, β G: β -glucosidasa, O—O: celobiosa O: glucosa.

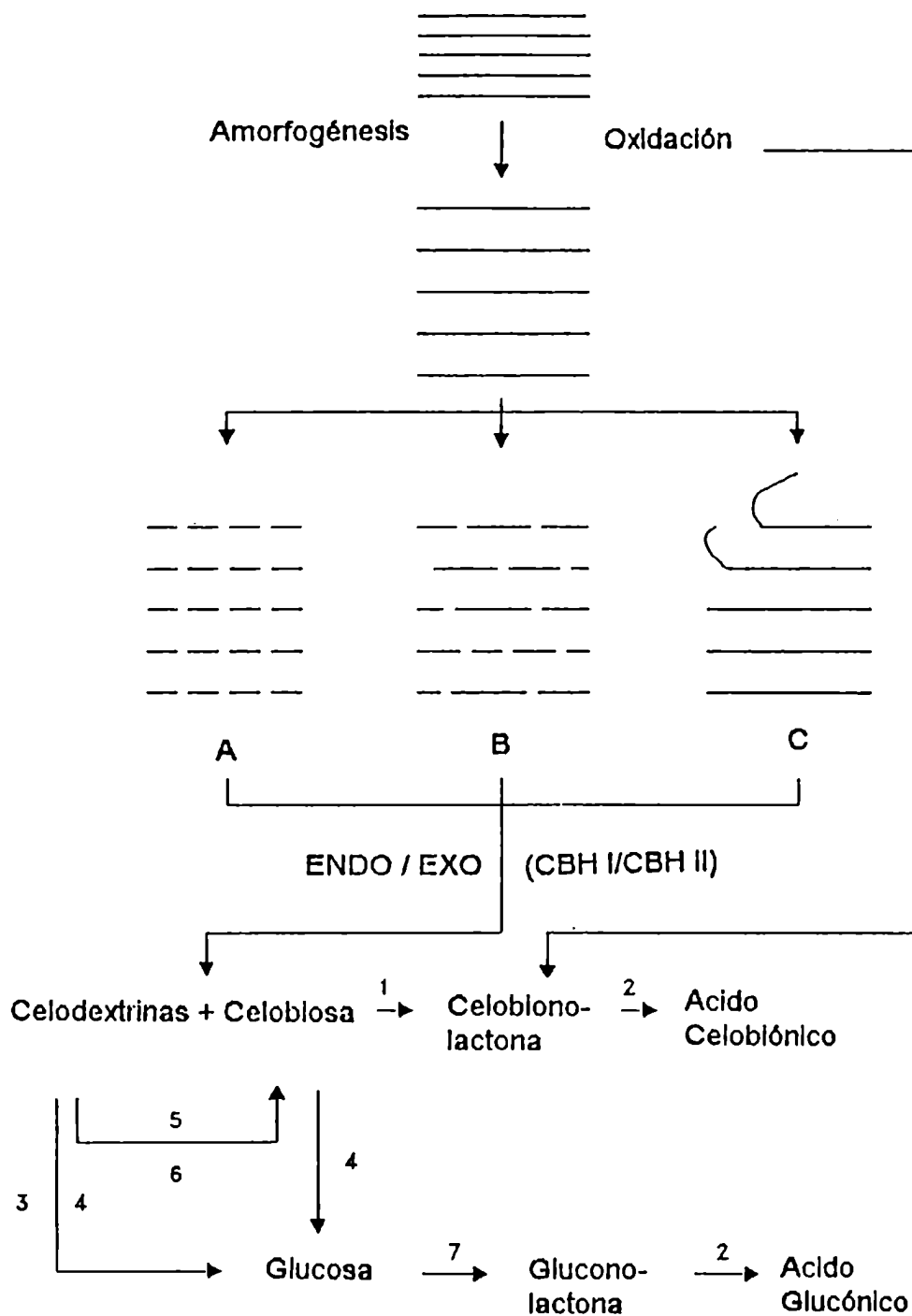


Figura 1₁₀: Modelo para la degradación fúngica de la celulosa según Coughlan y Ljungdahl (1988). A: formación de fibras cortas; B: segmentación; C: desestratificación; Endo: Endoglucanasa; Exo (CBH I/CBH II): Exocelobiohidrolasa I y II; 1: celobiosa oxidasa/deshidrogenasa; 2: lactonasa; 3: exoglucosidasa; 4: β-glucosidasa; 5: endoglucanasa; 6: exocelobiohidrolasa (CBH I/CBH II); 7: glucosa oxidasa.

celobiohidrolasas están formadas por dos dominios, uno de unión al sustrato y otro catalítico (Tomme *et al.*, 1988), sugiere que las actividades de relajación e hidrolítica pueden residir en la misma enzima. Knowles *et al.* (1988) consideran que el dominio de unión separaría a las cadenas individuales de celulosa, previamente a su hidrólisis por el dominio catalítico.

Coughlan y Ljungdahl (1988) también sostienen la posibilidad de que la oxidación de la celulosa en sus extremos reductores libres sea uno de los primeros eventos durante su degradación ya que se ha detectado la presencia de ácidos glicónicos durante los primeros estadios de la hidrólisis de celulosa en sobrenadantes de cultivo de *Trichoderma reesei*. La actividad de las oxidasas sobre los extremos reductores de la cadena glucosídica no permitiría que se vuelva a formar un nuevo enlace β -1,4 en ese lugar, luego de que éste fuera clivado por la actividad de las endoglucanasas. El siguiente estadio de la degradación de celulosa, quizás una extensión del proceso de amorfogénesis, puede tomar una serie de caminos diferentes. Se puede llevar a cabo la formación de fibras cortas, quizás como resultado de la acción de una enzima semejante a la celobiohidrolasa I, según sugieren Enari y Niku-Paalova (1987). Otra posibilidad es la segmentación de la celulosa, lo cual involucraría ataques en muchos puntos del sustrato por enzimas que actúan al azar simultáneamente sobre varias cadenas (Henrissat *et al.*, 1985). Una posibilidad adicional es la desestratificación. En dicho proceso, el cual puede ocurrir sin la liberación de azúcares reductores, las fibras de celulosa son “peladas” separándose una o más fibrillas elementales o microfibrillas al mismo tiempo, de su superficie. Estudios con microscopía electrónica son consistentes con esta hipótesis (Chanzy *et al.*, 1983; White, 1983)

El paso siguiente en la degradación de celulosa se llevaría a cabo por intermedio de la acción sinérgica de las endoglucanasas y exocelobiohidrolasas, de la misma manera postulada por White (1983) en su modelo (Figura I₉). Las exoglucohidrolasas, si están presentes catalizan la remoción de residuos de glucosa de los extremos no reductores de las cadenas glucosídicas. Los estadios finales de la degradación de celulosa se llevan a cabo por las β -glucosidasas clivando la celobiosa o removiendo residuos de glucosa de los extremos no reductores de

celodextrinas de bajo peso molecular generadas por la acción de las otras enzimas celulolíticas. Por otra parte, las lactonas producidas en los primeros estadios oxidativos de la degradación de la celulosa, o bien en algunas especies, por acción de la celobiosa oxidasa/deshidrogenasa sobre la celobiosa, son convertidas a ácido celobiónico por acción de la lactonasa. Esta enzima también cataliza la hidrólisis de la gluconolactona, generada por la acción de la glucosa oxidasa en algunas especies, a ácido glucónico.

La dificultad para penetrar la matriz lignocelulósica de la pared celular limita la eficiencia de las hemicelulasas y celulasas en la hidrólisis de polisacáridos dentro de la misma. Esta limitación se debe principalmente a su tamaño; agentes de menor tamaño pueden ser eficaces durante los primeros pasos de la degradación de pared celular de la madera. Una hipótesis generalmente aceptada sobre la naturaleza de los agentes que depolimerizan la celulosa propone el rol de los radicales oxígeno derivados. Estos pueden ser generados como radical $\cdot\text{OH}$ por la reacción de Fenton desde Fe(II) y H_2O_2 , o como radical superóxido (O_2^-). El H_2O_2 cumple un activo papel en la liberación de agentes de degradación de celulosa cristalina. La formación de radicales hidroxilos durante la interacción del hongo con la planta puede ocurrir de diferentes maneras. Las enzimas involucradas en la ruptura de lignina y celulosa pueden ser la fuente indirecta de agentes no enzimáticos también implicados en la degradación de celulosa. Por ejemplo, la celobiosa oxidasa puede generar aniones superóxido (O_2^-) (Ayers *et al.*, 1978) y cooperar con H_2O_2 e iones férricos en la formación de radicales hidroxilo (Kremer y Wood, 1992a). La lignin peroxidasa puede producir radicales hidroxilo por un mecanismo que incluye metabolitos secundarios, alcohol veratrílico y oxalato (Barr *et al.*, 1992).

En los hongos de pudrición castaña que aparentemente no producen exoglucanasas, el ataque inicial de la celulosa sería vía un sistema que involucra al H_2O_2 y al Fe(II) (Koenigs, 1975). Koenigs demostró que la celulosa en la madera es depolimerizada por el reactivo de Fenton ($\text{Fe(II)} + \text{H}_2\text{O}_2$, que genera radicales hidroxilo u oxidantes similares), que los hongos de pudrición castaña producen extracelularmente H_2O_2 y que la madera contiene suficiente Fe(III) . Se ha sugerido que el ácido oxálico reduce el Fe(III) a Fe(II) y por lo tanto estaría indirectamente involucrado en la

ruptura de la celulosa (Espejo y Agosin, 1991). Takao (1965) demostró que a diferencia de los hongos de pudrición blanca, los hongos de pudrición castaña secretan cantidades significativas de ácido oxálico. Esto fue atribuido a la presencia de una oxalato decarboxilasa intracelular en los hongos de pudrición blanca, que descompone el oxalato a CO₂ y formato. Esta enzima no pudo detectarse en cultivos de hongos causantes de pudrición castaña. Kirk *et al.* (1991) comprobaron que muestras de celulosa de algodón depolimerizadas por hongos de pudrición castaña son similares a las degradadas por el reactivo de Fenton. En ambos casos, el tamaño de la molécula degradada de celulosa fue indicativo de depolimerización debida al clivaje en regiones no cristalinas. Estos hallazgos coinciden con la observación de que la ruptura de la pared celular por hongos de pudrición castaña ocurre a cierta distancia de la hifa (Green *et al.*, 1992). Se ha comprobado que los hongos de pudrición castaña clivan completamente a través de las regiones amorfas de las microfibrillas antes de utilizar la celulosa; mientras que los hongos de pudrición blanca atacan la superficie de las microfibrillas resultando en una erosión progresiva, y consumiendo la celulosa a medida que ésta es degradada (Kleman-Leyer *et al.*, 1992).

Cuando dos o más enzimas en suspensión actúan de tal forma que la catálisis total del proceso es superior a la suma de las actividades individuales, se puede concluir que estas enzimas actúan sinérgicamente. Las diferentes actividades del complejo celulasa actúan de un modo sinérgico para degradar la celulosa. Puede ocurrir sinergismo tanto entre como dentro de las diferentes clases de enzimas celulolíticas. Este sinergismo se extiende a mezclas de enzimas provenientes de diferentes hongos (Archer y Wood, 1995; Duff y Murray, 1996). Hay dos clases de sinergismo en los sistemas celulasa: entre endocelulasas y exocelulasas (endo/exo) y exo/exo. El sinergismo endo/exo es fácil de explicar: la acción de las endocelulasas crearía nuevos sitios de acción para las exocelulasas. Las exocelulasas tradicionalmente se definían como aquellas enzimas que liberaban celobiosa a partir de extremos no reductores de la celulosa, pero esta definición resulta inadecuada para explicar el sinergismo exo/exo. Reportes recientes indican que algunas exocelulasas pueden hidrolizar celulosa a partir de extremos reductores. La existencia de dos clases de

exocelulasas con diferentes especificidades puede proveer una explicación para el sinergismo exo/exo (Barr *et al.*, 1996). Aunque el sinergismo entre los distintos componentes del complejo celulasa aún no ha sido completamente elucidado, está claro que depende de diferentes factores: 1- la naturaleza del sustrato, 2- la afinidad del componente celulasa por el sustrato, 3- la estereo-especificidad de dicho componente, 4- la concentración de la enzima, y 5- la proporción entre los componentes enzimáticos (Woodward, 1991; Duff y Murray, 1996).

Existe considerable información acerca de los sistemas celulolíticos fúngicos. Un género en particular, *Trichoderma*, ha probado ser muy útil dada su capacidad para sintetizar y exportar grandes cantidades de enzimas. Más del 50% de la producción de proteína total del organismo puede ser exportada como enzimas extracelulares y con el medio de cultivo apropiado, muchas de éstas pueden ser enzimas celulolíticas. De todos los hongos, *Trichoderma reesei* ha sido el más extensivamente utilizado para investigaciones y para producción comercial de enzimas celulolíticas (Markham y Bazin, 1991).

En *Trichoderma reesei* dos genes que codifican para CBHs, cuatro para EGs, y uno para β -glucosidasa, se han reportado hasta el presente (Ilmén *et al.*, 1997). El hongo produce altos niveles de celulasa en medios que contienen celulosa, también celobionolactona y en un grado variable en presencia de los disacáridos celobiosa o lactosa (Kubicek *et al.*, 1993a; Ilmén *et al.*, 1997). La producción no es significativa cuando se usa glucosa, fructosa o glicerol como fuente de carbono. Un alto nivel de expresión de celulasas se obtiene cuando se usa en el medio de cultivo soforosa (una molécula consistente en dos unidades de glucosa unidas por uniones β -1,2) (Mandels *et al.*, 1962; Nisizawa *et al.*, 1971). Esta molécula puede formarse a partir de celooligosacáridos por transglicosilación mediada por la EG1 o β -glucosidasa (Ilmén *et al.*, 1997). La expresión de los genes para celulasas es regulada a nivel de transcripción. Sin embargo aún se desconoce si la expresión de las diferentes celulasas es regulada por un mecanismo compartido y si un bajo nivel de celulasas constitutivas se expresa en todas las condiciones (Ilmén *et al.*, 1997). Estudios recientes demostraron la presencia de productos de transcripción de dos miembros del sistema celulasa: CBH1 y EG1, en células no inducidas de *Trichoderma reesei*,

los cuales en presencia de celulosa aumentan 1100 veces (Carle-Urioste *et al.*, 1997). Estos resultados avalarían la hipótesis acerca de la existencia de niveles basales de celulasas constitutivas, que degradarían la celulosa nativa liberando oligosacáridos que podrían penetrar en la célula e inducir la síntesis de celulasas. Sin embargo aún no se esclarecido la identidad exacta del compuesto de bajo peso molecular que induce la síntesis de celulasas (Duff y Murray, 1996). Un control adicional de la síntesis de celulasas se ejercería a nivel de incorporación de los oligosacáridos (Kubicek *et al.*, 1993a; 1993b). Una celobiosa permeasa constitutiva resultó inducida a niveles marcadamente mayores por adición de soforosa. La producción de celulasas está sujeta a represión catabólica por glucosa y otros sustratos fácilmente metabolizables (Bisaria y Mishra, 1989). Asimismo la celobiosa permeasa resultó inhibida por glucosa.

Debido a que las celulasas de *Trichoderma* sp. poseen determinadas propiedades insatisfactorias, como ser la baja estabilidad térmica de sus enzimas y la baja producción de β -glucosidasa (Messner *et al.*, 1990; Markham y Bazin, 1991), un número creciente de otras especies fúngicas están siendo objeto de investigaciones. Entre ellas, el Basidiomycete causante de pudrición blanca *Phanerochaete chrysosporium* (Eriksson, 1978; Canevascini *et al.*, 1979; Coughlan, 1985; Kirk, 1988; Jafelice *et al.*, 1990; Bao y Renganathan, 1992; Kremer y Wood, 1992b; Gaikwad y Maheshwari, 1994; Broda *et al.*, 1996; Habu *et al.*, 1997), dada su gran capacidad para degradar lignina, en adición a su poder celulolítico. Estas características son de especial importancia en la utilización de residuos lignocelulósicos ya que generalmente la celulosa es protegida de la descomposición por la lignina.

1.3.1.2. Xilanasas.

Las hemicelulosas son a menudo los primeros componentes de la pared celular que son atacados por los hongos causantes de pudrición, probablemente debido a la menor extensión de sus cadenas, solubilidad y localización expuesta alrededor de las microfibrillas de celulosa (Zabel y Morrel, 1992). Las hemicelulasas se

producen tempranamente en los procesos de pudrición y están asociadas con la degradación de lignina (Eriksson *et al.*, 1990). Degradarían las hemicelulosas en la pared celular inmediatamente adyacente al lumen y se introducirían progresivamente en la pared secundaria, abriendo canales de suficiente tamaño como para permitir el acceso de las enzimas degradadoras de lignina de mayor peso molecular. Las hemicelulosas también proveerían de energía a los hongos causantes de deterioro ya que la lignina sólo aparentemente no puede servir como sustrato para el crecimiento (Kirk y Farrell, 1987). La pérdida de hemicelulosas siempre acompaña la remoción de lignina (Adaskaveg *et al.*, 1990; Eriksson *et al.*, 1990; Blanchette, 1991). La oxidación de la lignina afecta las uniones entre la lignina y la hemicelulosa y también aparenta afectar directamente a las hemicelulosas. La presencia de xilanasas y otras hemicelulasas en la madera durante períodos incipientes de deterioro, provee fuerte evidencia de que estas enzimas pueden penetrar la pared secundaria inmediatamente iniciado el proceso de oxidación (Blanchette *et al.*, 1989).

Las enzimas que degradan las hemicelulosas son primariamente hidrolíticas, y el patrón de ataque es análogo al de degradación de celulosa por las celulasas. Sin embargo, las exoenzimas están ausentes, reflejando probablemente el bajo grado de polimerización de las hemicelulosas (<200). Debido a que la mayoría de las hemicelulosas de la madera son heteropolímeros constituidos por diferentes azúcares, cadenas laterales y grupos sustituyentes, los procesos enzimáticos involucrados en la degradación son mucho más complicados y están recién comenzando a ser elucidados (Zabel y Morrel, 1992).

Dentro de las hemicelulosas, el más abundante es el xilano, por ello las xilanasas constituyen el grupo enzimático más estudiado entre las hemicelulasas. Las D-xilanasas, similares a las celulasas, se componen básicamente de dos grupos de enzimas: endo-1,4- β -D-xilanasas (EC 3.2.1.8), y 1,4- β -D-xilosidasas (EC 3.2.1.37), las cuales en muchos casos están presentes en forma de distintas isoenzimas (Tan *et al.*, 1985; Huang *et al.*, 1991).

En primer lugar actúa la actividad xilanasas, endoenzima que ataca la cadena principal del xilano al azar, causando una disminución en el grado de

polimerización del sustrato por hidrólisis de las uniones β -D-xilopiranosil, con la consiguiente liberación de xilooligosacáridos, xilobiosa y xilosa. Las β -xilosidasas son exoenzimas que ejercen su acción una vez que han actuado las xilanasas, produciendo una fragmentación gradual a partir de los extremos no reducidos de los xilooligosacáridos, o sobre xilobiosa, dando como producto finalmente a la xilosa. Un sistema xilanolítico completo requiere igualmente de las enzimas que actúan sobre sus ramificaciones: α -arabinofuranosidasas (que remueven cadenas laterales de L-arabinosa), α -glucuronidasas (que liberan ácidos glucurónicos de las cadenas laterales) y acetilxilano esterasas (que remueven los grupos sustituyentes acetílicos de la xilosa) (Biely, 1985; Huang *et al.*, 1991; Zabel y Morrel, 1992; Joseleau y Ruel, 1994) (Fig. I₁₁).

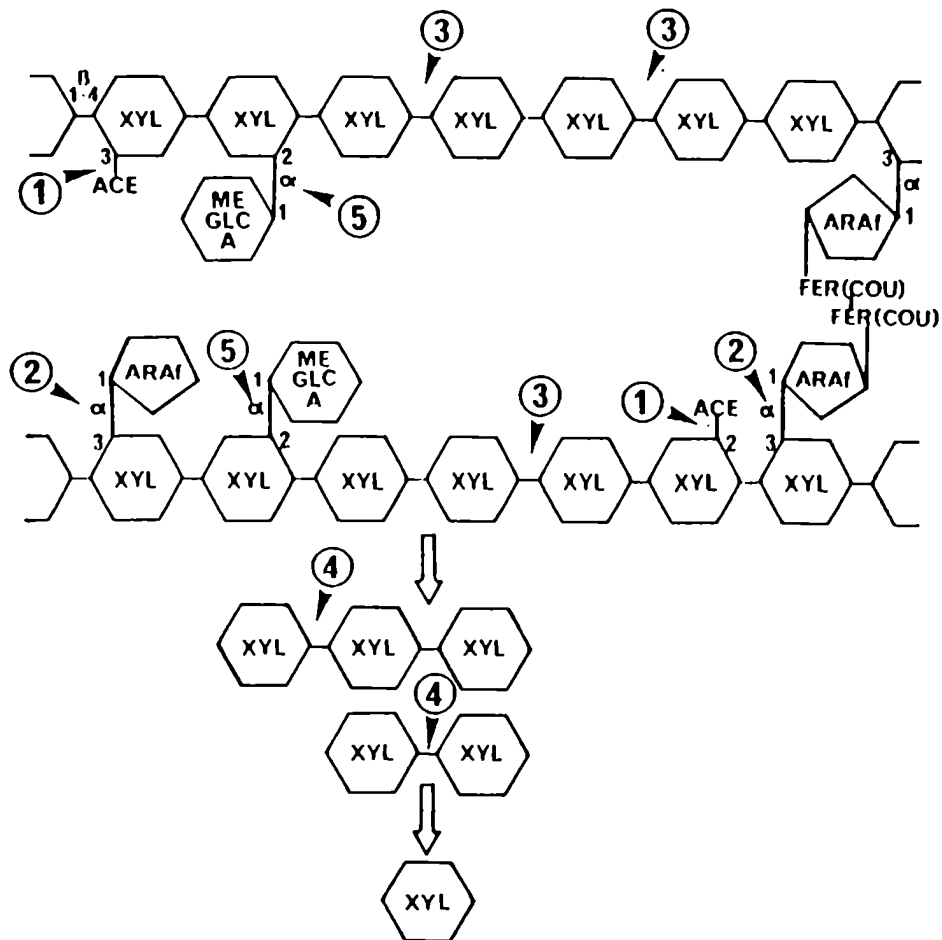


Fig. I₁₁: Estructura de xilano proveniente de pared celular de monocotiledónea y enzimas involucradas en la degradación de xilano. ACE: ácido acético, ARAf: arabinofuranosa, COU: ácido cumárico, FER: ácido ferúlico, MEGLCA: ácido glucurónico o 4-*O*-metilglucurónico, xyl: xilano, 1: acetilxilano esterasa, 2: α -arabinofuranosidasa, 3: endoxilanasas, 4: β -xilosidasas, 5: α -glucuronidasas.

La producción de xilanasas por distintos microorganismos incluye hongos, levaduras y bacterias. Comúnmente se observa que los microorganismos secretan al medio de cultivo varias clases de xilanasas con diferentes propiedades. Son productores de dichas actividades distintas especies de *Aspergillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Streptomyces*, *Sporotrichum*, *Sclerotium*, *Talaromyces* y *Trichoderma*, en los cuales la multiplicidad de las xilanasas ha sido extensivamente estudiada (Wong, 1988; Khandke *et al.*, 1989; Huang *et al.*, 1991; Coughlan y Hazlewood, 1993; Thomson, 1993; Bajpai, 1997).

La regulación de las enzimas involucradas en la degradación del xilano, no ha sido aún objeto de un detallado estudio en hongos lignocelulolíticos. La actividad de las enzimas hemicelulolíticas parece ser constitutiva, o bien inducida cuando los hongos están creciendo en sustratos apropiados, pero existen diferencias en la naturaleza del inductor (Warzywoda *et al.*, 1983; Hrmova *et al.*, 1986; Royer y Nakas, 1990; Coughlan y Hazlewood, 1993). Celulasas y xilanasas están intrincadamente ligadas. Ambas clivan uniones β -1,4-glicosídicas por mecanismos catalíticos semejantes y están por eso íntimamente relacionadas a nivel funcional. Técnicas de recombinación de ADN han permitido clonar genes que codifican varias enzimas que degradan heteroxilanos. La comparación de las secuencias reveló la presencia de dominios comunes a celulasas y xilanasas (Gilkes *et al.*, 1991). Mas aún, con pocas excepciones los organismos capaces de degradar xilano son invariablemente celulolíticos y a menudo secretan complejas mezclas de celulasas y xilanasas concurrentemente (Biely, 1991). Adicionalmente, la ruptura de las uniones β -1,4-glicosídicas dentro de la cadena principal del xilano puede ser también realizada por endoglucanasas bifuncionales que hidrolizan las uniones β -1,4 en la celulosa y el xilano con comparable facilidad. Finalmente la celulosa, el xilano y una variedad de sus catabolitos son todos aparentemente capaces de inducir la síntesis de ambas clases de enzimas en diversos microorganismos celulolíticos y xilanolíticos (Coughlan y Hazlewood, 1993). Por lo expuesto anteriormente, elucidar el mecanismo de regulación de la síntesis de xilanasas resulta muy dificultoso y la generalización probablemente nunca sea posible debido a la

diversidad de mecanismos de control celular (Biely, 1993; Coughlan y Hazlewood, 1993; Bajpai, 1997).

1.3.1.3. Enzimas que intervienen en la degradación de los sustratos pécticos.

Numerosos estudios se han realizado sobre los cambios estructurales y bioquímicos que se suceden durante el proceso de degradación de los complejos lignocelulósicos (Eriksson *et al.*, 1990; Blanchette, 1995), sin embargo, se ha prestado escasa atención al rol de las enzimas pécticas en la modificación de la biomasa lignocelulósica (Coughlan, 1985), y en particular a la alteración de la pectina en maderas infectadas por hongos de pudrición blanca (Johansson, 1988).

Los sustratos pécticos son degradados por microorganismos saprófitos y fitopatógenos, incluyendo hongos y bacterias. Los microorganismos pectinolíticos producen diferentes enzimas pécticas (que actúan sinérgicamente en el proceso de degradación). Existen básicamente tres tipos de enzimas pécticas: pectinesterasas, que catalizan la desesterificación de la pectina; un rango de enzimas depolimerizantes (pectinasas), y protopectinasas, que solubilizan la protopectina para formar pectina. Las pectinasas que catalizan la ruptura de las uniones α -1,4 glucosídicas de los sustratos pécticos, a su vez se distinguen de acuerdo a tres criterios: 1- de acuerdo a los sustratos sobre los que actúan preferentemente: pectina, ácido péctico u oligo-D-galacturonatos; 2- según su modo de acción: por transeliminación o por hidrólisis (hidrolasas o D-galacturonasas y transeliminasas o liasas); y 3- conforme al patrón de acción terminal (-exo) o al azar (-endo) en la ruptura de los enlaces glucosídicos (Sakai, *et al.*, 1993).

Los modos de acción de los diferentes tipos de enzimas pécticas se ilustran en la figura I₁₂. En la misma no se distingue entre endo- y exo-enzimas.

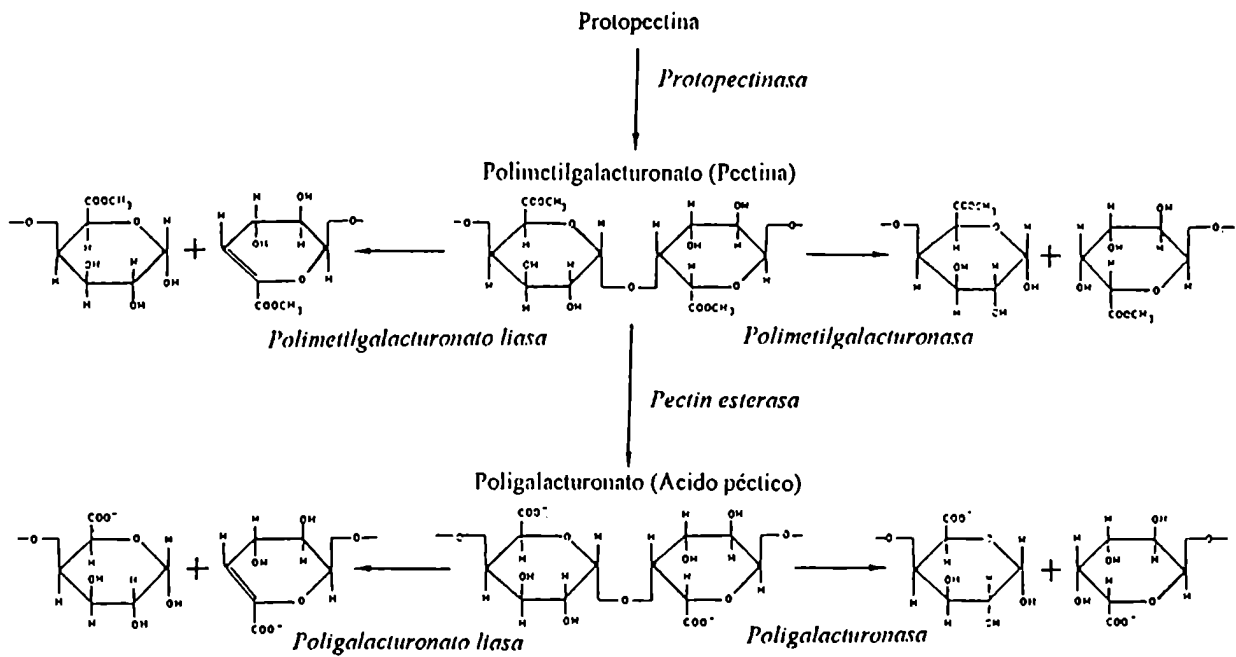


Figura 1₁₂: Modo de acción de las enzimas pécticas.

Existen numerosas evidencias que prueban el rol de las enzimas pécticas en las enfermedades de las plantas causadas por hongos y bacterias (Sakai *et al.*, 1993). Estas enzimas causan maceración de tejidos por degradación de las sustancias pécticas de la laminilla media. En algunos casos, las enzimas pécticas también convierten los polímeros pécticos de la planta huésped a un sustrato utilizable para el crecimiento del patógeno durante el proceso de patogénesis. Sin embargo la importancia de las poligalacturonasas microbianas en patogénesis ha sido establecida no sólo para aquellas enfermedades de las plantas caracterizadas por una rápida y extensiva degradación de las paredes del hospedante, sino también en algunas enfermedades donde sólo ocurre una mínima ruptura de los polisacáridos de la pared celular durante la penetración y colonización de los tejidos del hospedante (De Lorenzo *et al.*, 1987).

Collmer y Keen (1986) distinguen diversos pasos durante la interacción del patógeno pectinolítico y su potencial hospedante: a- el patógeno posee genes estructurales que codifican la producción de las enzimas pécticas con propiedades catalíticas y físicas particulares; b- estos genes se expresan en una forma

característica en los tejidos infectados; c- las enzimas son exportadas desde el citoplasma del patógeno hacia los tejidos del hospedante; y d- en algunos tejidos estas enzimas encuentran inhibidores o sustratos protegidos, mientras que en otros tejidos estas enzimas son activas y degradan polímeros estructurales en la pared celular primaria y en la laminilla media, facilitando así la penetración y colonización del patógeno.

Debido a la accesibilidad de los polímeros pécticos en la pared celular primaria al ataque enzimático y en consecuencia la rápida liberación de inductores pécticos, las enzimas pécticas son las primeras polisacaridasas en ser inducidas cuando los hongos son cultivados sobre paredes celulares aisladas, y las primeras en ser producidas en tejidos infectados (Sakai *et al.*, 1993).

Las pectinasas cumplen un rol importante en la invasión de los tejidos vegetales por fitopatógenos y en la pudrición de frutas y verduras, siendo numerosas sus aplicaciones en biotecnología vegetal y procesamiento de alimentos (ejemplo de ello es la aplicación de enzimas producidas por hongos de distintas especies como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Botrytis cinerea*, *Neurospora crassa*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria alternata*, *Rhizoctonia solani*, etc., en la extracción y clarificación de jugos de frutas y vegetales y en los procesos de fabricación de vinos (Fogarty y Kelly, 1983; Aguilar y Huitron, 1987; Voragen y Pilnik, 1989; Bailey y Pessa, 1990; Bigelis, 1991).

La hidrólisis de celulosa y hemicelulosa en los residuos agrícolas de diverso origen es facilitada por inclusión de enzimas degradadoras de pectina, en las mezclas de sacarificación (Gillespie y Coughlan, 1989). La remoción de la pectina facilita a las enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas un mayor acceso a sus sustratos respectivos incrementándose así la conversión. Debido a ello un sistema enzimático extracelular fúngico capaz de sintetizar todas estas actividades enzimáticas sería particularmente útil en la conversión de la biomasa. A pesar de la importancia económica de la producción industrial de pectinasas por fermentación y el rol primordial de estas enzimas en procesos fitopatogénicos, los fenómenos regulatorios asociados a la producción de pectinasas por hongos han sido escasamente estudiados (Fonseca y Said, 1995; Fraissinet-Tachet y Fevre, 1996).

1.3.1.4. Enzimas involucradas en la degradación de lignina.

Debido a que la lignina es un polímero insoluble, los estadios iniciales de la biodegradación deben ser extracelulares. Los estadios finales que conducen a la mineralización de la lignina que culmina en la liberación de CO₂ posiblemente se lleven a cabo en el interior de las hifas fúngicas. Debido a ello las reacciones extracelulares deben romper a la lignina en fragmentos capaces de difundir a través de las hifas traspasando la membrana celular. A diferencia de otros biopolímeros, los monómeros de lignina están ligados por uniones éter y C-C que no son fácilmente hidrolizables. Evidencias químicas y fisiológicas, demuestran que la degradación de la lignina, como su biosíntesis, es predominantemente oxidativa, aunque pueden también participar reacciones de reducción (Chen y Chang, 1985). Sería de esperar que la oxidación de las ligninas que contienen grupos fenólicos libres produzca una mayor polimerización, y de hecho ese es el efecto más fácil de demostrar *in vitro* (Haemmerli *et al.*, 1986). Sin embargo, se liberan también algunos fragmentos de bajo peso molecular (Kurek *et al.*, 1990). Los hongos ligninolíticos parecen capaces de inclinar el balance entre polimerización y depolimerización a favor de la fragmentación, posiblemente por remoción de estos fragmentos de bajo peso molecular de las mezclas de reacción (Hammel *et al.*, 1993) o por glicosilación (Kondo *et al.*, 1990) o metilación (Chen y Chang, 1985). Debido al proceso de polimerización al azar por el cual se forma, la lignina posee una estructura compleja e irregular. La diversidad de uniones presentes y la irregularidad de su estructura, dificultan la producción, por parte de los hongos ligninolíticos, de enzimas capaces de reconocer y romper todos los enlaces. La solución que aparentemente resultó en la evolución de los hongos de pudrición blanca, es la producción de enzimas de baja especificidad que inician, pero no dirigen, reacciones oxidativas en la lignina. Kirk y Farrell (1987) llamaron a este proceso “combustión enzimática”: la enzima activa la lignina para superar una barrera energética e iniciar una fragmentación oxidativa termodinámicamente favorecida, sin un control posterior de los mecanismos de reacción por parte de la enzima. Los cambios químicos en la lignina ocasionados por los hongos de

putrefacción blanca incluyen: clivajes oxidativos de las cadenas laterales propanoides y demetilación y clivaje oxidativo de los anillos aromáticos (Chen y Chang, 1985). La biodegradación de lignina no procede removiendo ordenadamente las unidades aromáticas periféricas, también involucra la oxidación de anillos aromáticos y cadenas en el interior del polímero, incrementando así la solubilidad y higroscopicidad del núcleo del polímero, paralelamente a la liberación de fragmentos de diferentes tamaños. La naturaleza desordenada de este proceso de degradación concuerda con el concepto de combustión enzimática (Reid, 1995). Varias enzimas extracelulares se encuentran comúnmente en cultivos ligninolíticos de hongos causantes de pudrición blanca (Reid, 1995). Pero diferentes combinaciones de dichas enzimas son producidas por los diversos hongos causantes de la degradación de lignina, sugiriendo que existe más de una estrategia exitosa involucrada en el proceso de biodegradación de dicho polímero (Hatakka, 1994).

Lignin peroxidasa (diarilpropano peroxidasa: LiP) (EC 1.11.1.14): Descubierta por primera vez en *Phanerochaete chrysosporium* (Glenn *et al.*, 1983; Tien y Kirk, 1983), es producida por muchos hongos de pudrición blanca, pero no por todos. Se trata de una hemoproteína extracelular dependiente de H₂O₂ que se caracteriza por su potencial redox inusualmente alto y su bajo pH óptimo (Tien, 1987; Farrell *et al.*, 1989; Gold y Alic, 1993), lo cual le permite, contrariamente al resto de las peroxidases conocidas hasta hoy, abstraer un electrón directamente desde el anillo aromático (Fig. I₁₃), produciendo radicales aril catiónicos que pueden reaccionar posteriormente por una variedad de caminos, incluyendo clivajes C_α-C_β y aperturas de anillo (Hammel *et al.*, 1985; Kersten *et al.*, 1985). La lignin peroxidasa muestra baja especificidad por el sustrato, reaccionando con una gran variedad de compuestos modelo de lignina e incluso moléculas no relacionadas (Barr y Aust, 1994). Esta enzima es susceptible a inactivación por H₂O₂ (Wariishi y Gold, 1990) y a inhibición o enmascaramiento de su acción por componentes del medio lignocelulósico (Bonnen *et al.*, 1994). El alcohol veratrílico (alcohol 3,4-dimetoxibencílico), que puede ser sintetizado por *Phanerochaete chrysosporium* y otros hongos (Hatakka, 1985; Lundell *et al.*, 1990), estimula su acción en diferentes sustratos incluyendo la lignina (Kurek *et al.*, 1990; Hammel *et al.*, 1993); y dicho

efecto ha sido atribuido a su rol como mediador en el proceso: el alcohol veratrílico permitiría la oxidación de la lignina a cierta distancia del sitio activo de la enzima (Harvey *et al.*, 1986), protegería contra la inactivación por el H_2O_2 (Tonon y Odier, 1988; Wariishi y Gold, 1989) o actuaría como sustrato preferencial para la segunda reducción de un electrón en el ciclo catalítico de la enzima (Koduri y Tien, 1994). La lignin peroxidasa es capaz de oxidar al ferrocitocromo c (12300 Da), sugiriendo que esta enzima puede actuar sobre el polímero de lignina (Wariishi *et al.*, 1994). La lignin peroxidasa puede también depolimerizar lignina sintética (DHP: polímeros deshidrogenados) (Hammel *et al.*, 1993)

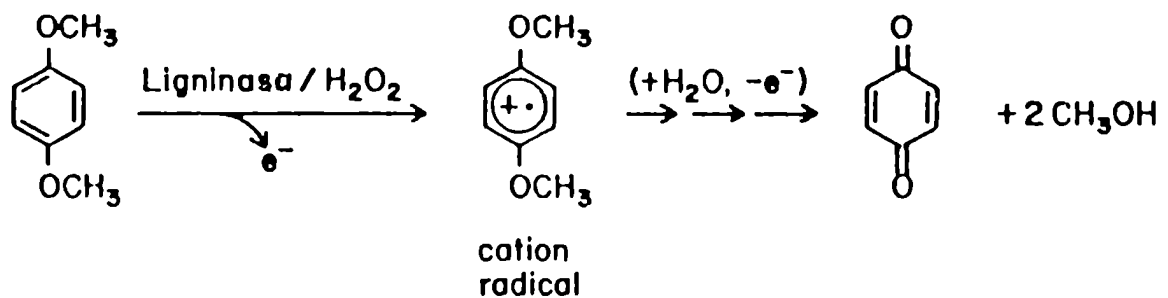


Fig. 1₃: El mecanismo de acción de la lignin peroxidasa se descubrió a partir de estudios con metoxibencenos simples, que eran oxidados por la enzima a especies inestables llamadas radicales catiónicos. Estos se descomponen espontáneamente. En la figura el radical catiónico del 1,4-dimetoxibenceno, se descompone por reacción con el H₂O, produciendo metanol y benzoquinona.

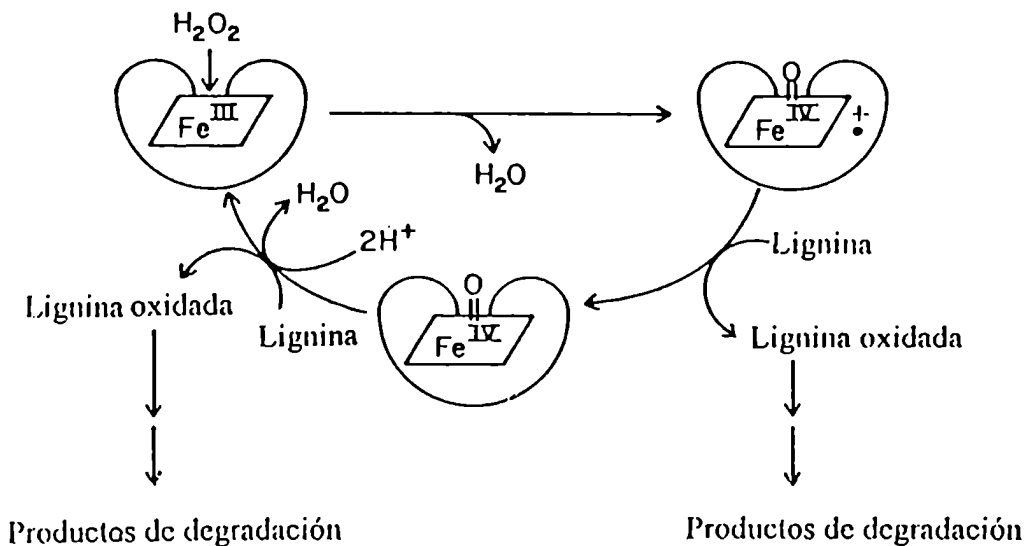


Figura 1₄: Ciclo catalítico de la lignin peroxidasa de *Phanerochaete chrysosporium* (Kirk, 1985).

Manganeso peroxidasa (MnP) (EC 1.11.1.13): Un segundo tipo de hemoperoxidasa, la Mn-peroxidasa, fue posteriormente identificada en el medio de cultivo del mismo hongo (Glenn y Gold, 1985; Paszczynski *et al.*, 1985). La función principal de esta enzima es la oxidación de Mn(II) a Mn(III), éste forma un complejo con ácidos orgánicos (como oxalato, malonato y lactato) y difunde lejos de la enzima para oxidar otros sustratos como la lignina (Fig. I₁₅).

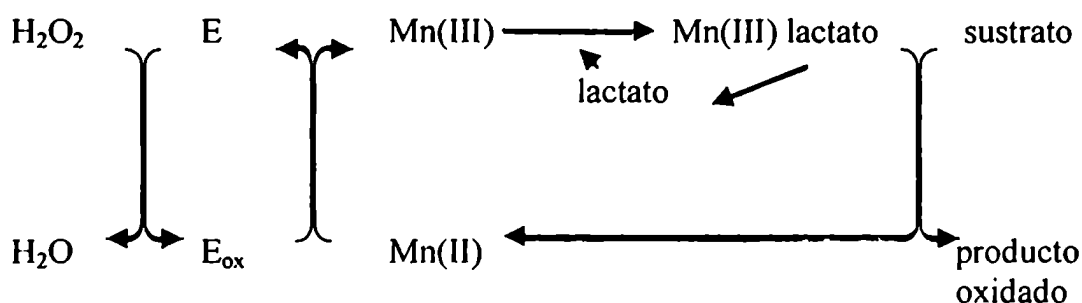


Fig. I₁₅: Mecanismo de acción del sistema Mn-peroxidasa-Mn.

El potencial redox del sistema Mn-peroxidasa-Mn es menor que el de la ligninasa y hasta el presente demostró ser capaz de oxidar *in vitro* principalmente compuestos fenólicos (Vares, 1996). Aunque recientemente se comprobó que el sistema Mn-peroxidasa es capaz de catalizar el clivaje de compuestos modelo de lignina no fenólicos (D'Annibale *et al.*, 1996; Jensen *et al.*, 1996; Martinez *et al.*, 1996). Los sustratos fenólicos se oxidan a radicales fenoxi, que posteriormente pueden reaccionar por demetilación, clivaje alquil-fenil, oxidación C_α o clivaje $C_\alpha-C_\beta$ (Tuor *et al.*, 1992) (Fig. I₁₆). Por último, cabe señalar que las Mn-peroxidasas son capaces de producir H_2O_2 por oxidación de NADH, NADPH y glioxalato, entre otros compuestos (Paszczynski *et al.*, 1985; Urzúa *et al.*, 1998). También oxidan rojo fenol, *o*-dianisidina, y colorantes poliméricos y esta propiedad se utiliza para su valoración. La Mn-peroxidasa parece tener una distribución más amplia que la ligninasa (Bonname y Jeffries, 1990; de Jong *et al.*, 1994b; Hatakka, 1994) y es capaz al igual que la lignin peroxidasa (Hammel y Moen, 1991) de depolimerizar lignina (DHP) *in vitro* (Wariishi *et al.*, 1991). Las evidencias que demuestran que la Mn-peroxidasa cumple un rol crucial en el proceso de biodegradación de sustancias

macromoleculares se están acumulando; por ejemplo, esta enzima cumple un papel fundamental en el proceso de depolimerización de lignina (Wariishi *et al.*, 1991; D'Annibale *et al.*, 1996; Jensen *et al.*, 1996), en el blanqueado de la pulpa de papel (Paice *et al.*, 1993) y en la descomposición de sustancias húmicas (Hofrichter y Fritsche, 1997). Debido a la baja especificidad del Mn(III), el sistema MnP es capaz de oxidar también una gran variedad de contaminantes orgánicos y compuestos xenobióticos: 4-amino-2-nitrotolueno (Valli *et al.*, 1992), hidrocarburos aromáticos policíclicos incluyendo la creosota (Collins y Dobson, 1996), desechos de las industrias del papel que contienen cloroligninas (Lackner *et al.*, 1991), nylon (Deguchi *et al.*, 1997; 1998), etc.

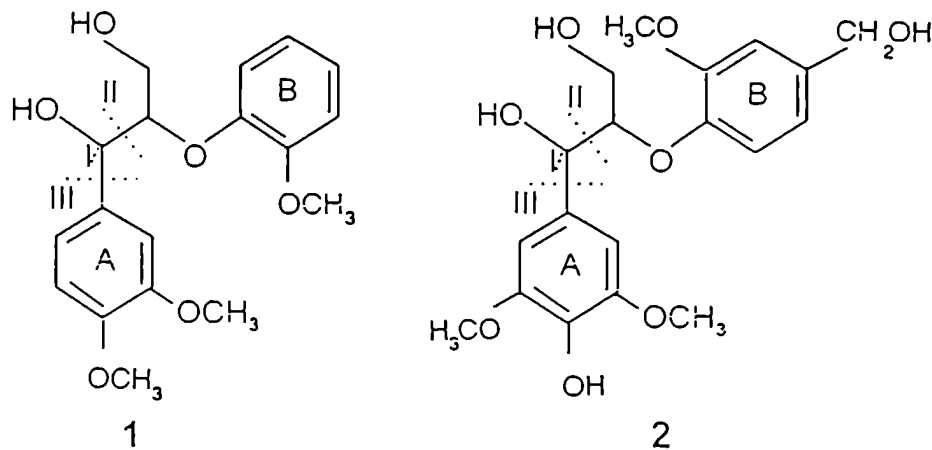


Figura 1₁₆: Compuestos β -O-4 modelo de lignina no fenólicos (1) y fenólicos (2) degradados por la lignin peroxidasa (ambos) y la Mn-peroxidasa (compuesto fenólico) a través de reacciones de oxidación C_{α} (I), clivaje C_{α} - C_{β} (II) y clivaje alquil-fenil (alquil-aril) (III) (Hammel *et al.*, 1985; Kirk y Farrell, 1987; Higuchi, 1989; Wariishi *et al.*, 1989; Eriksson *et al.*, 1990; Tuor *et al.*, 1992)

Lacasa (*p*-difenol: oxígeno óxido-reductasa) (EC 1.10.3.2): Es una polifenoloxidasas glicosilada, que contiene cobre en su sitio activo, no requiere H_2O_2 y cataliza la oxidación de *o*- y *p*-difenoles mediante la abstracción de un electrón y de un protón desde un hidroxilo fenólico, generando radicales fenoxi y reduciendo el O_2 a H_2O (Thurston, 1994). Como la Mn-peroxidasa, normalmente oxida sólo los compuestos de lignina que contienen grupos fenólicos libres, sin embargo en presencia del sustrato artificial ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid))

y otros intermediarios también puede oxidar ciertos compuestos no fenólicos, veratril alcohol y Mn (II) (Bourbounnais y Paice, 1990; Archibald y Roy, 1992; Martinez *et al.*, 1994b; Eggert *et al.*, 1996a; Collins y Dobson, 1997). Esta estrategia llevó al desarrollo de un tratamiento para el blanqueado de la pulpa de papel basado en lacasa que representa la primera aplicación biotecnológica promisorio de un proceso basado en una única enzima ligninolítica (Call, 1994). La lacasa se encuentra en plantas vasculares y hongos, entre estos últimos está ampliamente distribuida en Ascomycetes, Deuteromycetes y Basidiomycetes (Salas *et al.*, 1995). En las plantas vasculares se sugiere que una de las posibles funciones sería su participación en la biosíntesis de lignina (Bao *et al.*, 1993a). Esta enzima es producida por la mayoría de los hongos de pudrición blanca (de Jong *et al.*, 1994b; Hatakka, 1994) e incluso recientemente también se describió su producción por *Phanerochaete chrysosporium* (Srinivasan *et al.*, 1995). *Trametes versicolor* es el hongo productor de lacasa más extensivamente estudiado. La lacasa es capaz tanto de depolimerizar como de polimerizar compuestos modelo de lignina (Ander y Eriksson, 1976; Eriksson *et al.*, 1990). A pesar de que fue la primera enzima relacionada con la degradación de lignina, su rol exacto en dicho proceso es aún incierto (Muñoz *et al.*, 1997). Una posible función de la lacasa puede ser la detoxificación de quinonas de bajo peso molecular y fenoles producidos durante el proceso de degradación de lignina, a través de su oxidación y posterior polimerización, dado que estos productos son tóxicos para los hongos (Bollag *et al.*, 1988).

Las enzimas lignin peroxidasa, Mn-peroxidasa y lacasa son producidas por muchos hongos de pudrición blanca, pero no todas están presentes en muchos de ellos (Peláez *et al.*, 1995; Tuor *et al.*, 1995). *Ceriporiopsis subvermispora* (Rüttimann *et al.*, 1992b), *Phlebia brevispora* (Rüttimann *et al.*, 1992b), *Stereum hirsutum* (Nerud *et al.*, 1991), *Ganoderma valesiacum* (Nerud *et al.*, 1991), *Rigidoporus lignosus* (Galliano *et al.*, 1991) y *Dichomitus squalens* (Perie y Gold, 1991) entre otros, producen Mn-peroxidasa en ausencia de lignin peroxidasa y pueden degradar eficientemente lignina. La lacasa sería la responsable de la oxidación de las subunidades no fenólicas de lignina en estos hongos (Eggert *et al.*, 1996a; Collins y

Dobson, 1997). Métodos inmunocitoquímicos que muestran a esta enzima localizada en paredes celulares de madera degradada, apoyan la participación de la lacasa en ligninólisis (Nicole *et al.*, 1992).

Peroxidasa Mn- independiente: Recientemente se han descrito peroxidases diferentes de la lignin peroxidasa y de la Mn-peroxidasa, a menudo llamadas peroxidases Mn-independientes (MIP) en diferentes hongos de pudrición blanca: entre otros *Bjerkandera* sp., *Junghuhnia separabilima*, *Corioloopsis polyzona*, *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor* (Waldner *et al.*, 1988; Lobarzewski, 1990; de Jong *et al.*, 1992; Vares *et al.*, 1992; Vyas *et al.*, 1994; Novotny *et al.*, 1997), los roles que dichas enzimas pueden cumplir en el proceso de biodegradación de lignina son todavía desconocidos.

La celobiosa quinona oxidorreductasa (CBQ) (EC 1.1.5.1) y la celobiosa deshidrogenasa (CDH) (1.1.99.18), enzimas que oxidan celobiosa y algunos otros carbohidratos y reducen quinonas y los radicales producidos por la acción de la lignin peroxidasa, Mn-peroxidasa y lacasa sobre compuestos modelo de lignina (Ander, 1994), han sido a menudo ligadas al proceso de biodegradación y purificadas y caracterizadas en diferentes hongos de pudrición blanca. Durante el proceso de biodegradación de lignina se forman quinonas intermediarias y su reducción promovería la depolimerización como una alternativa a la polimerización. Algunos de los roles alternativos sugeridos para estas enzimas en el proceso de biodegradación de lignina incluyen la prevención de la polimerización oxidativa de fenoles (Ander *et al.*, 1990), el apoyo a la producción de radicales hidroxílicos por el ciclo de Fenton (Kremer y Wood, 1992b), y la promoción de la acción de la Mn-peroxidasa a través de la creación de agentes quelantes para el Mn(III) y por reducción del MnO₂ (Roy *et al.*, 1994).

Otros compuestos de bajo peso molecular, como porfirinas modificadas (la lignin peroxidasa es una hemoproteína que contiene protoporfirina IX), también difunden en la madera y degradan lignina en forma similar a la lignin peroxidasa (Paszczynski *et al.*, 1988; Cui *et al.*, 1990; Blanchette, 1991). Un estudio ultraestructural de maderas tratadas con metaloporfirinas por 48 hs. reveló patrones

de degradación que no se distinguían de aquellos causados por varias semanas de deterioro fúngico en madera delignificada selectivamente (Paszczynski *et al.*, 1988).

Enzimas productoras de H₂O₂: La actividad de las peroxidasas extracelulares depende del suministro de H₂O₂ extracelular, indicando que el sistema enzimático que provee dicho cofactor, es también un componente clave del sistema de degradación de lignina. Varias enzimas han sido involucradas en la producción de H₂O₂ por cultivos ligninolíticos: glucosa-1-oxidasa (GOD: β-D-glucosa: oxígeno 1-oxidoreductasa, EC 1.1.3.4) (Kelley y Reddy, 1986; 1988), glucosa-2-oxidasa (POD: piranosa:oxígeno 2-oxidoreductasa, EC 1.1.3.10) (Eriksson *et al.*, 1986; Volc y Eriksson, 1988), metanol oxidasa (alcohol oxidasa, EC 1.1.3.13) (Nishida y Eriksson, 1987), glioxal oxidasa (GLOX, EC 1.2.3.5) (Kersten y Kirk, 1987; Kersten, 1990), aril alcohol oxidasa (sinónimo veratril alcohol oxidasa) (AAO, EC 1.1.3.7) (Bourbounnais y Paice, 1988; Guillen *et al.*, 1990), acil coenzima A oxidasa (Green y Gould, 1984), celobiosa oxidasa (CbO) (Ander, 1994) y Mn-peroxidasa (Glenn y Gold, 1985). Para distinguir entre glucosa 1-oxidasa y glucosa 2-oxidasa, se puede utilizar la diferente especificidad por el sustrato (Kelley y Reddy, 1986; Volc y Eriksson, 1988; Zhao y Janse, 1996) (la glucosa 1-oxidasa es altamente específica por D-glucosa y muestra baja afinidad por D-xilosa, en contraste la glucosa 2-oxidasa exhibe actividad contra varios azúcares), o analizar por TLC o HPLC los productos de la acción enzimática.

Los azúcares necesarios para las glucosas oxidasas pueden ser producidos por la acción de celulasas o hemicelulasas sobre los polisacáridos de la madera. El metanol puede ser liberado de los grupos metoxílicos durante el proceso de degradación de lignina (Paice *et al.*, 1993). El glioxal, el etanol y los aril alcoholes son metabolitos excretados por los hongos de pudrición blanca (Kersten y Kirk, 1987; Reid y Deschamps, 1991; de Jong *et al.*, 1994b). El metabolismo intracelular también provee de oxalatos (Evans *et al.*, 1994) y otros ácidos orgánicos que pueden quelar al Mn(III) (Roy y Archibald, 1993). Las evidencias más contundentes sobre el papel en el ataque a las lignocelulosas, involucran a las enzimas que oxidan azúcares y a la glioxal oxidasa, dado que se demostró que éstas se producen durante

el metabolismo secundario o durante la degradación de lignocelulosas cuando se expresan las enzimas ligninolíticas (Eriksson *et al.*, 1986; Kersten y Kirk, 1987; Datta *et al.*, 1991; Daniel *et al.*, 1994; Zhao y Janse, 1996).

Debido a que la lignina nativa es hidrófoba, insoluble y está inmersa en una densa matriz de polisacáridos, el acceso de las enzimas está restringido sólo a la superficie de la pared celular de los elementos xilemáticos (Srebotnik y Messner, 1990; Fluornoy *et al.*, 1993). El contacto físico entre las enzimas y la lignina, puede resultar un factor limitante de la velocidad del proceso de biodegradación de lignina. En el caso de la Mn-peroxidasa, esto no resultaría un problema, ya que el Mn(III) quelado difunde más fácilmente que las proteínas en el complejo lignocelulósico. Para otras enzimas, este problema puede ser resuelto de dos maneras, dependiendo del tipo de pudrición. En la pudrición simultánea, la porosidad de la pared celular no se incrementa lo suficiente como para permitir la penetración de las enzimas (Blanchette *et al.*, 1989; Fluornoy *et al.*, 1993). Sin embargo, en este tipo de pudrición, los polisacáridos son removidos de la pared en la misma proporción que la lignina, de modo que la zona activa de degradación de lignina permanece accesible en forma directa en la superficie. En la delignificación selectiva, la matriz celulósica de la pared secundaria permanece inalterada y la degradación de lignina tiene lugar a una distancia considerable de la superficie del lumen de la fibra. La marcación inmunocitoquímica muestra que la lignin peroxidasa puede penetrar las paredes celulares delignificadas selectivamente (Blanchette *et al.*, 1989), indicando que la remoción de lignina y hemicelulosa crea canales suficientemente anchos para permitir el acceso de las enzimas a los sitios de degradación de lignina. Así, en cualquier caso, las enzimas fúngicas pueden llegar a su sustrato.

1.3.2. Tipos de deterioro resultantes de la degradación fúngica de la madera.

Cuando los microorganismos atacan la madera se produce una serie de acciones degradativas extracelulares (enzimáticas y no enzimáticas) que alteran el sustrato.

Resultan química y morfológicamente distintos tipos de deterioro que pueden ser clasificados en diferentes categorías. Los hongos que degradan la madera se dividen en tres categorías principales: hongos que causan pudrición blanda, blanca y castaña (Fig. 1,7). También se distinguen diferentes categorías de degradación bacteriana basándose en los diferentes aspectos morfológicos del ataque. Estos incluyen deterioro por erosión, excavación de túneles o cavidades (Blanchette, 1995).

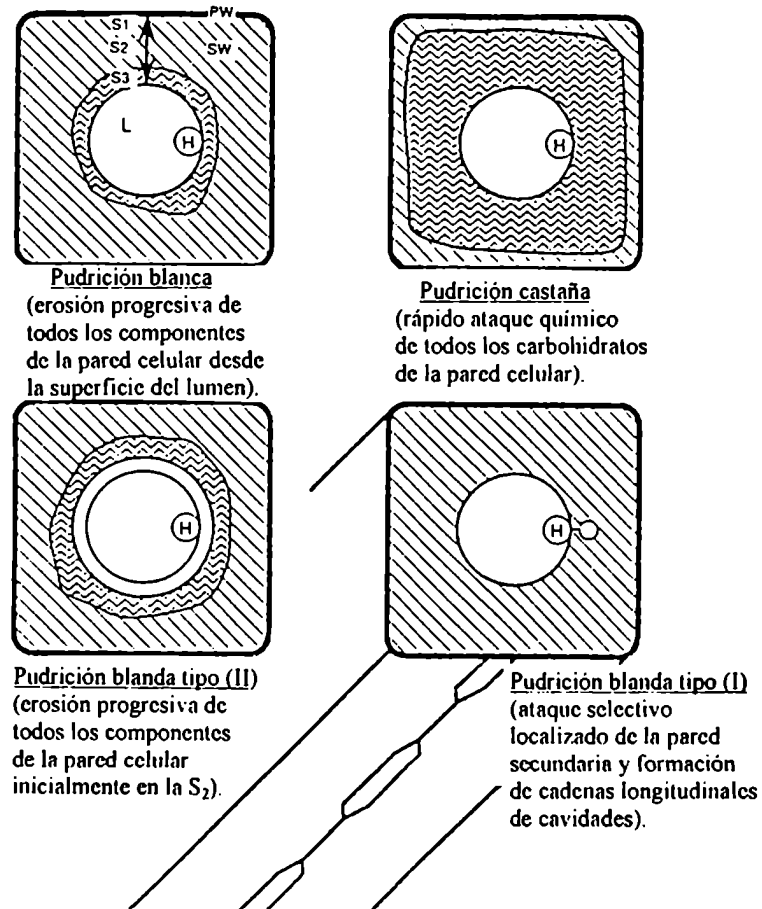




Figura 1,7: Diagrama mostrando los diversos modos de degradación de la pared celular por hongos causantes de pudrición blanda, castaña y blanca. PW-Pared primaria. SW-Pared secundaria. H-Hifa. L-Lumen. Pared celular sana  Pared celular deteriorada 

1.3.2.1. Pudrición blanca

Los hongos causantes de pudrición blanca son un grupo amplio y heterogéneo de Basidiomycetes que se caracterizan por su habilidad para degradar eficientemente

todos los componentes de la pared celular incluyendo la lignina. De las 1600-1700 especies de hongos que deterioran la madera en América del Norte 94% son agentes causales de pudrición blanca (Gilbertson, 1980). Los hongos causantes de pudrición blanca remueven la lignina de la madera siguiendo diferentes patrones morfológicos (Hartig, 1878; Meier, 1955; Liese, 1970; Otjen y Blanchette, 1986; Blanchette, 1991; Srebotnik y Messner, 1994; Blanchette, 1995). Pueden causar una degradación simultánea de la lignina junto con los polisacáridos de la pared celular, dejando células perforadas o con paredes secundarias extremadamente delgadas; o una degradación selectiva de lignina. En este último tipo de deterioro, la lignina de la laminilla media y de la pared secundaria es eliminada casi por completo, quedando intactas grandes cantidades de celulosa en la capa S₂ de la pared celular. Sin embargo, a raíz de la gran variabilidad observada, a menudo resulta difícil colocar a ciertas especies en uno de ambos grupos (Blanchette *et al.*, 1994). Aunque algunos hongos causantes de pudrición blanca parecen atacar la madera siempre selectiva o no selectivamente, existen numerosos ejemplos donde un mismo hongo produce ambos tipos de ataque en el mismo sustrato. Este fenómeno fue descrito por primera vez por Hartig (1878) (Fig. I₁₈) y es frecuente en maderas atacadas por *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma tsugae*, *Heterobasidion annosum* y muchos otros hongos de pudrición blanca (Blanchette, 1984a; 1984c; Adaskaveg y Gilbertson, 1986; Adaskaveg *et al.*, 1990; Blanchette, 1991). Incluso algunos hongos degradan selectivamente lignina durante estadios incipientes de la pudrición, pero en estadios posteriores del ataque remueven la celulosa residual (Eriksson *et al.*, 1990). También se reportan diferencias cuando se comparan cepas de una misma especie (Blanchette *et al.*, 1988a; Blanchette, 1991; Blanchette *et al.*, 1992a). El ampliamente estudiado *Phanerochaete chrysosporium* ha mostrado asimismo variabilidad con respecto al tipo de degradación (selectivo o no-selectivo) (Eriksson *et al.*, 1990; Messner y Srebotnik, 1994; Ruel *et al.*, 1994). Ciertos hongos pueden causar una degradación selectiva de lignina en un tipo de madera, y una degradación simultánea en otra especie arbórea: *Ganoderma australe* causó una degradación altamente selectiva de lignina en *Nothofagus dombeyi*, cuya madera posee una de las mayores relaciones de siringil a guayacil lignina (S/G =

6.3), mientras que en *Laurelia philippiana* (S/G = 0.8) la degradación de los componentes de la pared celular resultó no selectiva (Agosin *et al.*, 1990).

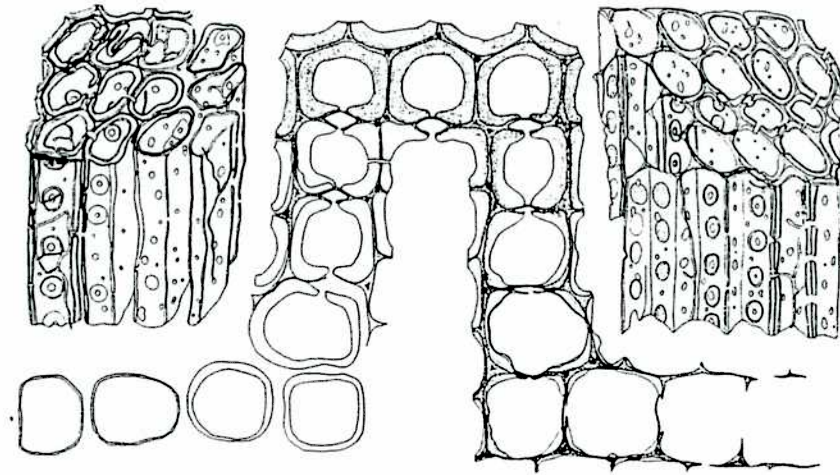


Figura 118: Dibujo de Hartig (1878) mostrando dos formas de pudrición blanca en madera de *Pinus sylvestris* atacada por *Heterobasidion annosum*. A la izquierda se pueden observar estadios incipientes a avanzados de un proceso de delignificación selectiva. La lignina (áreas punteadas) es progresivamente removida de las paredes celulares de las traqueidas, resultando en células carentes de laminilla media. Una vez que la lignina es removida, la actividad celulolítica gradualmente degrada la pared secundaria delignificada. A la derecha del gráfico, se observa una degradación simultánea de todos los componentes de la pared celular. Esta forma de pudrición blanca resulta en una erosión de la pared secundaria seguida por porciones de la laminilla media. Las últimas áreas en ser degradadas son las laminillas medias lignificadas. Este dibujo representa la primera observación de delignificación selectiva en la madera y muestra que los hongos de pudrición blanca pueden producir ambos tipos de degradación.

Los motivos que originan diferentes formas de ataque a la pared celular todavía no han sido elucidados, pero probablemente estén relacionados con diferencias en las enzimas oxidativas producidas por el hongo y también sistemas de represión de las enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas (Blanchette, 1995). Factores ambientales (entre otros: temperatura, humedad, concentración de oxígeno y nitrógeno) pueden afectar también la cantidad de lignina degradada (Reid, 1989; Blanchette, 1991). En general, el tipo de lignina y su concentración en la madera afecta el deterioro causado por hongos de pudrición blanca (Kirk *et al.*, 1975; Highley, 1982; Faix *et al.*, 1985; Blanchette, 1991). La S lignina es preferentemente degradada, mientras que la G lignina es más resistente. Los hongos causantes de pudrición blanca son más comúnmente descomponedores de madera de angiospermas que de

gimnospermas en los ecosistemas forestales (Gilbertson, 1980). Como se explicó previamente, la madera de angiospermas contiene concentraciones variables de G y S lignina. Sin embargo, a pesar de que la S lignina aparenta ser preferentemente degradada por los hongos de pudrición blanca, muchas especies de este grupo están a menudo asociadas con el deterioro en madera de gimnospermas que no contienen S lignina. *Heterobasidion annosum*, *Armillaria ostoyae*, *Phellinus pini*, *Phellinus weirii*, entre otros, son hongos de pudrición blanca que comúnmente causan pudrición blanca en coníferas. Estos hongos aparentemente tienen eficientes sistemas de degradación que mineralizan la G lignina (Blanchette, 1991; 1995). Debido a que ciertos hongos que degradan selectivamente la lignina de la madera son capaces de causar áreas de degradación simultánea en la misma madera, los análisis químicos del sustrato entero pueden representar en forma errónea el potencial de dichos hongos para causar degradación selectiva de lignina (Otjen *et al.*, 1987). Varios métodos de análisis, incluyendo las observaciones micromorfológicas, parecen ser un requisito esencial para el análisis del potencial de delignificación selectiva de la madera (Otjen *et al.*, 1987).

Tanto la microscopía electrónica de barrido como la microscopía óptica han sido usadas para diferenciar los tipos de podredumbre causados por distintos hongos de pudrición blanca (Blanchette, 1984b; Otjen *et al.*, 1987; Srebotnik y Messner, 1994). Se han realizado numerosos estudios anatómicos sobre pudrición blanca, pero la mayoría de ellos, analizan maderas usualmente industrializadas en el hemisferio norte (Blanchette, 1984b; Blanchette y Reid, 1986; Srebotnik y Messner, 1994). Diversas especies del género *Trametes* han sido investigadas: *T. versicolor* (Cowling, 1961; Srebotnik y Messner, 1994) y *T. hirsuta* (Srebotnik y Messner, 1994) causaron pudrición blanca del tipo de degradación simultánea. *T. radiciperda* (*Heterobasidion annosum*) causó una degradación simultánea en madera de *Picea* y delignificó selectivamente madera de abedul en condiciones de laboratorio (Meier, 1955). Mientras que en tocones de *Pinus resinosa*, en el bosque, causó simultáneamente degradación selectiva y simultánea (Blanchette, 1994). *T. trogii* en un estudio previo de pudrición *in vitro* en madera de álamo causó sólo degradación simultánea (Lopez y Deschamps, 1978).

1.3.2.2. Pudrición blanda.

Este término fue usado por primera vez por Savory (1954) para describir un tipo de ataque a la madera en ambientes húmedos por hongos clasificados dentro de los Ascomycota y Deuteromycota. Los contornos de la madera húmeda deteriorada tienen una apariencia blanda, amarronada que se torna quebradiza cuando se seca. Todos los componentes de la pared celular pueden ser degradados durante la pudrición blanda, pero usualmente existe una preferencia por los carbohidratos, especialmente en las maderas de angiospermas (Esllyn *et al.*, 1975; Nilsson *et al.*, 1989). En general, se reconocen dos formas de pudrición blanda: tipo I, que consiste en cadenas de cavidades con extremos cónicos, que se forman dentro de la capa S₂, normalmente alineadas con las microfibrillas de celulosa; y tipo II, en la cual se da una erosión gradual de toda la pared secundaria. La laminilla media no es erodada y persiste aún en estadios avanzados del deterioro. Esta característica distingue al tipo II de pudrición blanda de la degradación no selectiva causada por hongos de pudrición blanca, dado que estos últimos erosionan y pueden destruir completamente la laminilla media (Blanchette, 1995). Se producen variaciones considerables en la degradación por diferentes hongos causantes de pudrición blanda, y resulta dificultoso diferenciar y clasificar maderas atacadas por dichos hongos sin recurrir a considerables análisis químicos y ultraestructurales. Químicamente la pudrición blanda en madera de abedul pudo ser distinguida de la pudrición blanca por una menor pérdida de lignina Klason (lignina Klason: residuo insoluble, condensado de lignina, que queda luego de la hidrólisis de los polisacáridos de la madera con ácido sulfúrico al 72%), y de la castaña por su mucha menor solubilidad en álcalis. Anatómicamente, la erosión en las paredes celulares de las fibras causada por hongos de pudrición blanda, pudo distinguirse de aquella originada por los de pudrición blanca por los canales de erosión angulares, muescas en forma de V y aperturas de las puntuaciones erosionadas en forma romboidal en los casos de pudrición blanda; mientras que en los casos de pudrición blanca estos adquieren formas redondeadas (Worrall *et al.*, 1997). Para facilitar una apropiada calificación del deterioro, Nilsson (1988) ha sugerido que el término

podrición blanda debería incluir la podrición causada por todos los hongos pertenecientes a los Deuteromycota y Ascomycota. En el pasado, el deterioro por *Daldinia*, *Hypoxilon*, *Xylaria* y otros Ascomycetes, se consideraba causado por hongos de podrición blanca. Estos hongos sin embargo, causan una típica forma tipo II de podrición blanda y no lo que es característico para los hongos de podrición blanca (Nilsson *et al.*, 1989). Hasta que un mejor esquema de clasificación sea aceptado, la definición propuesta por Nilsson para la podrición blanda, parece ser la más apropiada.

La podrición blanda se halla generalmente asociada con maderas en ambientes húmedos, pero también ocurre en sitios relativamente secos (Blanchette *et al.*, 1990; Blanchette, 1995). Investigaciones recientes han demostrado que la podrición blanda prevalece en maderas con altas concentraciones de compuestos que otorgan resistencia natural a las maderas, y maderas preservadas con diferentes químicos (Nilsson y Henningson, 1978; Daniel y Nilsson, 1989). Aparentemente la podrición blanda predominaría en ambientes demasiado severos para los hongos causantes de podrición blanca o castaña (ej.: demasiado húmedos o secos) y en sustratos que no favorecen el crecimiento y desarrollo de otros tipos de hongos (Blanchette, 1995). El tipo I de podrición blanda es común en madera de coníferas. Las hifas penetran la pared secundaria desde el lumen y producen cadenas de cavidades cilíndricas en la S₂, a menudo con extremos puntiagudos dentro de la pared celular. Las cavidades se producen por fases de crecimiento oscilatorio de las hifas que penetran en la pared celular, seguidas por la degradación de la pared celular secundaria que las rodea (Eaton y Hale, 1993). A medida que progresa el deterioro, numerosas cavidades coalescen para formar huecos mayores. Esta peculiar forma de deterioro resulta en la remoción de todo el material de la pared celular dentro de la región de la cavidad, dejando materiales electrodensos alrededor de la zona degradada que aparentemente son ligninas residuales modificadas (Daniel y Nilsson, 1989). La pared terciaria, lindante con el lumen celular, a menudo tiene un alto contenido de fenoles, al menos en las maderas de coníferas. Esta capa puede resultar difícil de erosionar por los hongos de podrición blanda, ya que ellos son capaces de degradar la lignina sólo en forma limitada. La formación

de cavidades puede ser una forma de colonizar porciones menos lignificadas de la pared celular.

En la madera de muchas angiospermas es muy común el tipo II de pudrición blanda (Nilsson, 1973). Las paredes celulares son erosionadas progresivamente desde el lumen celular hacia la laminilla media. Las capas de pared secundaria son asimismo degradadas, pero el deterioro no afecta a la laminilla media. Probablemente la alta concentración de unidades de G lignina en la laminilla media, le imparta resistencia al deterioro por hongos de pudrición blanda. Algunos investigadores han postulado que las peroxidasas ligninolíticas producidas por algunos de estos hongos podrían no tener el potencial oxidativo suficiente para atacar y alterar en forma exitosa a la G lignina. Sin embargo la S lignina es oxidada y mineralizada por las enzimas producidas por estos hongos (Nilsson *et al.*, 1989). Las altas concentraciones de unidades siringil propano en la pared secundaria son degradadas junto con la celulosa y la hemicelulosa, y la pared entera es erodada. En células como las de los vasos que contienen una baja proporción S:G, no se observa erosión pero pueden formarse cavidades dentro de la pared celular (Nilsson *et al.*, 1989). De acuerdo a ello la formación de cavidades puede ser una característica que resulta influida por el tipo y concentración de lignina presente. En las coníferas, ricas en G lignina, se observa formación de cavidades asociadas al deterioro causado por hongos de pudrición blanda (Blanchette, 1995).

1.3.2.3. Pudrición castaña.

La lignocelulosa presente en la madera es alterada drásticamente por los hongos de pudrición castaña. Estos hongos, clasificados dentro de los Basidiomycota, causan un ataque difuso sobre la celulosa en estadios tempranos del proceso de deterioro. Remueven los polisacáridos, pero la alta concentración de lignina que queda en la madera deteriorada evidencia la limitada capacidad de estos hongos para degradar la lignina. La lignina residual sin embargo, está químicamente alterada y diversas investigaciones revelan que ocurre cierto grado de degradación de lignina (Illman y Highley, 1989). Estudios recientes sin embargo, indican que la pudrición castaña

ocasiona pérdidas sustanciales de lignina Klason (Blanchette *et al.*, 1994), de incluso hasta un 26% en abedul y 21% en álamo (Worrall *et al.*, 1997). En la pudrición castaña, estas pérdidas se incrementarían durante estadios avanzados de la pudrición. Mientras que en el caso de la pudrición blanca, la delignificación es más selectiva cuando se registra al comienzo del proceso de pudrición (Worrall *et al.*, 1997).

La madera deteriorada queda de color marrón y consiste principalmente de lignina modificada químicamente y a menudo se rompe en fragmentos cúbicos. Una característica distintiva de los hongos causantes de pudrición castaña es su capacidad para depolimerizar la celulosa en estadios tempranos del deterioro, causando pérdidas sustanciales en la resistencia de las maderas atacadas (Cowling, 1961; Eriksson *et al.*, 1990; Zabel y Morrel, 1992). A pesar de que los mecanismos involucrados en el deterioro de la madera no están totalmente esclarecidos, existen dos importantes diferencias entre las pudriciones blanca y castaña. En primer lugar, los hongos de pudrición blanca degradan lignina extensivamente, lo que les facilitaría el acceso enzimático a los carbohidratos. En cambio, los hongos de pudrición castaña no causan una pérdida tan extensiva de lignina Klason, y usualmente carecen de las fenol oxidasas extracelulares que son características en los hongos de pudrición blanca. En segundo lugar, mientras que los hongos de pudrición blanca degradan enzimáticamente los carbohidratos sobre la superficie expuesta, los hongos de pudrición castaña aparentemente tienen un mecanismo oxidativo no enzimático para la depolimerización inicial de los carbohidratos y usualmente carecen de exoglucanasas (Worrall *et al.*, 1997).

Como ya se explico anteriormente (véase sección 1.3.1.1.) los hongos de pudrición castaña clivan completamente a través de las regiones amorfas de las microfibrillas antes de utilizar la celulosa; mientras que los hongos de pudrición blanca atacan la superficie de las microfibrillas resultando en una erosión progresiva, y consumiendo la celulosa a medida que ésta es degradada (Kleman-Leyer *et al.*, 1992).

Los mecanismos responsables de esta depolimerización difusa de la celulosa, no han sido completamente esclarecidos, pero se sabe que las enzimas celulolíticas son demasiado grandes como para penetrar la madera sana y difundir a través de las

paredes celulares (Highley e Illman, 1991). En cambio, aparentemente ocurren reacciones no enzimáticas que involucrarían formas de oxígeno reducido. Un modelo aceptado de cómo ocurre la depolimerización, incluye la producción de radicales hidroxílicos a partir de H_2O_2 y sales ferrosas por la reacción de Fenton (Highley e Illman, 1991). Kirk *et al.* (1991) caracterizaron químicamente y compararon la celulosa degradada por el hongo de pudrición castaña *Oligoporus placenta* y celulosa tratada por hidrólisis ácida, el reactivo de Fenton, y otros oxidantes químicos, y encontraron que la celulosa tratada por el sistema de Fenton se parecía notoriamente a la obtenida por pudrición castaña. Se detectó asimismo, presencia de radicales hidroxílicos en madera inoculada con hongos de pudrición castaña, usando un método basado en quimioluminiscencia (Backa *et al.*, 1992). La adición de veratril alcohol incrementó la producción de radicales hidroxílicos y se postula que la presencia de compuestos de lignina puede estimular el proceso de pudrición castaña. La mayoría de los hongos de pudrición castaña son incapaces de atacar y utilizar a la celulosa pura (Nilsson, 1974; Highley, 1977). Un contacto entre la celulosa y la madera parece ser necesario para su degradación. Una íntima asociación espacial parece requerirse, ya que la celulosa altamente cristalina encontrada en bolsillos blancos delignificados por hongos de pudrición blanca, no resultó degradada cuando la madera fue subsecuentemente atacada por hongos de pudrición castaña. Sin embargo la madera relativamente sana, existente entre los bolsillos, sí resultó deteriorada por los hongos de pudrición castaña (Blanchette, 1983). Aparentemente, se requiere de la matriz lignocelulósica completa para que los sistemas de degradación de los hongos causantes de pudrición castaña resulten inducidos y funcionales.

La producción de ácido oxálico por hongos causantes de pudrición castaña, se ha propuesto asimismo, como un importante factor precelulolítico, que posiblemente actúe como un quelante para ayudar a inmovilizar al Fe, Mn y otros iones metálicos que podrían ser utilizados durante el proceso no enzimático (Espejo y Agosin, 1991).

Durante los primeros estadios del deterioro, cuando ocurre la depolimerización de la celulosa, se detecta por microscopía una rápida pérdida de birrefringencia en la

madera, utilizando luz polarizada (Wilcox, 1968). A medida que progresa el deterioro ocurre una disolución general de la celulosa y la hemicelulosa, dejando un frágil marco de lignina. Las paredes celulares carecen de rigidez y toman apariencia porosa. Sin la celulosa, el residuo lignificado carece de integridad y puede fracturarse a partículas de polvo. Los hongos de pudrición castaña a menudo deterioran tanto residuos forestales de coníferas como madera en servicio. Estos hongos aparentemente no son inhibidos por la madera rica en guayacil lignina de las gimnospermas. Muchos de ellos, como *Serpula lacrymans*, *Meruliporia incrassata* y *Gloeophyllum trabeum* deterioran la madera usada en edificios y otras estructuras. La habilidad de los hongos de pudrición castaña de atacar la celulosa sin remover previamente a la lignina los hace capaces de colonizar diferentes maderas y dañar su resistencia durante estadios incipientes del deterioro (Blanchette, 1995).

1.3.3. Factores que afectan la degradación de las lignocelulosas.

La lignina que forma un complejo lignina-carbohidrato con la celulosa y las hemicelulosas, es altamente resistente al ataque microbiano y protege a los polisacáridos de la pared de la degradación. Asimismo la madera es relativamente pobre en nutrientes minerales y vitaminas, más aún la relación C:N es muy alta 300-1000:1 (Zabel y Morrel, 1992), lo que hace que la madera sea un sustrato inadecuado para muchos saprófitos. Los hongos que deterioran madera están adaptados a esas condiciones de muy baja concentración de nitrógeno y reusan el nitrógeno liberado luego de la autólisis del micelio viejo (Levi *et al.*, 1968), junto con el nitrógeno se ha reportado traslocación de macro y microelementos (especialmente Mn y Ca) en el micelio y la madera durante el proceso de deterioro por hongos (Blanchette, 1995). Entre otros importantes factores que influyen sobre las condiciones de degradación en tejidos leñosos están las altas concentraciones de CO₂ y las bajas concentraciones de O₂ y la presencia de compuestos fenólicos, resinas, taninos, terpenos, los cuales pueden ser tóxicos para los microorganismos (Sjöström, 1993; Dix y Webster, 1995). La humedad también tiene un efecto

importante sobre el crecimiento de los hongos que deterioran madera (Boddy, 1986; Rayner y Boddy, 1988). En una selva húmeda se esperaría que la madera deteriorada absorba un exceso de humedad y se sature, sin embargo esto no ocurre, en cambio el hongo produce placas pseudoesclerociales que cubren el exterior de la madera deteriorada, regulan el contenido de humedad y aparentemente limitan la entrada de un exceso de agua. En regiones secas estas mismas estructuras funcionarían restringiendo la pérdida de agua (Blanchette, 1984c; Abe, 1989; Agosin *et al.*, 1990; Eriksson *et al.*, 1990). La habilidad de los hongos una vez que han colonizado un sustrato para prevenir la desecación o la entrada de excesiva humedad, sugiere que pueden regular parcialmente las condiciones que les permiten continuar con el proceso de degradación. Otro factor decisivo es la cantidad y tipo de lignina presente en la madera (véase punto 1.3.2.): el potencial oxidativo de la siringil lignina es mayor que el de la guayacil lignina, y éste a su vez es más alto que el de p-hidroxifenil lignina (Kirk y Farrell, 1987), y consecuentemente la siringil lignina es degradada más rápidamente que la guayacil lignina, seguida por la p-hidroxifenil lignina, que es la más resistente (Faix *et al.*, 1985; Blanchette *et al.*, 1988b; 1994).

Mientras que la degradación de la celulosa ocurre durante el metabolismo primario, bajo condiciones de laboratorio, la mineralización de la lignina por *Phanerochaete chrysosporium* ha sido caracterizada como un evento del metabolismo secundario, desencadenado por carencia de C, N o S (Kirk *et al.*, 1978; Jeffries *et al.*, 1981; Faison y Kirk, 1985; Kirk y Farrell, 1987; Dosoretz y Grethlein, 1991). En efecto la lignina es degradada solamente una vez terminado el crecimiento primario. Esto demuestra que los dos sistemas de degradación pueden funcionar en diferentes momentos y bajo diferentes condiciones. Sin embargo, las altas concentraciones de nutrientes de rápida metabolización en el medio de cultivo líquido, que promueven el rápido crecimiento del hongo, tienen escasa semejanza con el sustrato natural sólido que consiste en polímeros insolubles. Estudios de degradación de madera demuestran que *Phanerochaete chrysosporium* degrada lignina, celulosa y hemicelulosa simultáneamente (Eriksson *et al.*, 1990; Daniel, 1994; Srebotnik y Messner, 1994). En consecuencia, en la naturaleza los sistemas que degradan la

lignocelulosa pueden actuar sinérgicamente, lo que parece lógico si se tiene en cuenta que a pesar de que los hongos de pudrición blanca utilizan la lignina de la madera, no pueden utilizarla como única fuente de carbono y requieren de carbohidratos como celulosa, celobiosa y glucosa para degradar eficientemente la lignina. Las peroxidasas que degradan lignina están asociadas con sistemas que generan H_2O_2 y presumiblemente dependen tanto del metabolismo de los carbohidratos como de la lignina (Kirk y Farrell, 1987). Si el carbohidrato proviene de los polisacáridos de la lignocelulosa, esto implica un vínculo funcional en la degradación de los diferentes componentes de la lignocelulosa (Broda *et al.*, 1996). Se estudió en *Phanerochaete chrysosporium* ME446 (Broda *et al.*, 1995) la expresión génica, en dos medios complejos conteniendo polímeros naturales (avicel: una celulosa cristalina y paja molida: representando lignocelulosa), se comparó con la obtenida en medios de cultivo mínimos conteniendo tanto baja como altas concentraciones de glucosa. La concentración de nitrógeno en todos los casos fue limitante. Algunos genes que codifican ciertas isoformas de lignin peroxidasa se expresaron solamente cuando la fuente de carbono fue el avicel, por lo tanto la celulosa o alguno de sus productos solubles induce su expresión. Esto es una demostración directa del vínculo postulado entre la degradación de celulosa y lignina. La celobionolactona, resultado de la acción de la celobiosa deshidrogenasa sobre la celobiosa (principal producto de la degradación de la celulosa), podría ser el producto de la celulosa que induce la expresión de dichos genes (Broda *et al.*, 1996). Asimismo estudios recientes mostraron la presencia de lacasa en *Phanerochaete chrysosporium*, la misma fue detectada en medios con celulosa y no se produce en medios con glucosa (Srinivasan *et al.*, 1995). En *Phanerochaete chrysosporium* el sistema ligninolítico es típico de la fase de metabolismo secundario, y no es inducible. La lignina no es un sustrato energético que permita el crecimiento, necesita por lo tanto de un cosustrato que permita el crecimiento y la síntesis del sistema ligninolítico. Durante el crecimiento secundario aumenta la actividad ligninolítica, surgen nuevas ramificaciones hifales, se sintetiza veratril alcohol y se sintetiza un polisacárido extracelular. Este glucano extracelular, ocurre como vaina hifal y también libre en el cultivo.

La mayoría de las investigaciones acerca de los factores que afectan la degradación de lignina *in vitro* se han realizado en *Phanerochaete chrysosporium*, sin embargo las condiciones fisiológicas para la degradación de lignina, así como los patrones de secreción de las diferentes enzimas ligninolíticas varían entre las diferentes especies fúngicas (Hatakka, 1994). Ocasionalmente también se detectó producción de enzimas ligninolíticas por hongos de pudrición blanca durante el metabolismo primario (Buswell *et al.*, 1995; Eggert *et al.*, 1996b), a pesar de que la ligninólisis ocurre durante la fase de metabolismo secundario en respuesta a la falta de nutrientes (Boominathan y Reddy, 1992). La expresión de las enzimas ligninolíticas en *Phanerochaete chrysosporium*, ocurre bajo condiciones limitantes de carbono, nitrógeno o azufre, y es particularmente activa bajo altas tensiones de oxígeno (Buswell y Odier, 1987; Kirk y Farrell, 1987). Los parámetros de cultivo son críticos para la expresión del sistema ligninolítico (Kirk, *et al.*, 1978; Buswell y Odier, 1987). Varios suplementos nutricionales (Kirk *et al.*, 1986), alcohol veratrílico (Faison y Kirk, 1985) y otros inductores (Janshekar y Fiechter, 1988), Mn (Blanchette, 1984a; Bonnarme y Jeffries, 1990; Kerem y Hadar, 1993; Blanchette, 1995), ácidos grasos y cambios de temperatura (Asther *et al.*, 1988), han sido empleados para mejorar su producción. La composición de la mezcla de isoenzimas y su actividad específica también son afectadas por la composición del medio (Kirk *et al.*, 1986), la edad del cultivo y la fuente de carbono (Leisola *et al.*, 1987; Asther *et al.*, 1988; Farrell *et al.*, 1989) y el nivel de Mn(II) (Bonnarme y Jeffries, 1990). La producción de enzimas ligninolíticas es sensible a la agitación, sin embargo su síntesis fue posible bajo condiciones de agitación moderada mediante la adición de detergentes (Holzbaur *et al.*, 1988).

Bajos niveles de nitrógeno han demostrado estimular la degradación de lignina por diferentes hongos de pudrición blanca, mientras que altas concentraciones de nitrógeno estimulan la degradación de los polisacáridos (Kirk *et al.*, 1978; Fenn y Kirk, 1981; Reid, 1983a). Mientras que el efecto supresor del nitrógeno sobre la degradación de lignina por *Phanerochaete chrysosporium* y otros Basidiomycetes causantes de pudrición blanca, es compatible con el bajo contenido de nitrógeno de la madera, resulta claro ahora que no todos los hongos ligninolíticos exhiben la

misma respuesta (Buswell, 1991). La actividad ligninolítica de algunos hongos de pudrición blanca no es afectada por la concentración de nitrógeno (Leatham y Kirk, 1983; Blanchette, 1991; Kaal *et al.*, 1993; Collins y Dobson, 1995). La concentración de oxígeno también afecta la degradación de lignina. En general la mayoría de las investigaciones demostraron que los mayores niveles de actividad ligninolítica en cultivos en agitación se asocian con altas concentraciones de oxígeno (hasta el 100%) (Kirk *et al.*, 1978; Reid y Seifert, 1982). Aparentemente más que su concentración en la atmósfera, es su difusión en el medio de cultivo, el principal factor limitante de la síntesis de lignin peroxidasa (Rothschild *et al.*, 1995). *Phanerochaete chrysosporium* con alta concentración de nitrógeno, baja de carbono y expuesto al aire, sintetiza lignin peroxidasa (Rothschild *et al.*, 1995). Con baja concentración de nitrógeno se forma una vaina de polisacáridos que impiden la difusión del O₂ y nutrientes. En el primer caso faltaría carbono para la síntesis de la vaina. *Phanerochaete chrysosporium* y otros Basidiomycetes ligninolíticos secretan una vaina de glucano cuando crecen en condiciones de carencia de nutrientes, que se ha propuesto, afectaría la adhesión de la hifa a las paredes celulares de la madera. Se ha reportado la existencia de una correlación entre la presencia de vaina hifal y la actividad ligninolítica en *Phanerochaete chrysosporium* (Rothschild *et al.*, 1995) y en *Pleurotus eryngii* (Barrasa *et al.*, 1998). Tres tipos principales de enzimas degradadoras de pared celular fueron localizadas en la vaina extracelular de hongos causantes de degradación de madera: peroxidases, tales como la lignin y Mn-peroxidasa (Blanchette *et al.*, 1989; Daniel *et al.*, 1990; Ruel y Joseleau, 1991); lacasas (Nicole *et al.*, 1992); y glicohidrolasas, como la glucosidasa (Gallagher y Evans, 1990), endo y exoglucanasas (Ruel y Joseleau, 1991) y β -1,4-xilanasas (Green *et al.*, 1992). La presencia de β -1,3-glucanasa y oxidasas asociadas (Cor *et al.*, 1992; Daniel *et al.*, 1992; Nicole *et al.*, 1992), puede generar el H₂O₂ necesaria para el funcionamiento de lignin y Mn-peroxidases, e indica que la vaina extracelular puede ser considerada como parte del sistema de degradación de lignina del hongo. En hongos de pudrición de la madera, los polisacáridos y compuestos de naturaleza proteica de la vaina extracelular, pueden proveer los nutrientes para el crecimiento hifal. La vaina extracelular

también protege a las células fúngicas de condiciones desfavorables del ambiente. Por ejemplo, la lacasa fúngica encontrada dentro de la vaina extracelular de *Rigidoporus lignosus* polimeriza fenoles tóxicos para el hongo liberados en la degradación de lignina (Nicole *et al.*, 1992).

1.3.4. Consecuencias económicas del proceso de biodegradación de lignocelulosas (por hongos causantes de pudrición blanca).

1.3.4.1. Deterioro de la madera

Luego de la celulosa, la lignina es el polímero orgánico más abundante sobre la tierra, la lignocelulosa es el mayor depósito de carbono fijado por fotosíntesis. La biodegradación fúngica de la lignina es un proceso clave en el ciclo biogeoquímico del carbono, y esta actividad descomponedora resulta probablemente el más valioso servicio que brindan los hongos degradadores de lignina a la humanidad (Boddy, 1991). Sin embargo, el deterioro de la madera resulta a veces inconveniente, sobre todo cuando ocurre en recursos forestales que deseamos utilizar o en madera en uso. Se estima que el 10% de la madera que se corta en los E.U.A. cada año se destina a reemplazar madera en servicio que ha sido deteriorada (Zabel y Morrel, 1992).

1.3.4.2. Pulpado

El proceso para obtención de pulpa de papel a partir de madera, requiere que las fibras se separen unas de otras y se tornen flexibles, ya sea por disolución de la lignina durante el proceso de pulpado químico o por ruptura física de las fibras en el pulpado mecánico. El tratamiento de la madera con hongos que degradan selectivamente la lignina disminuye la energía necesaria para el pulpado mecánico (Akhtar *et al.*, 1993; Akhtar, 1994) y también aumenta la cohesión entre las fibras, con la consiguiente mejora en la resistencia del papel obtenido. Un tratamiento similar también puede usarse para la paja de arroz y el bagazo (Martinez *et al.*,

1994a; Sabharwal *et al.*, 1995). La delignificación biológica de la madera también favorece el proceso de pulpado químico (Messner y Srebotnik, 1994).

1.3.4.3. Blanqueado

La pulpa que se obtiene por el proceso de pulpado químico Kraft (disolución de la lignina por cocción en presencia de hidróxido de sodio y sulfato de sodio), contiene hasta un 5% de lignina residual modificada de color oscuro. Ciertos hongos causantes de pudrición blanca pueden solubilizar gran parte de esta lignina, disminuyendo la cantidad de químicos que se requieren para blanquear la pulpa (Reid y Paice, 1994). Entre los hongos efectivos en dicho proceso se incluyen: *Phanerochaete chrysosporium* (Kirk y Yang, 1979), *Phanerochaete sordida* (Kondo *et al.*, 1994) y *Trametes versicolor* (Addleman y Archibald, 1993). A pesar de que no se requiere un contacto físico directo entre el hongo y la pulpa para un proceso de delignificación limitado (Kondo *et al.*, 1994), ha sido difícil obtener un blanqueado extensivo por un sistema enzimático libre de células (Reid, 1995). El blanqueado de la pulpa se correlacionó con la actividad Mn-peroxidasa en un gran número de especies y de condiciones de cultivo (Addleman y Archibald, 1993; Paice *et al.*, 1993; Kondo *et al.*, 1994). La Mn-peroxidasa (Paice *et al.*, 1993), la lacasa adicionada con ABTS (Bourbounnais y Paice, 1992) y otros mediadores (Call y Mucke, 1994) pueden reproducir los efectos delignificadores de los hongos e incrementar notablemente el blanqueado de las pulpas Kraft.

1.3.4.4. Control de la polución

La baja especificidad y la fuerte capacidad oxidativa de los sistemas fúngicos de degradación de lignina, permite utilizarlos en la degradación de numerosos contaminantes orgánicos. Los efluentes de la industria papelera resultantes de las operaciones del pulpado químico y del blanqueado constituyen desechos industriales sumamente tóxicos, fuente peligrosa de contaminación ambiental. Los hongos de pudrición blanca y sus enzimas pueden dechlorinar y decolorar las

cloroligninas resultantes de dichos procesos (Lackner *et al.*, 1991; Roy-Arcand y Archibald, 1991; Chahal, 1994). Determinados hongos de pudrición blanca también pueden ser utilizados en procesos de biorremediación de suelos contaminados con una gran variedad de contaminantes aromáticos (Lamar *et al.*, 1992; Barr y Aust, 1994). Recientes investigaciones demostraron que hongos con gran actividad lignocelulolítica son capaces de degradar contaminantes ambientales como PCB, DDT, dioxina, tinturas industriales, nylon, etc. (Farrell, 1987; Hammel, 1989; Eriksson *et al.*, 1990; Fernando y Aust, 1994; Deguchi *et al.*, 1997).

1.3.4.5. Mejoramiento de la digestibilidad

La lignificación protege a los polisacáridos de las enzimas hidrolíticas y limita la digestibilidad de los materiales lignocelulósicos por los rumiantes o por celulasas aplicadas *in vitro*. Los procesos de delignificación pueden ser también utilizados para modificar la madera o subproductos agrícolas para aumentar su valor nutricional como alimento para el ganado. La digestibilidad de la madera, paja, bagazo, aumentó notablemente cuando fue tratada con diversos hongos de pudrición blanca y no demostró problemas de palatabilidad o toxicidad (Agosin *et al.*, 1986; Buswell y Odier, 1987; Jung *et al.*, 1992; Akin *et al.*, 1993). La delignificación por hongos de pudrición blanca de materiales crudos mediante el proceso de fermentación en estado sólido, incrementa su valor como forraje para rumiantes, pero también como sustrato para sacarificación enzimática y fermentación (Reid, 1989; Duff y Murray, 1996). Algunos hongos que degradan lignina como *Pleurotus ostreatus* y *Lentinus edodes*, convierten directamente a la lignocelulosa en alimento de consumo humano (Reid, 1995).

1.3.4.6. Bioconversión de la lignina

Grandes cantidades de lignina se hallan disponibles como subproductos del pulpado químico, y si las lignocelulosas fueran utilizadas como fuentes de azúcares para fermentación, se dispondría aún de mayores cantidades. Subproductos del pulpado

químico de la madera en forma de polímeros, son actualmente utilizados en una variedad de productos comerciales, incluyendo dispersantes, ligantes, etc.; y mediante degradación química para producir vainillina, dimetil sulfóxido y otros químicos (Kirk, 1983).

1.4. *TRAMETES TROGII* BERK. (POLYPORACEAE, APHYLLOPHORALES, BASIDIOMYCETES). DESCRIPCION.

El basidiocarpo es anual, sésil, semicircular, a veces semi-resupinado o resupinado, flexible cuando fresco, rígido y friable cuando seco. Puede medir hasta 10 cm de largo y 1-3 cm de espesor (foto I₂). La superficie superior está cubierta por una densa pilosidad castaño amarillenta, que ocasionalmente tiende al gris pero nunca se torna negra. La superficie poroide es blanca a amarillenta, o castaño amarillenta. El contexto es fibroso y más o menos rígido, color ocre pálido. El sistema hifal es trimitico. Los tubos, usualmente en una capa simple, tienen una longitud de 3-7 mm y están abiertos a la superficie inferior a través de poros angulares a semicirculares de 0.4-0.8 mm de diámetro. Las basidiosporas son cilíndricas, recurvadas, hialinas, de pared lisa y delgada, y miden 9.5-11-13.3 x 2.5-3-4 μm . *T. trogii* es extremadamente común en álamo, pero también se lo encuentra en sauce, aliso, arce, roble, olmo, haya, nogal, morera, laurel, mimbre, palmera y ocasionalmente sobre pino y abeto (Wright *et al.*, 1973; Anselmi y Nicolotti, 1988; Bernicchia, 1990). Aparece tanto en América del Norte como del Sur y en Europa. En Argentina y Uruguay se lo encuentra casi exclusivamente sobre álamo y sauce (Wright *et al.*, 1973).

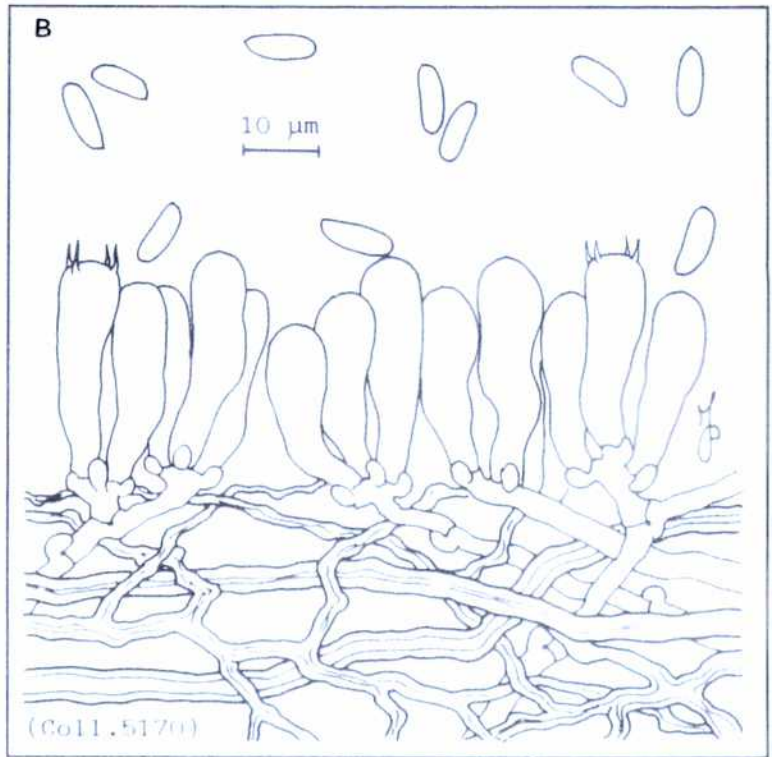
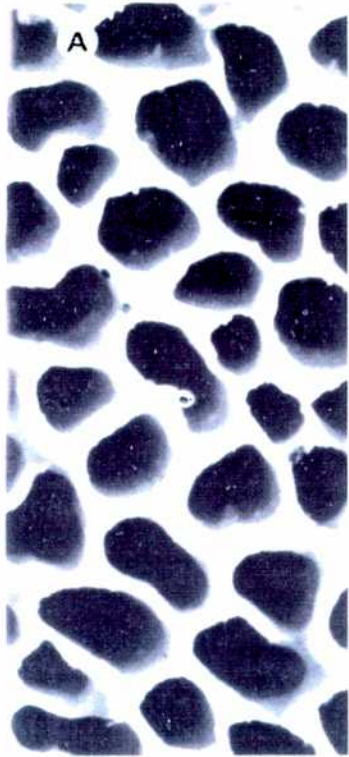


Foto I₂. A, superficie poroide de *Trametes trogii* (x20); B, elementos himeniales; C, cuerpo fructífero (Bernicchia, 1990).

OBJETIVOS

OBJETIVOS:

1- Comprobar la capacidad de *Trametes trogii* (BAFC 463) para producir los sistemas enzimáticos responsables de la biodegradación de materiales lignocelulósicos (en particular celulasas, xilanasas, pectinasas y enzimas involucradas en la degradación de lignina).

2- Estudiar los parámetros nutricionales y condiciones de cultivo que afectan la producción de dichas enzimas y caracterizar parcialmente las distintas actividades enzimáticas.

3- Comparar los resultados obtenidos *in vitro* con ensayos de degradación de sustratos naturales empleando cultivos del hongo.

MATERIALES Y METODOS

3.1. ORGANISMO.

En todos los experimentos de este trabajo se utilizó la cepa 463 (BAFC) de *Trametes trogii* Berk. (Aphyllophorales, Basidiomycetes), la cuál se encuentra depositada en el Cepario de Micología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

3.2. MANTENIMIENTO DE LA CEPA Y OBTENCION DEL INOCULO.

La cepa de *Trametes trogii* fue mantenida a 4 °C, mediante resiembras periódicas, en tubos de ensayo en pico de flauta con medio de cultivo Malta.

Para la obtención del inóculo se sembró a *T. trogii* en medio de cultivo Agar-Agua y se incubó a 23 °C durante 5 días.

3.3. MEDIOS DE CULTIVO.

3.3.1. Medios sólidos.

3.3.1.1. Medio Agar-Agua:

Bacto Agar (Difco): 20 g

Agua bidestilada: hasta 1000 ml

3.3.1.2. Medio Malta:

Extracto de Malta: 20 g

D(+)-glucosa: 20 g

Bacto Agar (Difco): 20 g

Agua bidestilada: hasta 1000 ml

3.3.1.3. Medio Malta (Nobles) (Nobles, 1965):

Extracto de Malta (Difco): 12.7 g

Bacto Agar (Difco): 20 g

Agua bidestilada: hasta 1000 ml

3.3.2. Medios líquidos.

3.3.2.1. Medio sintético basal:

$\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.5 g

$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$: 0.5 g

PO_4HK_2 : 0.6 g

$\text{SO}_4\text{Cu}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0.4 mg

$\text{Cl}_2\text{Mn}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 0.09 mg

BO_3H_3 : 0.07 mg

$\text{MoO}_4\text{Na}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.02 mg

Cl_3Fe : 1 mg

$\text{Cl}_2\text{Zn}\cdot \text{H}_2\text{O}$: 3.5 mg

HCl-tiamina: 0.1 mg

Agua bidestilada: hasta 1000 ml

A dicho medio se le adicionaron alternativamente diferentes fuentes de carbono y nitrógeno.

a- Fuentes de carbono: las fuentes utilizadas fueron:

D(+)-glucosa (G)

D(+)-xilosa (Xs)

Maltosa (M)

Celobiosa (Ce)

Xilano de avena (Sigma) (Xn)

Almidón soluble (BDH) (Al)

Pectina de manzana (Sigma) (P)

Celulosa cristalina, Sigmacell Type 20 (Sigma) (CC)

Carboximetilcelulosa, sal sódica de alta viscosidad (Sigma) (CM)

Todas en una concentración de 10 g/l.

Combinaciones de:

Pectina 5 g/l + xilano 5 g/l

Pectina 5 g/l + carboximetilcelulosa 5 g/l

Celulosa cristalina 5 g/l + xilano 5 g/l

Carboximetilcelulosa 5 g/l + celobiosa 5 g/l

Pectina 5 g/l + carboximetilcelulosa 2.5 g/l + xilano 2.5 g/l

Celulosa cristalina 10 g/l + glucosa 5 g/l

Diferentes concentraciones de la mezcla carboximetilcelulosa/celobiosa (igual cantidad de cada fuente) desde 2.5 hasta 20 g/l.

Diferentes concentraciones de xilano entre 0.25 y 20 g/l.

Diferentes concentraciones de pectina entre 2.5 y 15 g/l.

En los casos en que se utilizaron polisacáridos insolubles éstos fueron pesados para cada cultivo por separado.

b- Fuentes de nitrógeno: se ensayaron:

L-Asparagina (A)

Acido L-aspártico (AA)

L-Glicina (Gl)

Casaminoácidos (C)

$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ (SN)

CINH_4 (CN)

$\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$ (PN)

$\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$ (CaN)

Todas en una concentración equivalente a 0.75 g de nitrógeno por litro de medio (lo que corresponde a 4 g/l de asparagina).

Asparagina 0.5 g/l

Diferentes concentraciones de casaminoácidos de 0.187 a 1.5 g de N/l.

c- Surfactantes: se probaron (en una concentración 1.7 mM):

Tween 20 (mono-laurato de polioxietilensorbitan) (T20)

Tween 80 (mono-oleato de polioxietilensorbitan) (T80)

Triton X-100 (polietilenglicol *p*-isooctil-fenil éter) (TX-100)

PEG 6000 (polietilenglicol peso molecular= 7000-9000) (PEG).

d- pH: Se varió el pH del medio entre 3.6-7.9 (para celulasas) y 2.7-7.4 (para xilanasas) con soluciones de buffer citrato-fosfato (Gomori, 1955) preparadas con ácido cítrico 0.5 M y fosfato dibásico de sodio 0.5 M, diluidas en el medio de cultivo a una concentración final 0.25 M. Para pectinasas se varió el pH del medio entre 3.1 y 6.2 utilizando buffer citrato-fosfato (concentración final 25 mM), buffer Tris-HCl para valores de pH entre 6.6 y 7.4 y buffer carbonato-bicarbonato para valores más básicos (concentración final de ambos buffers 50 mM).

3.3.2.2. Medio de cultivo seminatural:

Al medio de cultivo sintético con glucosa 10 g/l y asparagina 0.5 g/l (GA (10/0.5)) se le agregó 1g de aserrín de *Populus* sp. (álamo) por Erlenmeyer de 250 ml con 25 ml de medio.

3.4. PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.

Todas las drogas utilizadas en este trabajo fueron de grado analítico.

El material de vidrio fue lavado, tratado con mezcla sulfocrómica por 24 hs y posteriormente enjuagado con agua bidestilada.

Los medios fueron esterilizados en autoclave a 121 °C, 1.2 atm por 20 min.

3.5. CONDICIONES DE CULTIVO.

Los cultivos en medio sólido se realizaron en cajas de Petri de 10 cm de diámetro, con 25 ml de medio; o en tubos de ensayo de 20 cm de largo por 2 cm de diámetro con 25 ml de medio inclinado en “pico de flauta”.

Los cultivos en medio líquido se realizaron en Erlenmeyers de 125 ml con 50 ml de medio en el caso de cultivos en agitación y con 25 ml de medio en el caso de cultivos estáticos. Erlenmeyers de 250 ml con 25 ml de medio se utilizaron en las experiencias relacionadas con la producción de enzimas involucradas en la degradación de lignina. Los Erlenmeyers y tubos de ensayo fueron tapados con algodón, forrados con gasa quirúrgica y cubiertos con papel aluminio. Los tubos utilizados en los ensayos de degradación de madera fueron cubiertos además con Parafilm para evitar la deshidratación del medio.

Como inóculos se utilizaron cubos de 25 mm² de superficie de una colonia, crecida en Agar-Agua durante 5 días (2 cubos en los Erlenmeyers de 250 ml). La masa inicial de micelio incorporada a los cultivos se consideró despreciable en los estudios de cinética de crecimiento.

Las incubaciones se realizaron en cámara de cultivo New Brunswick Psicrotherm G-27, termostalizada a 23 °C ± 1 (en las ensayos relacionados con la producción de celulasas, xilanasas y pectinasas), excepto cuando se indique otra cosa. En las experiencias relacionadas con la producción de enzimas involucradas en degradación de lignina y los ensayos de degradación de madera, la temperatura de incubación fue 28 °C ± 1. Los Erlenmeyers fueron incubados en condiciones estáticas y bajo iluminación constante. En los ensayos en agitación los Erlenmeyers fueron agitados constantemente por el agitador rotativo de la cámara a 125 r.p.m.

3.6. METODOS ANALITICOS.

3.6.1. Cosecha del micelio.

El micelio o los sólidos de cultivo (micelio más celulosa cristalina, xilano o almidón no consumidos al día de cosecha, según el caso) fueron cosechados por filtración en embudo Büchner, a presión reducida, sobre discos de papel de filtro Whatman GP. El micelio o los sólidos de cultivo retenidos en el filtro fueron lavados con agua bidestilada, secados en estufa a 70 °C durante 24 horas, pesados, molidos en mortero de porcelana y guardados a -20 °C. Los sobrenadantes de cultivo fueron guardados también a -20 °C.

3.6.2. Estimación del crecimiento vegetativo.

a. Peso seco del micelio.

Se pesó el micelio retenido en el filtro, previamente lavado y secado. Los resultados se expresan en general como mg de micelio/25 ml de medio de cultivo.

b. Proteínas totales de micelio.

Se tomaron 50 mg de micelio o sólidos de cultivo secos, según el caso, los que fueron hidrolizados por 30 minutos a 100 °C en 1ml de NaOH 1N. Las muestras se centrifugaron 20 minutos a 1000 x g y las proteínas extraídas fueron valoradas, en el sobrenadante, por el método de Bradford (1976), utilizando seroalbúmina bovina (BSA) 1mg/ml en NaOH 1N como estándar.

3.6.3. Dosaje de proteínas en el sobrenadante.

El dosaje de proteínas en el sobrenadante (proteínas extracelulares), fue realizado por el método de Bradford, utilizando BSA 1mg/ml como estándar.

3.6.4. Determinación de azúcares reductores.

La cantidad de azúcares reductores presentes en el sobrenadante de cultivo, se determinó por el método de Somogyi-Nelson (Nelson, 1944; Somogyi, 1952) utilizando glucosa 1 mg/ml como estándar.

3.6.5. Determinación del pH.

Se midió el pH de medios de cultivo y soluciones buffers utilizando un pHmetro Photovolt Modelo 110.

3.6.6. Medición de las actividades enzimáticas.

La fuente de enzima fue el sobrenadante de cultivo (SN). Este se obtuvo directamente de la filtración de los mismos.

3.6.6.1. Actividades enzimáticas celulolíticas.

a. Actividad endo- β -D-1,4-gluconasa (EC 3.2.1.4).

A 0.4 ml de carboximetilcelulosa (0.5% en buffer acetato de sodio 0.1 M pH 4.8) se le adicionaron 0.1 ml de sobrenadante incubándose por 30 min a 37 °C. Se valoraron los azúcares reductores liberados por el método de Somogyi-Nelson, utilizando glucosa 1 mg/ml como estándar.

Unidad de actividad: Una unidad enzimática (U.E.) se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar azúcares reductores en cantidad equivalente a 1 nmol de glucosa por minuto, en las condiciones del ensayo. La actividad enzimática se expresa como U.E./ml de sobrenadante de cultivo.

b. Actividad exo- β -D-1,4-gluconasa (EC 3.2.1.91).

Se utilizaron 0.4 ml de celulosa cristalina (1% en buffer acetato de sodio 0.1 M pH 4.8) como sustrato y 0.1 ml de sobrenadante; luego de 1 hora de incubación a 37 °C con agitación se paró la reacción con reactivo de Somogyi, se centrifugaron los tubos 20 minutos a 1000 x g, se descartó el pellet de celulosa cristalina y en el sobrenadante se midieron azúcares liberados por el método de Somogyi-Nelson, utilizando glucosa 1 mg/ml como estándar.

Unidad de actividad: Una unidad enzimática (U.E.) se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar azúcares reductores en cantidad equivalente a 1 nmol de glucosa por minuto, en las condiciones del ensayo. La actividad enzimática se expresa como U.E./ml de sobrenadante de cultivo.

c. Actividad β -glucosidasa (EC 3.2.1.21).

Se utilizaron 0.9 ml de *p*-nitrofenol β -D-glucopiranosido (0.02% en buffer acetato de sodio 0.1 M pH 4.8) como sustrato y 0.1 ml de sobrenadante. Luego de una incubación de 30 minutos a 50 °C, la reacción se detuvo por el agregado de 2 ml de Buffer Clark y Lubs 0.1 M pH 9.8 (50 ml de BO_3H_3 0.1 M en ClK 0.1 M más 40.8 ml de NaOH 0.1 M y agua bidestilada hasta 100 ml) (Diem, 1973) valorándose el *p*-nitrofenol liberado, midiendo su absorbancia a 420 nm. Se utilizó como estándar *p*-nitrofenol (1mM en buffer acetato de sodio 0.1 M pH 4.8).

Unidad de actividad: Una unidad enzimática (U.E.) se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 nmol de *p*-nitrofenol por minuto, en las condiciones del ensayo. La actividad enzimática se expresa como U.E./ml de sobrenadante de cultivo.

3.6.6.2. Actividades enzimáticas xilanolíticas.

a. Actividad endoxilanasas (EC 3.2.1.8).

La mezcla de reacción consistió en 0.4 ml de xilano (0.2 % en buffer acetato de sodio 50 mM pH 5.5) más 0.1 ml del sobrenadante de cultivo. Se incubó por 30 minutos a 37 °C. La actividad endoxilanasas se ensayó valorando los azúcares reductores liberados por degradación del xilano mediante el método de Somogyi-Nelson.

Unidad de actividad: una unidad enzimática (U.E.) se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar azúcares reductores en cantidad equivalente a 1 μmol de xilosa por minuto bajo las condiciones del ensayo. Para cuantificar dicha actividad se confeccionó una curva patrón con distintas cantidades de xilosa. La actividad enzimática se expresa como U.E./ml de sobrenadante de cultivo.

b. Actividad β -xilosidasa (EC 3.2.1.37).

La actividad β -xilosidasa se determinó en una mezcla de reacción conteniendo 0.95 ml de *p*-nitrofenil β -D-xilopiranosido (0.1 % en buffer acetato de sodio 50 mM pH 5) y 0.05 ml de sobrenadante. Luego de incubar 60 minutos a 50 °C, la reacción se paró mediante el agregado de 2 ml de buffer Clark y Lubs 0.1 M pH 9.8 (Diem, 1973) y se leyó la absorbancia a 420 nm. La actividad de esta enzima está dada por la cantidad de *p*-nitrofenol liberado.

Unidad de actividad: una unidad enzimática (U.E.) se definió como la cantidad de enzima que produce un μmol de *p*-nitrofenol por minuto bajo las condiciones del ensayo. Para cuantificar dicha actividad se confeccionó una curva patrón con distintas cantidades de *p*-nitrofenol. La actividad enzimática se expresa como U.E./ml de sobrenadante de cultivo.

3.6.6.3. Actividades enzimáticas pectinolíticas.

a, b. Actividades poligalacturonásicas (EC 3.2.1.82).

Las actividades poligalacturonásicas fueron designadas como **poligalacturonasa** y **polimetilgalacturonasa** y analizadas por hidrólisis del sustrato adecuado liberando sustancias reductoras. Los sustratos utilizados fueron respectivamente, ácido poligalacturónico de naranja (Sigma) y pectina de manzana (Sigma) (1mg/ml en buffer acetato 50 mM, pH 5.5). La mezcla de reacción contenía 0.48 ml de sustrato y 20 µl de sobrenadante de cultivo. Se incubó a 37 °C durante 30 minutos. El incremento en los azúcares reductores fue determinado por el método de Somogyi-Nelson (utilizando ácido galacturónico (Sigma) como patrón).

Unidad de actividad: una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad necesaria para liberar 1 µmol de ácido galacturónico por minuto a 37 °C bajo las condiciones del ensayo. La actividad enzimática se expresa como U.E./ml de sobrenadante de cultivo.

c. Actividad pectin liasa (EC 4.2.2.10) (liasa frente a pectina)

d. Actividad pectato liasa (EC 4.2.2.9) (liasa frente a ácido poligalacturónico)

Las actividades **pectin liasa** y **pectato liasa** se determinaron colorimétricamente a través de la reacción entre los di y oligourónidos insaturados (productos de la degradación de los sustratos pécticos) y el ácido tiobarbitúrico (TBA) (Ayers *et al.*, 1966). La mezcla de reacción contenía 3 ml de pectina de manzana (1.2 % en buffer Tris-HCl, 50 mM pH 8) o ácido poligalacturónico (0.24 % en el mismo buffer, más Cl₂Ca concentración final 2 mM) respectivamente, y 2 ml del sobrenadante de cultivo. Se incubó a 30 °C durante 60 minutos, luego se agregaron 1.5 ml de HCl 1N y 3 ml de TBA 0.04 M y se hirvió durante 20 minutos, leyéndose posteriormente la absorbancia a 550 nm. Los blancos se realizaron con la enzima hervida.

Unidad de actividad: Una unidad de pectin o pectato liasa se definió como la cantidad de enzima que causa un cambio de absorbancia de 0.01 bajo las condiciones del ensayo. La actividad enzimática se expresa como U.E./ml de sobrenadante de cultivo.

3.6.6.4. Actividades enzimáticas ligninolíticas.

a. Actividad lignin peroxidasa (LiP) (EC 1.11.1.14).

La actividad lignin peroxidasa se midió siguiendo el método descrito por Archibald (1992), basado en la oxidación del tinte Azure B*. La mezcla de reacción contenía: 20 µl de una solución de Azure B (12.2 mg/10 ml agua bidestilada) en 2.5 ml de buffer tartrato de sodio (50 mM, pH 4.5 a 25 °C) y 250 µl del sobrenadante de cultivo, la reacción se inició por el agregado de 20 µl H₂O₂ (concentración final 100 µM) y se leyó la disminución en la absorbancia a 650 nm transcurridos 10 minutos.

Unidad de actividad: Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que causa un cambio de absorbancia de 0.1 bajo las condiciones del ensayo. La actividad enzimática se expresa como U.E./ml de sobrenadante de cultivo.

* Este método se seleccionó debido a que en muestras que contienen lignina, el color amarronado interfiere con el método usado habitualmente, que mide el aumento en la absorbancia a 310 nm por oxidación del veratril alcohol a veratraldehído (Tien y Kirk, 1984).

b. Actividad lacasa (EC 1.10.3.2).

La actividad lacasa se valoró de acuerdo al método de Bourbonais *et al.* (1995), por oxidación del sustrato ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) 5mM. La reacción se realizó en buffer acetato de sodio 0.1 M pH 5.0, y se midió un incremento en la absorbancia a 420 nm ($\epsilon_{420} = 36/\text{mM cm}$). La mezcla de

reacción que se incubó a 30 °C contenía 2.5 ml de sustrato y 20 a 100 µl del sobrenadante de cultivo.

Unidad de actividad: una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que libera 1 mmol del producto oxidado por minuto bajo las condiciones del ensayo. La actividad enzimática se expresa como U.E./ml de sobrenadante de cultivo.

c. Actividad Mn-peroxidasa (MnP) (EC 1.11.1.13).

d. Actividad peroxidasa Mn-independiente (MIP).

La actividad Mn-peroxidasa se midió siguiendo el método descrito por Glenn y Gold (1985), usando como sustrato 2.5 ml de rojo fenol 0.01% y MnSO₄ 0.1mM en buffer succinato de sodio 0.1 M. La mezcla de reacción contenía 2.5 ml de sustrato y 20 a 250 µl del sobrenadante de cultivo. La reacción que se inició por el agregado de H₂O₂ 0.1mM, se incubó a 30 °C y paró mediante el agregado de 40 µl de NaOH 5N. La actividad peroxidasa Mn-independiente (MIP) se midió omitiendo el MnSO₄ de la mezcla de reacción. El aumento en la absorbancia se leyó a 610 nm ($\epsilon_{610} = 22/\text{mM cm}$).

Los valores de MnP graficados corresponden a los obtenidos luego de restar la MIP.

Unidad de actividad: una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que libera 1 mmol del producto oxidado por minuto bajo las condiciones del ensayo. La actividad enzimática se expresa como U.E./ml de sobrenadante de cultivo.

3.6.6.5. Actividades enzimáticas productoras de H₂O₂.

a. Extracelulares: Actividad glioxal oxidasa (GLOX) (EC 1.2.3.5).

La actividad glioxal oxidasa (GLOX) se midió siguiendo el método descrito por Vares *et al.* (1995) mediante un ensayo acoplado a peroxidasa. La mezcla de reacción contenía 2,2-dimetilsuccinato de sodio 50 mM (pH 6), 10 mM metilglioxal, rojo fenol 0.01 % (peso/volumen), 10 µg de peroxidasa (peroxidasa de rábano tipo II, Sigma) y 50 a 100 µl de sobrenadante en un volumen total de 2.5 ml. La reacción se paró mediante el agregado de 125 µl de NaOH 2 N, luego de incubar 5 a 30 minutos a 30 °C. Se leyó el cambio de absorbancia a 610 nm debido a la oxidación del rojo fenol por la peroxidasa presente en el medio de reacción.



La cantidad de H₂O₂ producida por la glioxal oxidasa al oxidar al metilglioxal a metilglioxalato se determinó de una curva de calibración con concentraciones de H₂O₂ de entre 0 y 60 µM.

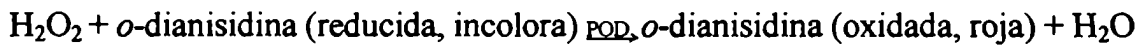
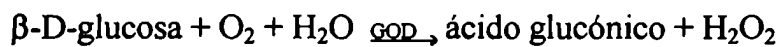
Unidad de actividad: una unidad enzimática (U.E.) se definió como la cantidad de enzima que produce un nmol de H₂O₂ por min. por ml.

b. Intracelulares: Actividad glucosa oxidasa (GOD)

Para la determinación de la actividad glucosa oxidasa el micelio fue filtrado, siendo luego procesado para obtener un extracto libre de células combinando la homogeneización del micelio con nitrógeno líquido, con una ruptura posterior utilizando un homogeneizador vidrio-vidrio; al micelio así molido se le agregó buffer fosfato de sodio 0.1M pH 6.8. Se realizaron observaciones microscópicas del extracto para confirmar que el micelio estuviera completamente roto. Alícuotas del sobrenadante se utilizaron como fuente de GOD.

Para la determinación de las proteínas totales en el extracto crudo, éste se hidrolizó agregándole un volumen igual de NaOH 2 N y calentándolo 30 minutos a 100 °C. Se centrifugó a 1000 x g 20 minutos, y el sobrenadante se utilizó para valorar proteínas por el método de Bradford.

Para la valoración de la actividad glucosa oxidasa (no se distinguió entre glucosa 1-oxidasa y glucosa 2-oxidasa) se empleó el método de Kelley y Reddy (1986) ligeramente modificado. El método en cuestión se basa en las siguientes reacciones:



GOD: glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4)

POD: peroxidasa (EC 1.11.1.7)

El medio de reacción consistió en 1.5 ml de *o*-dianisidina (0.21 mM en acetato de sodio 0.05 M pH 5); 0.3 ml de D-Glucosa 1 M; 0.03 ml de peroxidasa 60 U/ml (en buffer fosfato de potasio 0.1 M pH 6); alícuotas de 20 a 80 μl del extracto crudo como fuente de GOD y buffer fosfato de sodio 0.1M pH 6.8 hasta completar un volumen final de reacción de 3 ml. Se incubó durante 10 minutos a 37 °C y luego se determinó la actividad de GOD midiendo el cambio de absorbancia a 460 nm debido a la oxidación de la *o*-dianisidina por la peroxidasa presente en el medio de reacción. Blancos sin *o*-dianisidina permitieron restar la absorbancia debida a la turbidez del extracto.

Se confeccionaron curvas de calibración con glucosa oxidasa comercial (Sigma).

Unidad de actividad: una unidad enzimática (U.E.) se definió como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μmol de glucosa a ácido glucónico y agua oxigenada por minuto bajo las condiciones del ensayo.

3.7. CARACTERIZACIONES BIOQUIMICAS.

3.7.1. pH óptimo.

Para la determinación del pH óptimo para las actividades celulolíticas y xilanolíticas se disolvieron los sustratos correspondientes en buffer citrato-fosfato 50 mM en un rango de 2.5 a 7.4 unidades.

3.7.2. Temperatura óptima.

Para determinar el efecto de la temperatura sobre las actividades enzimáticas, las celulasas fueron ensayadas en buffer acetato de sodio (100 mM pH 4.8) a temperaturas de entre 30 y 70 °C, y las xilanasas fueron ensayadas en buffer acetato de sodio (50 mM pH 5.5) a temperaturas de entre 30 y 80 °C.

3.8. ENSAYOS DE PUDRICION *IN VITRO* EN MADERA DE SALICACEAS.

3.8.1. Pérdida de peso seco.

Las pérdidas de peso seco debidas a la acción del hongo se determinaron de acuerdo a la metodología descrita por Job y Wright (1986). La cepa de *T. trogii* se cultivó en tubos de 20 cm. de largo por 2 cm. de diámetro, en picos de flauta, conteniendo 25 ml de medio Malta (Nobles, 1965). Luego de 2 semanas de incubación a 28 °C, y cuando el crecimiento del micelio alcanzó a cubrir totalmente el pico de flauta en forma vigorosa, se introdujeron asépticamente las probetas. Se utilizaron probetas de *Populus* sp. (álamo) y *Salix* sp. (sauce) de 3 x 1 x 0.5 cm. Las probetas fueron previamente colocadas en un soporte en un desecador con agua destilada, de modo de convertirlo en cámara húmeda y llevadas a estufa hasta la temperatura de 110 °C, mantenida durante 30 min., para esterilizarlas. Posteriormente se bajó la temperatura a 30 °C y se mantuvo durante 12 horas, de modo que las probetas alcanzaran una humedad suficiente, que se puede estimar en 30% (García Sola, 1974). Se incubaron los tubos con las probetas durante 6 meses a 28 °C. Cada 2 meses, se sacaron 10 probetas, se les eliminó el micelio superficial y 8 de ellas fueron secadas en estufa a 70 °C hasta peso seco constante para verificar la pérdida de peso, mientras que las 2 restantes se reservaron para los cortes anatómicos. Probetas no inoculadas sirvieron como testigos.

3.8.2. Análisis microscópico de las maderas.

Para los estudios con microscopía óptica (MO), las muestras de madera se fijaron en FAA (formaldehído 10% -ácido acético 5% -alcohol 96° 50%) y se embebieron en parafina (Johansen, 1940; Sass, 1966). Se cortaron con micrótomos secciones transversales y longitudinales (radiales y tangenciales) de 15-18 μm de grosor, las cuales se tiñeron con coloración doble safranina-fast green (Gram y Jorgensen, 1953). Esta coloración permite distinguir las paredes lignificadas (las cuales se tiñen de rojo) de aquellas que no lo están (paredes primarias o secundarias no lignificadas se colorean de celeste verdoso). Los cortes así obtenidos se examinaron en un microscopio Zeiss, con y sin luz polarizada. Para las observaciones con microscopía electrónica de barrido (MEB), los cortes fueron deshidratados en una serie de acetona y secados a punto crítico (para evitar que se provoquen alteraciones en el micelio que coloniza la madera por las fuerzas desarrolladas por la tensión superficial del líquido que se evapora), cubiertos con oro-paladio y observados en un microscopio Philips de barrido electrónico en el Instituto de Investigaciones Científicas y Técnicas de las Fuerzas Armadas (CITEFA).

3.9. RESULTADOS.

Todos los resultados presentados en este trabajo constituyen el promedio de al menos tres experiencias realizadas por triplicado con un error estándar, en todos los casos, inferior al 5%.

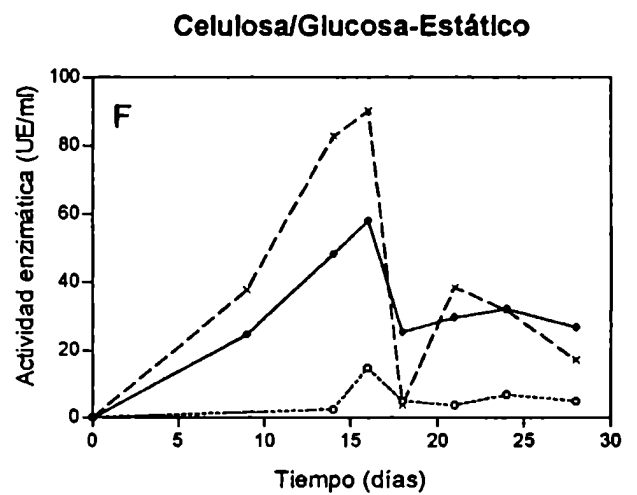
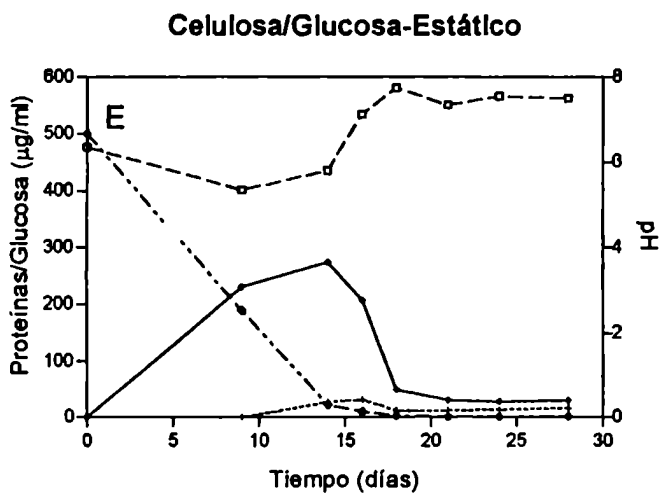
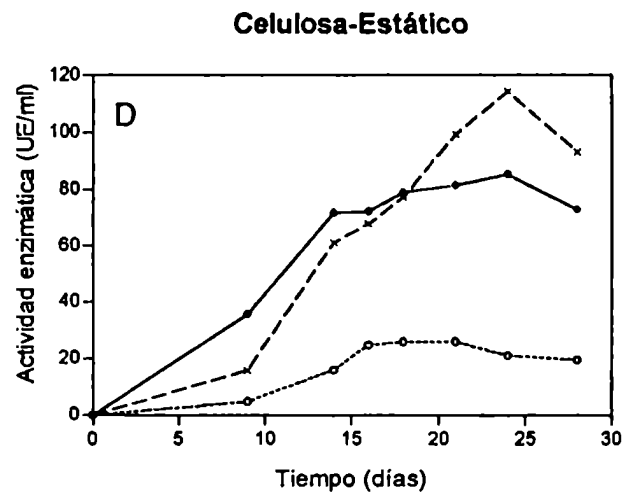
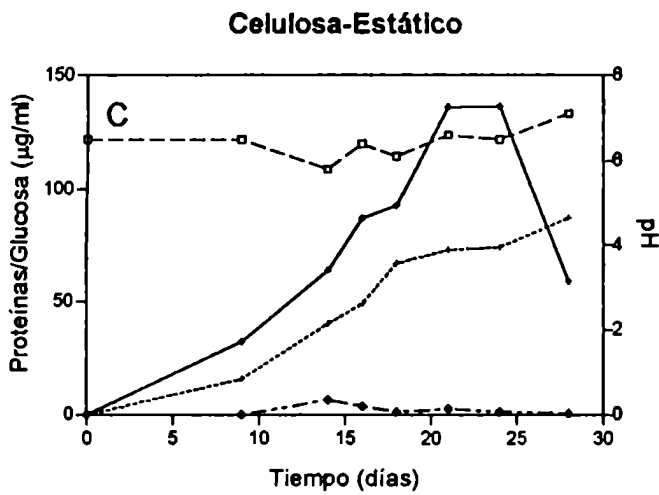
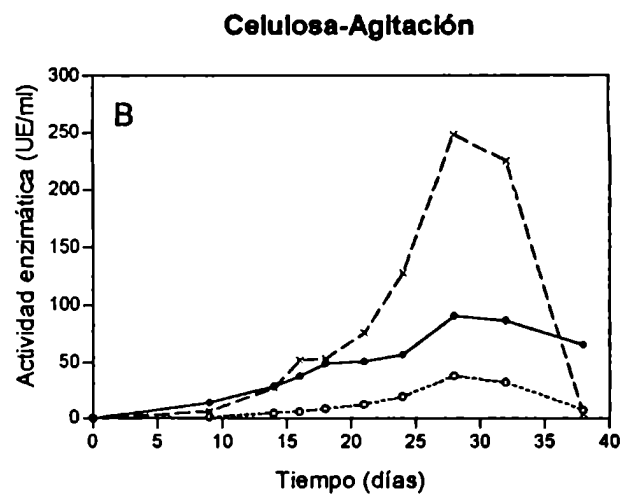
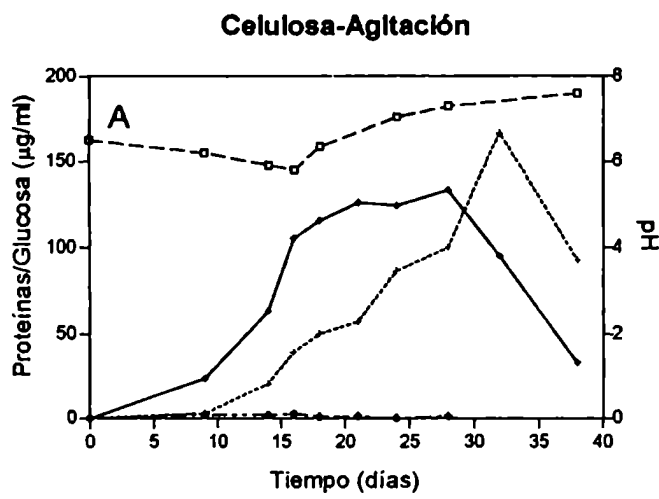
RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. CELULASAS.

4.1.1. Cinética de crecimiento y producción enzimática en condiciones estáticas y de agitación.

Para estudiar la cinética de crecimiento y producción de enzimas celulolíticas se utilizó el medio sintético líquido con celulosa cristalina (10 g/l) como fuente de carbono y asparagina (4 g/l) como fuente de nitrógeno (pH inicial del medio: 6.5 ± 0.1) (véase sección 3.3.2.1. de materiales y métodos). Como puede observarse en la figura R₁, mientras que otras especies como *Poria placenta* requieren el agregado de glucosa, almidón o maltosa para una eficiente degradación de celulosa (Highley, 1978), la celulosa cristalina sirve como única fuente de carbono para *T. trogii* e induce la síntesis de las tres enzimas del complejo celulasa. Un gran número de hongos producen celulasas extracelulares (Eriksson *et al.*, 1990), pero la habilidad de solubilizar completamente a la celulosa cristalina está restringida a relativamente pocos de ellos (Wood y García Campayo, 1990), la característica que distingue a este grupo es la producción de actividad celobiohidrolasa (Archer y Wood, 1995). Al evaluarse la cinética de crecimiento y producción enzimática en condiciones estáticas y de agitación, se comprobó que la máxima producción de endo- y exoglucanasa era semejante mientras que la actividad β -glucosidasa se duplicó en cultivos con agitación (Fig. R_{1B,D}).

Los máximos de producción de endo- y exoglucanasa se alcanzaron aproximadamente 10 días antes en los cultivos estáticos (Fig. R_{1D}). En dichos cultivos el pico de crecimiento se registró al día 20 de incubación, en coincidencia con el máximo de actividad enzimática, mientras que las proteínas extracelulares aumentaron de modo continuo, revelando la liberación de otras enzimas durante la fase autolítica de crecimiento (Fig. R_{1C}). En los cultivos con agitación los máximos de crecimiento (Fig. R_{1A}) precedieron a los máximos de actividad enzimática, éstos coincidieron con los mayores niveles de proteínas extracelulares valorados. El pH del medio de cultivo en todos los casos, luego de una disminución inicial aumentó progresivamente. Este aumento podría deberse a una liberación de



—●— Proteína de micelio
 - - - ● - - - Proteína extracelular
 - - - □ - - - pH
 - - - ◆ - - - Glucosa residual

—●— Endoglucanasa
 - - - ● - - - Exoglucanasa
 - - - × - - - β-glucosidasa

Figura R₁: Cinéticas de crecimiento (A,C,E) y producción enzimática (B,D,F) por *Trametes troglil* en medio con asparagina (4 g/l) como fuente de nitrógeno y celulosa cristalina (10 g/l) como fuente de carbono, en condiciones de agitación (A,B) y en condiciones estáticas (C,D); en medio con celulosa cristalina (10 g/l) y glucosa (5 g/l), condiciones estáticas (E,F).

metabolitos secundarios, o a un aprovechamiento diferencial de los componentes del medio de cultivo. Incrementos similares en el pH del medio de cultivo, transcurrido cierto tiempo de incubación en medios con diferentes fuentes de carbono han sido reportados también en otros Basidiomycetes: *Heterobasidion annosum* (Johansson, 1988; Maijala *et al.*, 1995), *Schizophyllum commune* (Haltrich *et al.*, 1993) y *Phanerochaete chrysosporium* (Bonnarme *et al.*, 1993; Lestan *et al.*, 1994).

Las condiciones de cultivo afectaron por lo tanto marcadamente la cinética de crecimiento y de producción enzimática, pero no los máximos valores registrados de endo y exoglucanasa. Las celulasas de *T. trogii* no fueron inactivadas por agitación, como se comprobó que ocurre en otras especies (Reese, 1980), incluso la actividad β -glucosidasa se duplicó en el caso de cultivos sometidos a agitación continua, con respecto a la obtenida en cultivos estáticos. Se encontró una fase latente más prolongada en la producción enzimática en los cultivos en agitación, asimismo en los cultivos en condiciones estáticas se observó una relación más estrecha entre el crecimiento miceliano y la producción enzimática. Se detectó también correlación entre la producción de celulasas y el crecimiento miceliano en *Saccobolus saccoboloides* (Magnelli *et al.*, 1996), *Rhizopus oryzae* (Amadioha, 1993) y *Trichoderma viride* (Sternberg, 1976); mientras que estudiando esta última especie pero bajo diferentes condiciones de cultivo, Berg y Petterson (1977) hallaron que todas las celulasas eran sintetizadas cuando cesaba el crecimiento del micelio, y que en gran parte estaban ligadas a la pared y eran liberadas durante la autólisis.

Las condiciones estáticas de cultivo favorecen la producción enzimática en varias especies, entre ellas: *Agaricus bisporus* (Manning y Wood, 1983) y *Trichoderma longibrachiatum* (Sandhu y Kalra, 1985); por el contrario en *Trichoderma koningii* una aireación moderada favorece la síntesis de endoglucanasa (Halliwell y Lovelady, 1981) y en varios miembros de la familia Ascobolaceae se obtuvieron mejores resultados en cultivos con agitación (Mercuri, 1987a; Magnelli *et al.*, 1996).

En *T. trogii* en condiciones de agitación la mayor actividad de celulasas medidas en el sobrenadante, se observó cuando los valores de la biomasa ya habían decrecido. Resultados similares se reportaron en *Fusarium oxysporum* (Soni y Bathia, 1979; Alconada y Martinez, 1996), *Alternaria alternata* (Guillen *et al.*, 1987), *Neurospora sitophila* (Oguntimein y Moo-Young, 1991), *Aspergillus terreus* (Hrmova *et al.*, 1991), *Sclerotinia sclerotiorum* (Riou *et al.*, 1992) y también en *T. trogii* creciendo en el mismo medio pero con celulosa cristalina y glucosa como fuentes de carbono (Sivori, 1991). El aumento de la producción de enzimas extracelulares en la fase de autólisis podría deberse a su localización intracelular o a su asociación a las paredes celulares, por lo tanto el aumento en la producción de actividades enzimáticas en esta fase se debería a la lisis que sufre el micelio, con la consiguiente liberación de proteínas; igualmente en esta etapa se considera que existe no sólo secreción de enzimas preexistentes al medio, sino de enzimas de nueva síntesis, que tiene lugar durante este proceso degradativo, debido a una inducción resultante de los oligómeros o monómeros producidos durante la lisis de los polisacáridos de las paredes celulares, los cuales pueden permanecer en el líquido de cultivo a los niveles requeridos para la inducción. La correlación entre autólisis y elevada producción enzimática ha sido observada para diversos microorganismos (Reese, 1977; Reyes *et al.*, 1981; Perez-Leblic *et al.*, 1982; Martinez *et al.*, 1986; Reyes *et al.*, 1988).

Actualmente se cree que algunas celulasas fúngicas se encuentran unidas a la pared hifal o se hallan en estrecha relación con el micelio, contenidas en una matriz o vaina de polisacáridos rodeando a la hifa. Esto se ha sugerido para el caso de hongos de pudrición blanca y de pudrición blanda, los cuales degradan la celulosa de la madera sólo a una distancia limitada de las hifas (Markham y Bazin, 1991). Este hecho podría estar relacionado con el retraso registrado en la liberación de las enzimas al medio, que alcanzan su máximo en la fase autolítica de crecimiento. Existen citas de una unión directa entre enzimas celulolíticas y la pared celular fúngica, en particular la β -glucosidasa se encontró unida a la pared hifal en *Sporotrichum pulverulentum* (syn. *Phanerochaete chrysosporium*) (Eriksson, 1978), en *Sporotrichum termophile* (Gaikwad y Maheshwari, 1994) y en

Trichoderma reesei (Jackson y Talburt, 1988; Messner *et al.*, 1990). Messner *et al.* (1990) encontraron que la β -glucosidasa de *Trichoderma reesei* encuentra unida a un glucano ancla de pared celular, el cual es un activador de esta enzima. Jafelice *et al.* (1990) y Cai *et al.* (1994) determinaron la existencia de β -glucosidasas intracelulares y extracelulares en *Phanerochaete chrysosporium* y *Volvariella volvacea*, respectivamente. Acebal *et al.* (1988) determinaron para una cepa de *Trichoderma reesei* tres tipos de localización para la actividad β -glucosidasa: intracelular, asociada a la pared y extracelular. Freer y Greene (1990) determinaron que la β -glucosidasa de *Clavispora lusitaniae* es citosólica y la de *Candida wickerhamii* está asociada a la pared celular.

En *Sporotrichum termophile* se observa una diferencia en la distribución de la β -glucosidasa, respecto de la edad del cultivo en medios con celulosa. La aparición de la β -glucosidasa en el medio de cultivo está retrasada respecto de la de endoglucanasa y exoglucanasa, y coincide con el momento de una extensiva autólisis del micelio. En contraste, no se observa una autólisis aparente ni liberación de β -glucosidasa cuando los cultivos se realizan con celobiosa como fuente de carbono. En esta última especie la liberación de β -glucosidasa al medio de cultivo depende de la actividad de enzimas líticas presentes en la pared celular, las cuales son inducidas por celulosa (Gaikwad y Maheshwari, 1994).

La morfología del micelio resultó diferente en ambas condiciones. En los cultivos con agitación se observó un patrón de crecimiento macromorfológico globoso (Mercuri, 1987b). Esta morfología puede ser responsable de las bajas cantidades de enzimas liberadas al medio extracelular, ya que éstas pueden estar adsorbidas o encerradas en la masa globular del micelio. En condiciones estáticas el crecimiento miceliano presentó un patrón macromorfológico plumoso y la producción enzimática resultó lineal con el crecimiento registrado. En estas condiciones dado que la celulosa precipita y las hifas del hongo permanecen cerca de la superficie del líquido (por ser el oxígeno un factor limitante), no existiría una estrecha interfase hifa-partícula de celulosa, como en el caso de agitación, por lo tanto estaría facilitada la difusión de las enzimas celulolíticas para poder degradar el polímero y se encontrarían en mayor cantidad en el sobrenadante de cultivo.

Cabe acotar que para todos los experimentos que se suceden a continuación se seleccionó la condición estática de incubación, debido a que los máximos de crecimiento y producción de endo y exoglucanasa resultaron comparables a los obtenidos en agitación y los picos de producción de dichas enzimas se alcanzaron aproximadamente 10 días antes en los cultivos estáticos.

4.1.2. Adición de un cosustrato.

La adición de glucosa (5 g/l) al medio de cultivo celulosa cristalina/asparagina (en condiciones estáticas de incubación) duplicó el crecimiento obtenido con respecto al registrado con celulosa cristalina como única fuente de carbono e incluso el máximo rendimiento miceliano se obtuvo en un menor tiempo de incubación. La velocidad de crecimiento comenzó a declinar al consumirse la glucosa presente en el medio de cultivo (Fig. R_{1E}). Aunque en *T. troglia* la adición de glucosa resultó en un buen crecimiento miceliano, redujo drásticamente la síntesis de celulasas y la secreción de proteínas extracelulares fue pobre. Las máximas actividades de las tres enzimas del sistema celulasa registradas (Fig. R_{1F}) resultaron marcadamente menores a las obtenidas sin el agregado de glucosa.

La síntesis de celulasas comienza cuando todavía el micelio está en activo crecimiento, pero la concentración de glucosa ha decaído notablemente al haber sido consumida por el hongo para su crecimiento, el máximo de producción de celulasas se produjo al día 16 de incubación, cuando ya se había consumido completamente la glucosa existente en el medio. Sivori (1991) utilizando el mismo medio pero en condiciones de agitación, también obtuvo los picos de celulasas cuando se agotó la glucosa presente en el medio.

Existen numerosas pruebas experimentales que indican que la producción de celulasas en los hongos está regulada por inducción y represión catabólica (Sternberg, 1976; Canevascini *et al.*, 1979; Ryu y Mandels, 1980; Sternberg y Mandels, 1982; Brown, 1983), siendo el inductor real un producto soluble de la hidrólisis de la celulosa. De acuerdo con esta hipótesis, se producirían

constitutivamente bajas cantidades de celulasas que hidrolizarían una mínima porción de celulosa, cuyos productos detonarían el proceso de inducción.

Entre los inductores se han citado: soforosa, celobiosa, thiocelobiosa, gentobiosa, xilosa, lactosa, celooligosacáridos, metil β -D-glucósidos, β -D-xilósidos, como así también surfactantes y ácidos grasos (Nisizawa *et al.*, 1971; Mandels, 1975; Canevascini *et al.*, 1979; Sternberg y Mandels, 1979; Sternberg y Mandels, 1982; Rho *et al.*, 1982; Moloney *et al.*, 1983; Kawamori *et al.*, 1986; Khandke *et al.*, 1989; Hrmova *et al.*, 1989; Fritscher *et al.*, 1990; Royer y Nakas, 1990; Yazdy *et al.*, 1990; Hrmova *et al.*, 1991; Oguntimein y Moo-Young, 1991; Kubicek *et al.*, 1993b). Sin embargo aún no se esclarecido la identidad exacta del compuesto de bajo peso molecular que induce la síntesis de celulasas (Duff y Murray, 1996).

Respecto de la represión por catabolitos resultantes de la hidrólisis de celulosa, se ha comprobado que la glucosa y la celobiosa inhiben parcial o totalmente la síntesis de celulasas en diversas especies fúngicas, entre otras: *Verticillium albo-atrum* (Cooper y Wood, 1973), *Myrothecium verrucaria* (Hulme y Stranks, 1971), *Trichoderma reesei* (Sternberg y Mandels, 1979), *Trichoderma viride* (Nisizawa *et al.*, 1972), *Penicillium italicum* (Santos *et al.*, 1977), *Nectria catalinensis* (Pardo y Forchiassin, 1994) y *Sporotrichum termophile* (Canevascini *et al.*, 1979). Se comprobó que esta represión se efectúa a nivel transcripcional (Wey *et al.*, 1994; Yaguee *et al.*, 1994). Sin embargo, en *Gloeophyllum trabeum* si bien la producción de endoglucanasa es inducible por celulosa, ésta no está sujeta a represión catabólica (Cotoras y Agosin, 1992) y en *Aspergillus fumigatus* la producción de β -glucosidasa fue mayor con la adición de 0.5% de glucosa al medio de cultivo (Ximenes *et al.*, 1996).

La presencia de glucosa en el medio reprime al sistema celulolítico de *T. trogii*, pero la represión no es total. Los niveles bajos de actividad celulasa en el medio con glucosa, constituyen el nivel basal constitutivo, capaz de gatillar la inducción y la síntesis del complejo enzimático en presencia del inductor adecuado. La falta de inhibición total del complejo celulolítico por glucosa fue descrita también para *Gloeophyllum trabeum* (Cotoras y Agosin, 1992) *Fusarium oxysporum* (Alconada,

1992), *Trichoderma longibrachiatum* (Sandhu y Kalra, 1985) y *Ascobolus gamundii* (Sivori *et al.*, 1996).

4.1.3. Efecto de la fuente de carbono.

Se probaron diversas fuentes carbonadas, utilizando asparagina como fuente de nitrógeno, con el objetivo de estudiar si la fuente de carbono utilizada en el medio de cultivo afecta la producción de celulasas por *T. trogii*. La cosecha del micelio (en éste y los siguientes experimentos) se realizó al día 21 de incubación, día en el cual, bajo las mismas condiciones se registró en promedio el mejor crecimiento y producción de celulasas en el medio celulosa cristalina/asparagina. Cabe acotar que dado que la cinética de crecimiento y producción enzimática no necesariamente es la misma en los diferentes medios de cultivo, puede suceder que al día fijado para la cosecha no se esté registrando en dichos medios, el máximo para un determinado parámetro en estudio.

En todos los medios utilizados hubo crecimiento, pero el nivel de éste no siempre se correspondió con el nivel de producción de celulasas (Fig. R_{2A,B}).

Los mayores crecimientos se obtuvieron con almidón, pectina, maltosa, xilosa y celobiosa (Fig. R_{2B}), lo que evidencia la capacidad del hongo para sintetizar amilasas y pectinasas entre otras enzimas. El crecimiento con xilosa indicaría un posible aprovechamiento de la hemicelulosa, presente en los tejidos leñosos, sustrato natural de *T. trogii*. Con celulosa cristalina, carboximetilcelulosa y xilano, el menor crecimiento responde al hecho de que son polímeros de lenta degradación. Adicionalmente, en el caso de la carboximetilcelulosa, el agregado de 10 g/l de esta fuente al medio, podría resultar en un potencial osmótico del mismo muy bajo, desfavorable para el crecimiento de *T. trogii*. El agregado de 10 g/l de carboximetilcelulosa al medio inhibe totalmente el crecimiento de *Nectria catalinensis* (Pardo, 1995).

Se detecta actividad celulasa en todos los medios ensayados (Fig. R_{2A}), lo cual comprobaría que la inducción no es altamente específica e indicaría que algunas de las celulasas son producidas al menos en parte en forma constitutiva. Se pueden

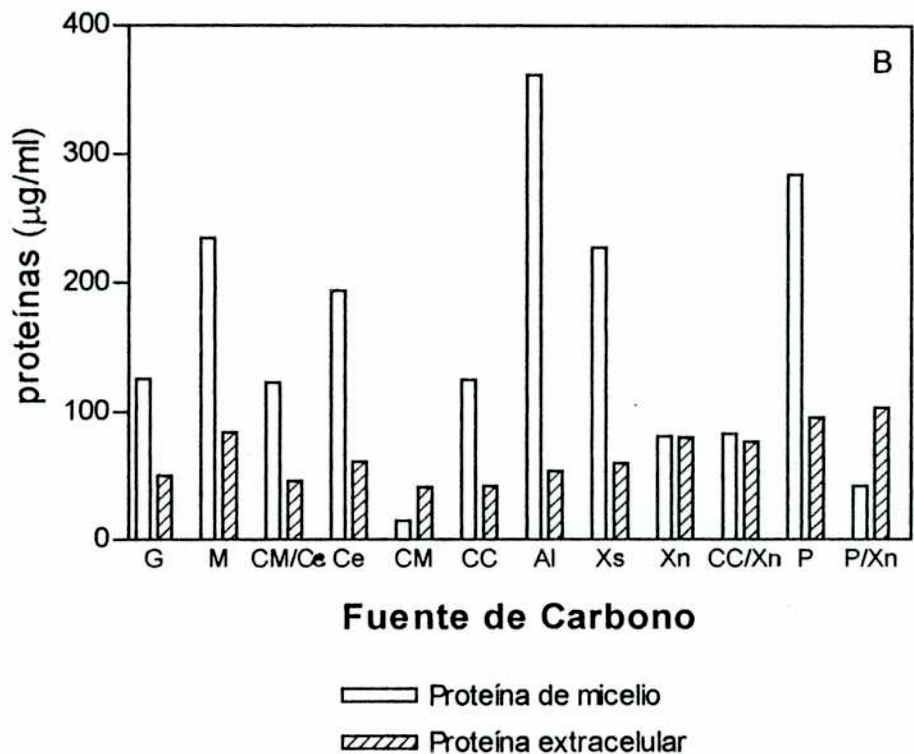
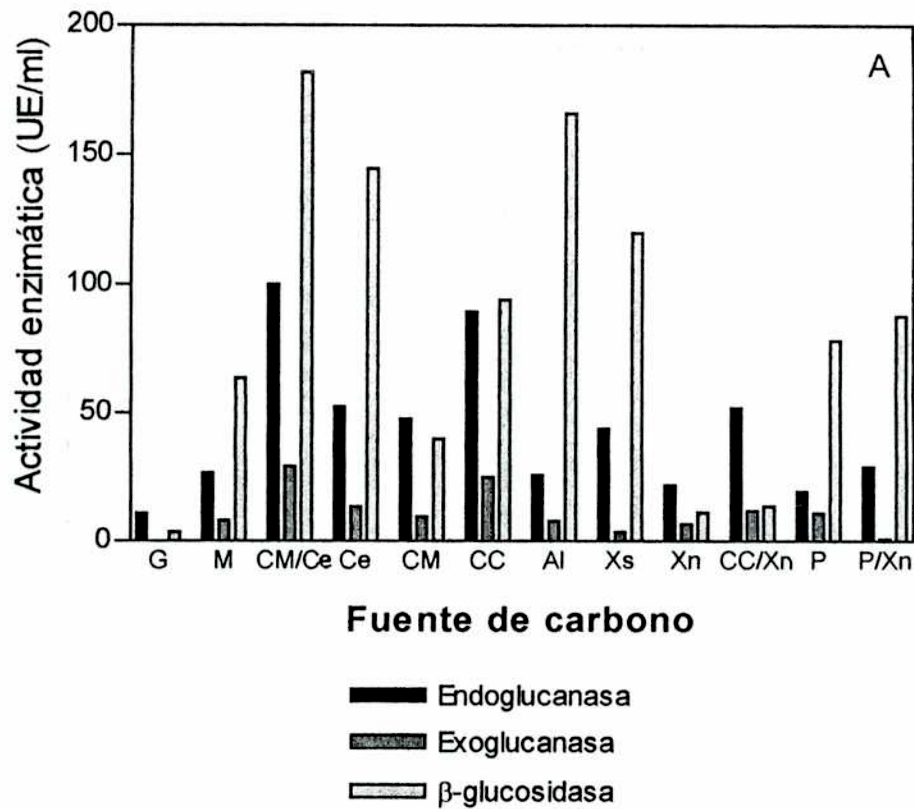


Figura R₂: **A** y **B**: Actividad enzimática (**A**) y crecimiento y producción de proteínas extracelulares (**B**) medidas a los 21 días de incubación, utilizando asparagina como fuente de nitrógeno, en función de la fuente carbonada. G: glucosa; M: maltosa; CM/Ce: mezcla de carboximetilcelulosa y celobiosa; Ce: celobiosa; CM: carboximetilcelulosa; CC: celulosa cristalina; Al: almidón; Xs: xilosa; Xn: xilano; CC/Xn: celulosa cristalina y xilano; P: pectina; P/Xn: mezcla de pectina y xilano.

citar numerosos trabajos (Khandke *et al.*, 1989; Yoshida *et al.*, 1989; Wood y García Campayo, 1990; Hrmova *et al.*, 1991; Osagie y Obuekwe, 1991; Alconada, 1992; Tweddell *et al.*, 1996) en los cuales la fuente de carbono empleada en los medios de cultivo para la producción de enzimas ha sido de muy variada naturaleza, demostrándose como en nuestro caso una inducción no específica de tales actividades enzimáticas.

A pesar de ello los mejores sustratos para la producción de endoglucanasas y exoglucanasas resultaron ser de naturaleza celulósica.

Para la β -glucosidasa las mejores fuentes fueron (en orden decreciente): carboximetilcelulosa/celobiosa, almidón, celobiosa y xilosa.

Productos solubles derivados de la hidrólisis del almidón tienen también un efecto inductor sobre la síntesis de celulasas en *Trichoderma reesei* (Chen y Wayman, 1992). La celobiosa tiene un comportamiento particular en su rol como inductor del sistema celulolítico, induce la síntesis de celulasas en algunas especies fúngicas, por ejemplo en *Sporotrichum termophile* (Canevascini *et al.*, 1979), en *Talaromyces emersonii* (Moloney *et al.*, 1983) y en *Aspergillus terreus* (Hrmova *et al.*, 1989; 1991); pero inhibe la formación de celulasas en varias especies del género *Trichoderma*: *T. viride* (Nisizawa *et al.*, 1971), *T. longibrachiatum* (Royer y Nakas, 1990). En *T. reesei* dependiendo de la concentración puede actuar tanto como inductor o como represor de la síntesis de celulasas (Whitaker, 1971; Sternberg, 1976; Messner *et al.*, 1990).

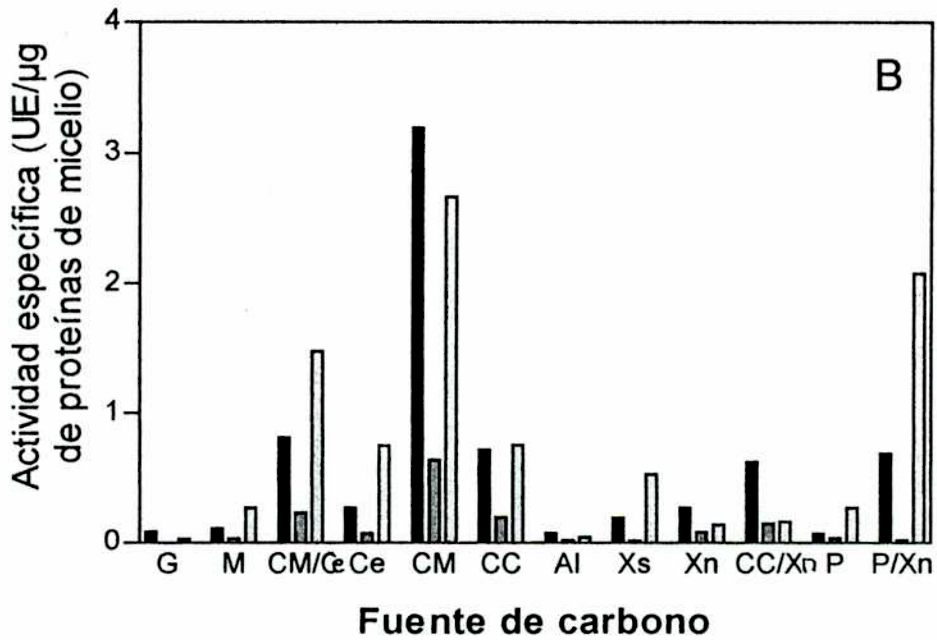
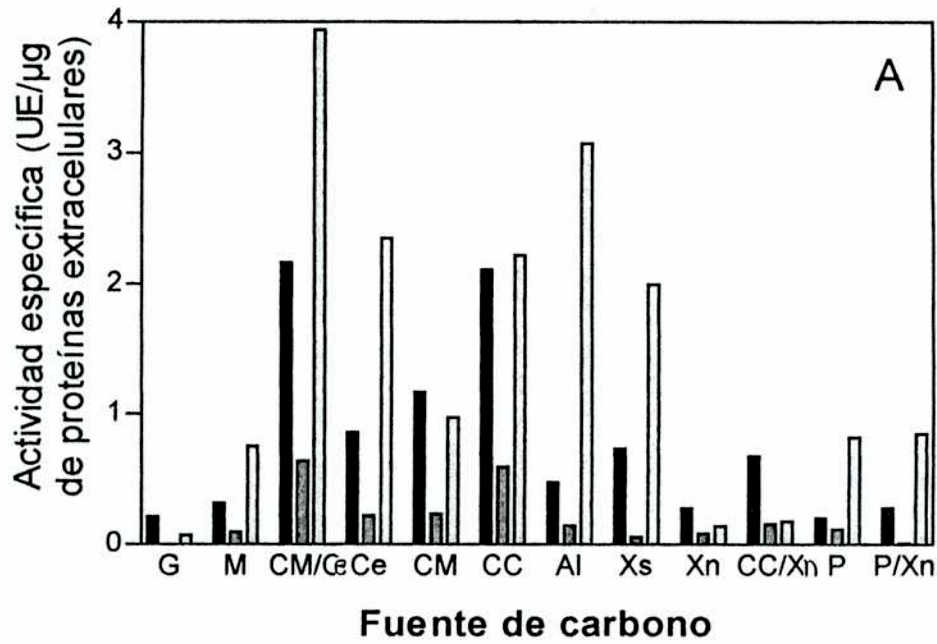
En nuestro caso se verifica que induce la actividad celulolítica: el agregado de celobiosa (sustrato fácilmente aprovechable) al medio con carboximetilcelulosa promueve el crecimiento miceliano y la producción de celulasas. En el medio con carboximetilcelulosa como única fuente el crecimiento obtenido fue muy pobre, sin embargo resultó ser un buen inductor del complejo celulasa.

La carboximetilcelulosa raramente es una buena fuente carbonada para el crecimiento fúngico (Mandels y Reese, 1960). No ha resultado buen inductor de las enzimas del sistema celulolítico en *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (Alconada, 1992), pero sí en el caso de *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaeidis* (Osagie y

Obuekwe, 1991), *Trichoderma longibrachiatum* (Sandhu y Kalra, 1985), *Nectria catalinensis* (Pardo, 1995) y *Gloeophyllum trabeum* (Cotoras y Agosin, 1992). Finalmente cabe señalar que el xilano reprime la celulolisis en algunos hongos de pudrición blanca (Sutherland, 1986), pero no en el caso de *T. trogii*, y la xilosa, uno de los azúcares resultantes primordialmente de su degradación resulta un buen inductor de la actividad β -glucosidasa en esta especie.

La actividad específica referida a las proteínas extracelulares (Fig. R_{3A}) indica que utilizando un medio de cultivo con carboximetilcelulosa/celobiosa como fuente de carbono, se obtuvo una mezcla proteica más rica en celulasas, respecto de las otras fuentes. Valores comparables de actividad específica para la endo y exoglucanasa se obtuvieron con celulosa cristalina, pero la actividad específica β -glucosidasa resultó menor. Para esta última actividad resultaron buenos inductores asimismo, el almidón, la celobiosa y la xilosa. La actividad específica referida a las proteínas extracelulares es de utilidad al momento de elegir un medio de cultivo para obtener celulasas que posteriormente serán sometidas a un esquema de purificación.

La actividad específica, referida a la biomasa fúngica, de las distintas celulasas, da idea de la productividad enzimática por unidad de biomasa. Esta medida es de utilidad cuando se desea emplear un medio de cultivo para inducción del sistema celulolítico, a partir de micelio precrecido en otro medio donde se obtuvo abundante biomasa. En otras palabras, interesa un medio de inducción que promueva la máxima productividad enzimática por unidad de biomasa, sin importar su efecto sobre el crecimiento, ya que la biomasa fúngica se obtiene previamente en un medio de cultivo más rico. En la figura R_{3B} se muestran los resultados obtenidos, y puede verse claramente que al utilizar carboximetilcelulosa se obtuvieron los valores más altos para todas las actividades enzimáticas en estudio, seguidos por la combinación carboximetilcelulosa/celobiosa y la celulosa cristalina como única fuente de carbono. Sin embargo con la combinación pectina/xilano se logró alta productividad de β -glucosidasa por unidad de biomasa. Dicha fuente, o ambas por separado resultaron también las más efectivas para la producción de celulasas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (Alconada, 1992). En ambos casos se trata de



Endoglucanasa
 Exoglucanasa
 β-glucosidasa

Figura R₃: **A**: Actividades específicas, referidas a la concentración de proteínas extracelulares, en un medio con asparagina como fuente de nitrógeno y diferentes fuentes de carbono, G: glucosa; M: maltosa; CM/Ce: mezcla de carboximetilcelulosa y celobiosa; Ce: celobiosa; CM: carboximetilcelulosa; CC: celulosa cristalina; Al: almidón; Xs: xilosa; Xn: xilano; CC/Xn: celulosa cristalina y xilano; P: pectina; P/Xn: mezcla de pectina y xilano. **B**: Actividades específicas referidas a la concentración de proteínas de micelio, en las mismas condiciones de **A**.

heteropolisacáridos que presentan distintos azúcares en su molécula, los cuales podrían actuar como inductores de las actividades celulolíticas.

4.1.4. Efecto de la variación de la concentración de la fuente de carbono.

Se varió la concentración de carboximetilcelulosa/celobiosa en el medio de cultivo, utilizando asparagina (4 g/l) como fuente nitrogenada. En la figura R_{4A,B} se observa que a medida que aumenta la concentración de la mezcla carboximetilcelulosa/celobiosa, aumenta el crecimiento, la cantidad de proteínas extracelulares, así como también las actividades enzimáticas medidas, hasta alcanzar los máximos con 5 g/l de cada una de las fuentes (10 g/l de la mezcla). En concentraciones mayores disminuyen los valores obtenidos para todas las variables estudiadas. Altas concentraciones de sustrato pueden resultar inhibitorias de la producción enzimática, tanto por el posible efecto inhibitorio de la celobiosa como por la liberación de glucosa al medio al ser degradada la carboximetilcelulosa. Asimismo, altas concentraciones de carboximetilcelulosa pueden resultar inhibitorias debido al bajo potencial agua de estos medios de cultivo. Altas concentraciones de carboximetilcelulosa resultaron inhibitorias también para la producción de celulasas por *Trichoderma longibrachiatum* (Sandhu y Kalra, 1985).

4.1.5. Efecto de las fuentes nitrogenadas sobre la producción de celulasas.

En un medio con celulosa cristalina como fuente de carbono (10 g/l), se analizó el comportamiento del hongo frente a distintas fuentes nitrogenadas: sales de amonio y compuestos orgánicos de nitrógeno (en concentraciones equivalentes a 0.75 g/N por litro). Estas fuentes fueron seleccionadas entre aquellas que produjeron los mejores crecimientos de *T. trogii*, utilizando glucosa como fuente de carbono (Levin *et al.*, 1992). No se probaron nitratos porque *T. trogii* demostró ser incapaz de utilizar el anión NO₃⁻ como fuente de nitrógeno (Levin *et al.*, 1992). Estos resultados indicarían la ausencia de la enzima nitrato-reductasa en *T. trogii* (Pateman y

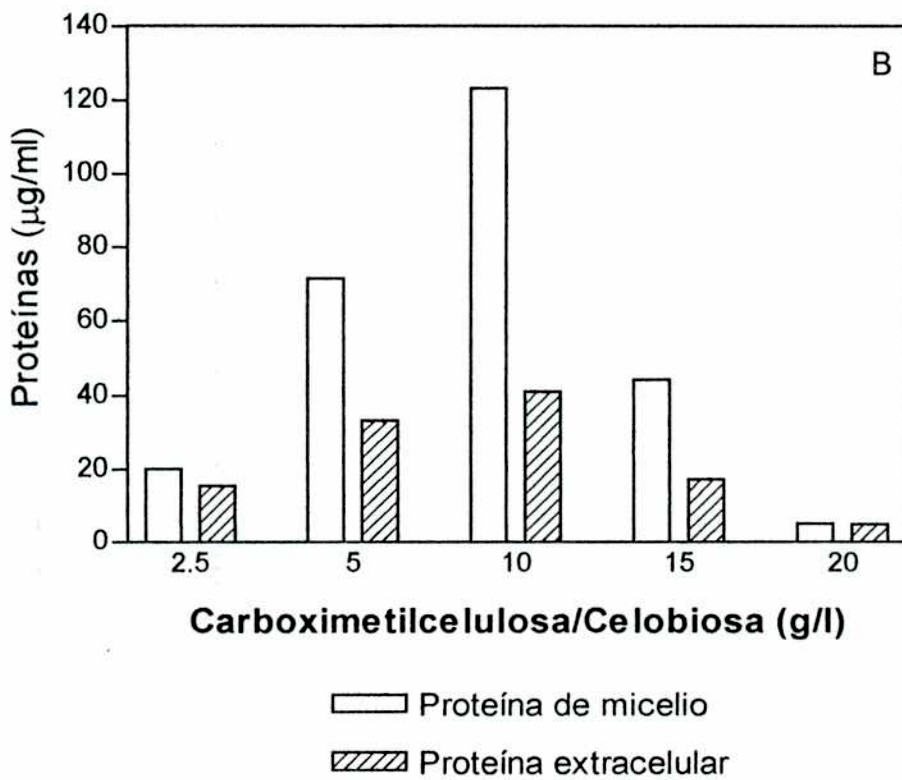
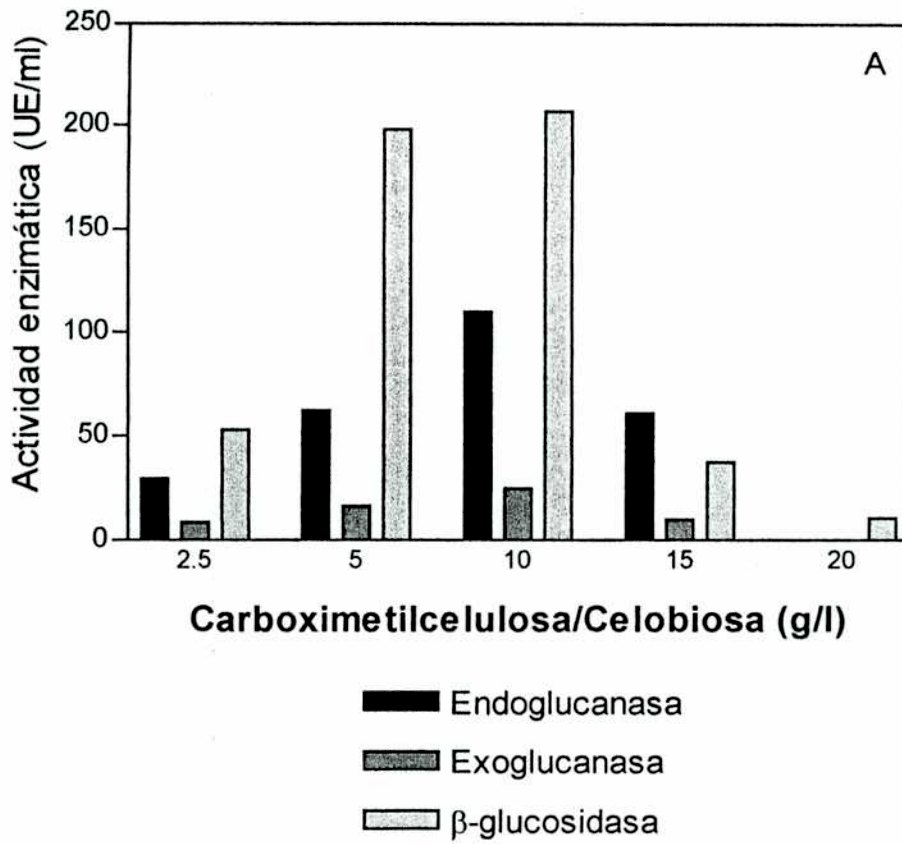


Figura R₄ **A** y **B**: Variación de la concentración de la combinación de cantidades iguales de carboximetilcelulosa/celobiosa: actividad enzimática (**A**) y crecimiento y producción de proteínas extracelulares (**B**) medidas a los 21 días de incubación, utilizando asparagina como fuente de nitrógeno.

Kinghorn, 1976). De acuerdo a ello puede incluirse en el grupo III de Robbins (Robbins, 1937). Lo que indicaría que *T. trogii* es capaz de utilizar compuestos de nitrógeno en los cuales el elemento se encuentra en forma reducida.

Los hongos requieren de una fuente de nitrógeno para su crecimiento y desarrollo, la cual es utilizada para la síntesis de una variedad de constituyentes celulares esenciales tales como aminoácidos, purinas, pirimidinas, glucosamina y varias vitaminas. Como *T. trogii*, la mayoría de los hongos son capaces de utilizar fuentes orgánicas e inorgánicas de nitrógeno. La utilización de una determinada fuente de nitrógeno por los hongos está genéticamente determinada, pero además, depende de las condiciones nutricionales y de cultivo en que se desarrolla. Diversos trabajos permiten concluir que para un sistema *in vitro* determinado, la fuente de nitrógeno condiciona la utilización de la de carbono (Lilly y Barnett, 1951; Nicholas, 1965; Lima y Mercuri, 1984; Pardo, 1995), e inclusive la relación de concentraciones de ambas fuentes en el medio de cultivo (relación C/N) es importante para la utilización de las mismas y el crecimiento vegetativo (Levin *et al.*, 1992; Pardo y Forchiassin, 1993). Esto es de especial importancia cuando se trata de hongos capaces de utilizar celulosa cristalina en condiciones controladas (Reese, 1976; Wang *et al.*, 1983).

La degradación de celulosa es influida por la fuente de nitrógeno utilizada, pero ésta varía en las diversas especies: *Phanerochaete chrysosporium* (Reid, 1983b) y *Saccobolus saccoboloides* (Magnelli *et al.*, 1996) degradan celulosa más rápidamente con fuentes orgánicas nitrogenadas; *Ascobolus furfuraceus* (Mercuri, 1996), *Thermonospora fusca* (Lin y Wilson, 1987), *Aspergillus terreus* (Garg y Neelakanian, 1981) y *Stachybotrys elegans* (Tweddell *et al.*, 1996) degradan eficientemente la celulosa utilizando nitrato de sodio, en cambio *Trichoderma* presenta óptimos de producción de celulasas con amonio como fuente de nitrógeno (Sheir-Neis y Montecourt, 1984); también en el caso de *Aspergillus fumigatus* (Stewart y Parry, 1981), el Basidiomycete CPC 142 (Shewale y Sadana, 1978), *Talaromyces emersonii* (Moloney *et al.*, 1983) y *Nectria catalinensis* (Pardo y Forchiassin, 1998), la mayor producción de celulasas ocurre en medios con sales de amonio.

De los resultados obtenidos (Fig. R_{5A,B}) se puede concluir que las fuentes orgánicas ensayadas resultaron mejores que las inorgánicas promoviendo tanto el crecimiento como la liberación de las enzimas del sistema celulolítico en *T. trogii*. Entre las fuentes orgánicas los casaminoácidos resultaron los más efectivos para estimular el crecimiento y la liberación de las tres enzimas del complejo celulolítico de *T. trogii*. Los casaminoácidos también resultaron ser la mejor fuente para producción de celulasas y crecimiento por *Saccobolus saccoboloides* (Magnelli *et al.*, 1996), mientras que *Nectria catalinensis* (Pardo, 1995) crece eficientemente pero con escasa liberación de enzimas.

El menor crecimiento obtenido con asparagina podría deberse a que *T. trogii* es incapaz de utilizar este compuesto como fuente carbonada (Levin *et al.*, 1992), mientras que probablemente sí pueda aprovechar como tal algún otro aminoácido presente en los casaminoácidos, dado que la fuente de carbono utilizada (celulosa cristalina) es un polímero de lenta degradación.

De las fuentes inorgánicas la mejor fue el fosfato de amonio. En el caso de las sales de amonio de ácidos fuertes (cloruro, sulfato) su metabolización produce un brusco descenso del pH que inhibe el crecimiento y afecta marcadamente la producción de enzimas. El aumento en la concentración de H⁺ del medio de cultivo puede estar dada por la liberación de este catión al medio de cultivo (Lima y Mercuri, 1984; Pardo y Forchiassin, 1993).

En general todas las fuentes que promovieron el crecimiento también resultaron en buenos niveles de producción de celulasas.

La actividad específica referida a las proteínas extracelulares (Fig. R_{6A}) indica que utilizando un medio de cultivo con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, se obtuvo una mezcla proteica más rica en endoglucanasa, respecto de las otras fuentes. Similares resultados fueron obtenidos por Pardo (1995) en *Nectria catalinensis*.

La actividad específica, referida a la biomasa fúngica, de las distintas celulasas, da idea de la productividad enzimática por unidad de biomasa. En la figura R_{6B} se muestran los resultados obtenidos, y puede verse claramente que al utilizar

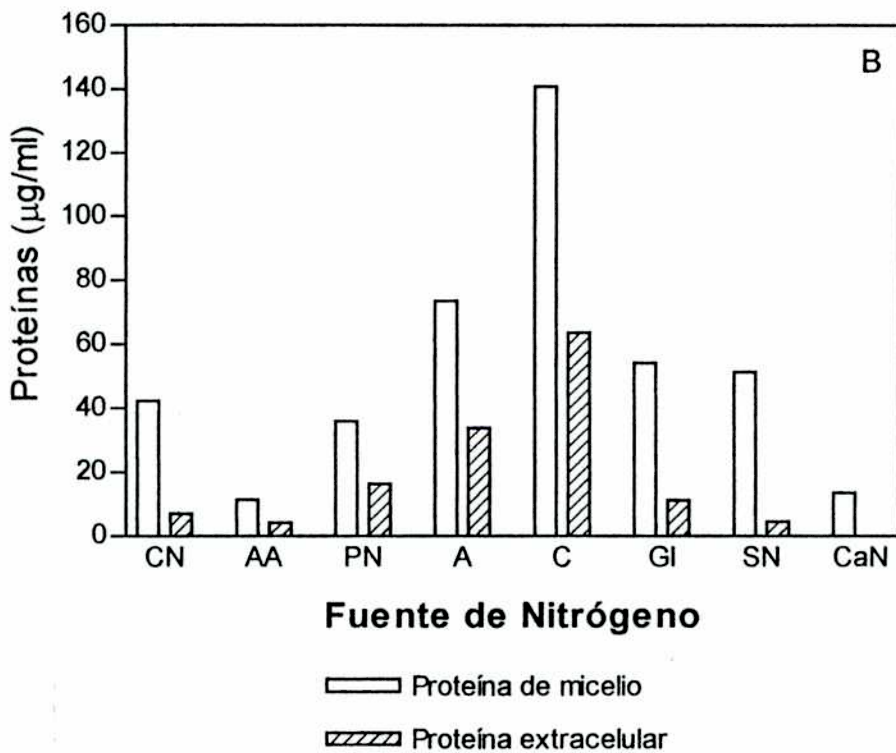
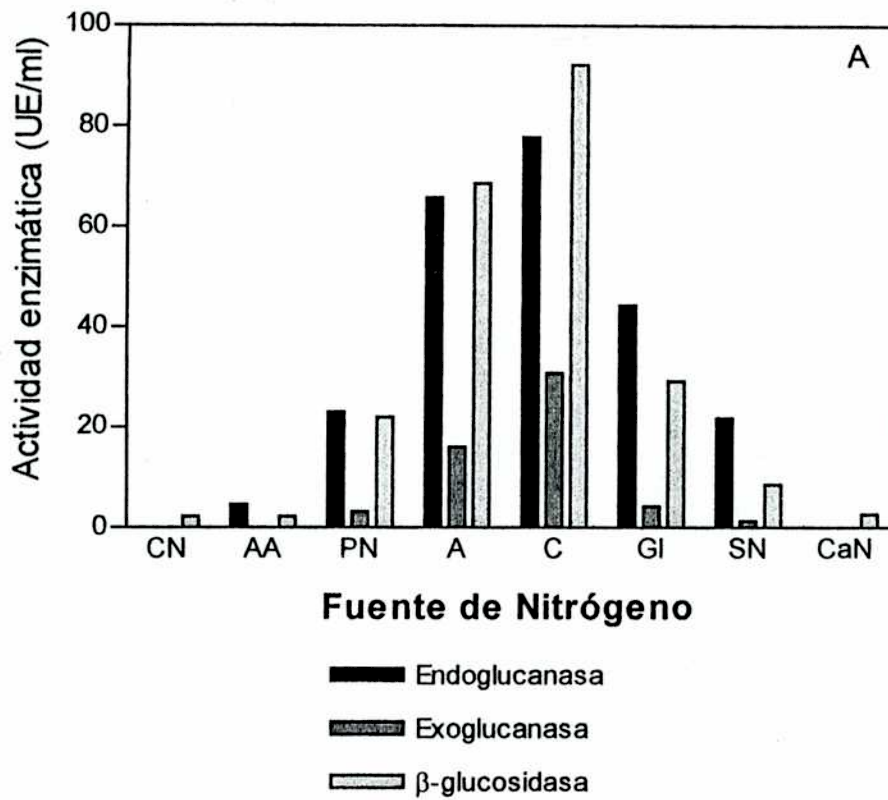


Figura R₅: **A** y **B**: Actividad enzimática (**A**) y crecimiento (proteínas de micelio) y proteínas extracelulares (**B**) medidas a los 21 días de incubación, utilizando celulosa cristalina como fuente de carbono y variando la fuente de nitrógeno. CN: cloruro de amonio; AA: ácido aspártico; PN: fosfato de amonio; A: asparagina; C: casaminoácidos; GI: glicina; SN: sulfato de amonio; CaN: carbonato de amonio.

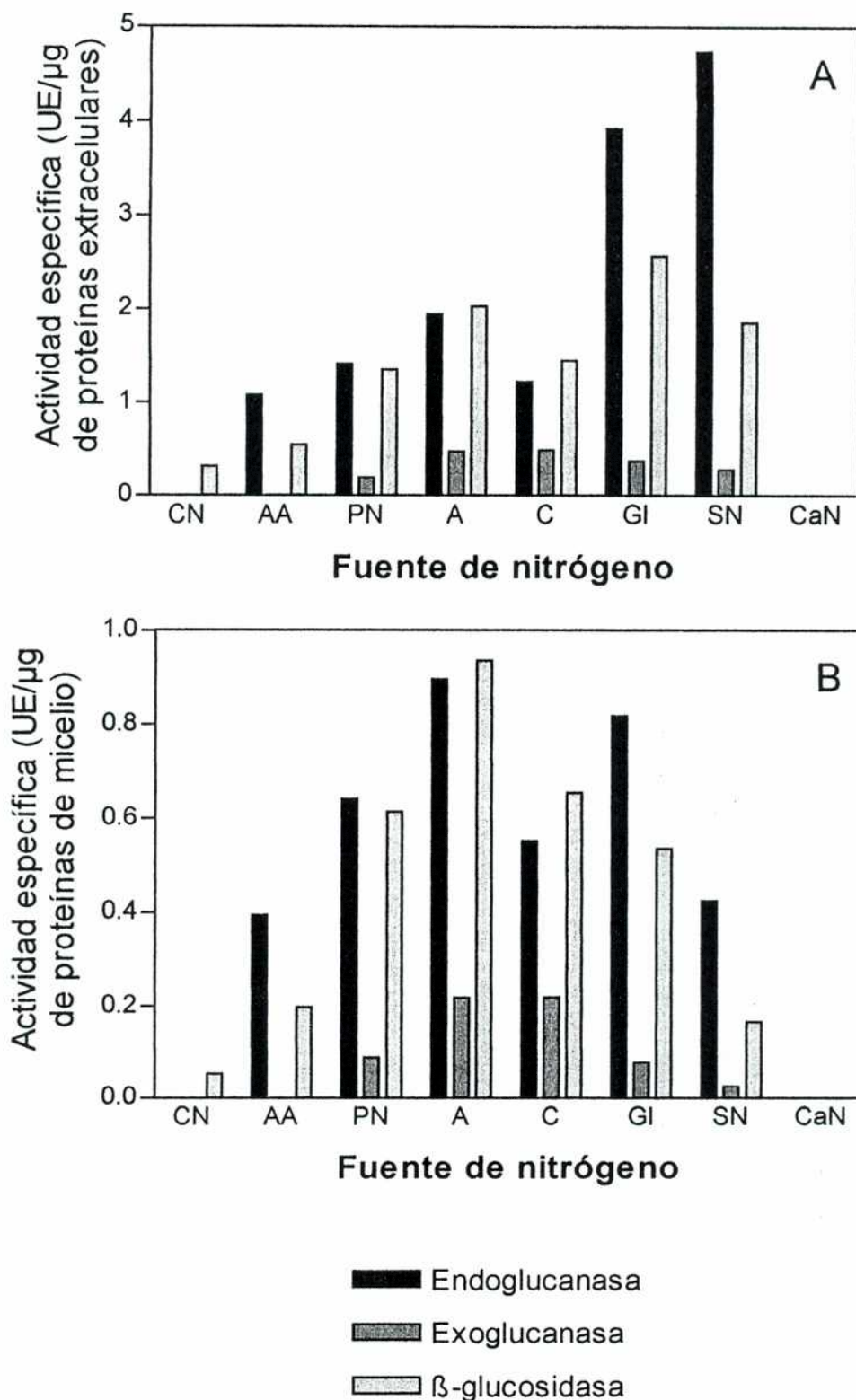


Figura R₆: **A**: Actividades específicas, referidas a la concentración de proteínas extracelulares, en un medio con celulosa cristalina como fuente de carbono y diferentes fuentes de nitrógeno, CN: cloruro de amonio; AA: ácido aspártico; PN: fosfato de amonio; A: asparagina; C: casaminoácidos; GI: glicina; SN: sulfato de amonio; CaN: carbonato de amonio. **B**: Actividades específicas referidas a la concentración de proteínas de micelio, en las mismas condiciones de **A**.

asparagina como fuente de nitrógeno se obtuvieron los valores más altos para todas las actividades enzimáticas en estudio.

4.1.6. Efecto de la variación de la concentración de la fuente nitrogenada.

Dado que los casaminoácidos resultaron ser la fuente más efectiva tanto para la promoción del crecimiento cuanto de la producción de las enzimas del complejo celulolítico, se varió la concentración de los mismos entre 2.12 g/l (equivalente a 0.187 g de N/l) y 16.96 g/l (equivalente a 1.5 g de N/l), utilizando celulosa cristalina (10 g/l) como fuente carbonada.

Las máximas actividades de las enzimas celulolíticas se obtuvieron a una concentración de 12.7 g/l o mayor (Fig. R_{7B}), siendo en ambos casos semejantes las actividades registradas, resultados que coinciden con los máximos valores de proteínas extracelulares medidos. Se verifica en cambio, un aumento significativo en el crecimiento del hongo en estudio (medido como proteína de micelio) a partir de una concentración de casaminoácidos de 8.48 g/l (Fig. R_{7A}).

La concentración de nitrógeno en los sustratos lignocelulósicos es baja (relación C/N = 100 o mayor) y constituye (junto con la asociación de la celulosa a otros sustratos difícilmente degradables como la lignina) uno de los principales factores que disminuye el grado de descomposición de la celulosa en la naturaleza (Markham y Bazin, 1991).

4.1.7. Cinética de crecimiento y producción enzimática en un medio óptimo.

Utilizando las fuentes de carbono y nitrógeno más efectivas para la producción de celulasas a las concentraciones determinadas anteriormente como más favorables: carboximetilcelulosa/celobiosa (5 g/l de cada una de las fuentes) y casaminoácidos (12.72 g/l) (pH inicial del medio: 6.6 ± 0.1), se obtuvo mayor crecimiento y producción enzimática (Fig. R_{8A,B}), con respecto al medio celulosa cristalina/asparagina anteriormente utilizado (ver punto 4.1.1.). La actividad de endoglucanasa se vió incrementada al doble y más del doble la β -glucosidasa. El

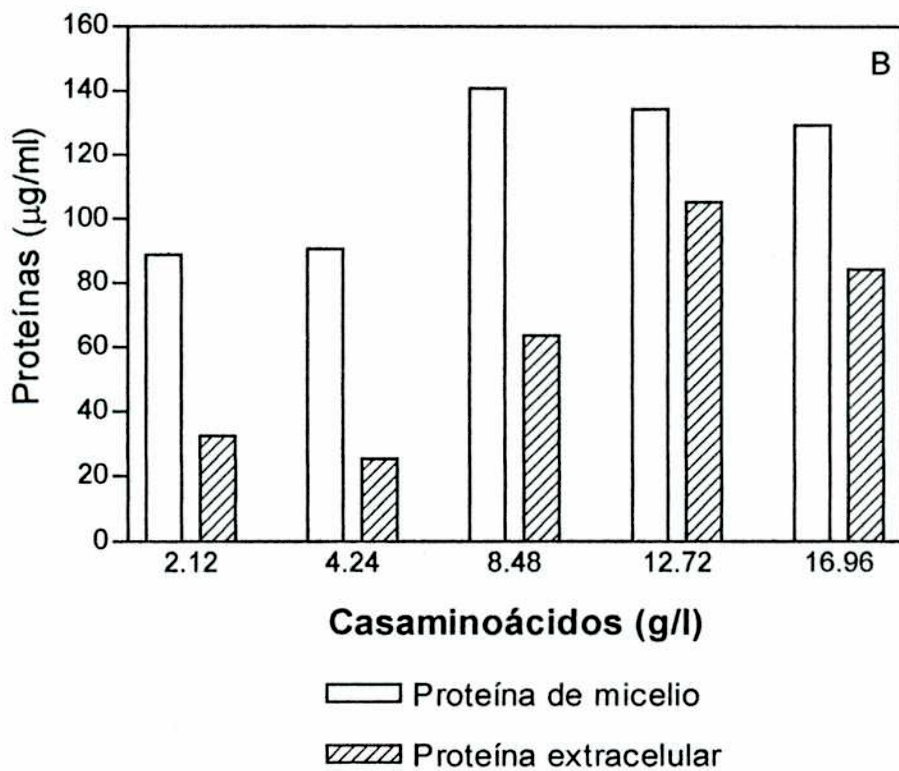
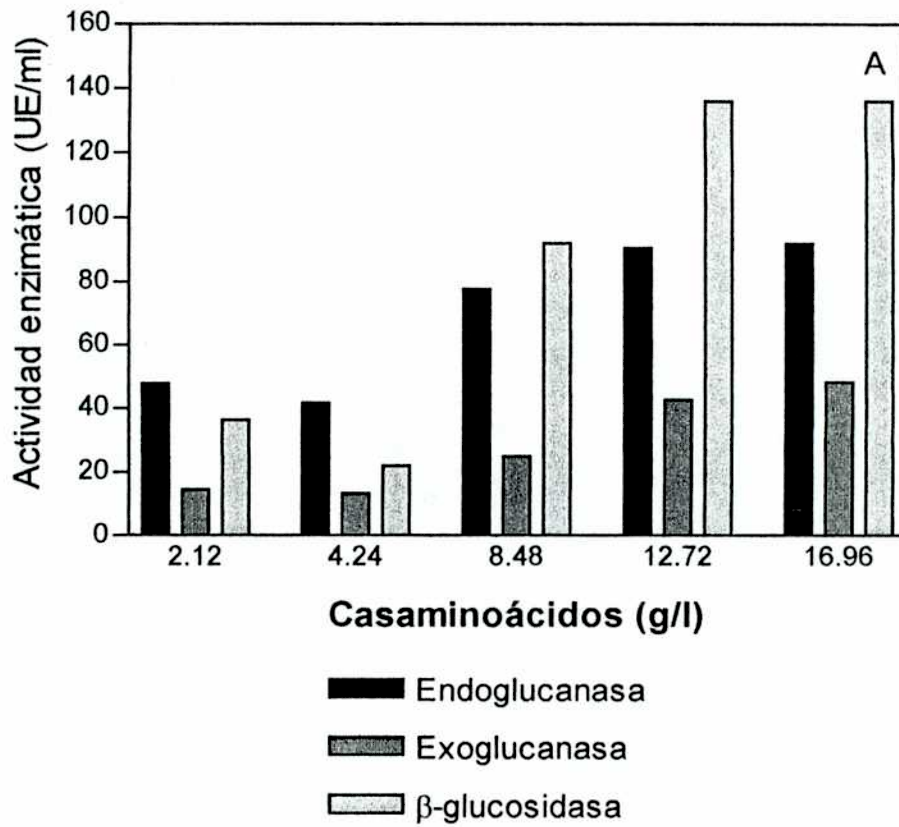
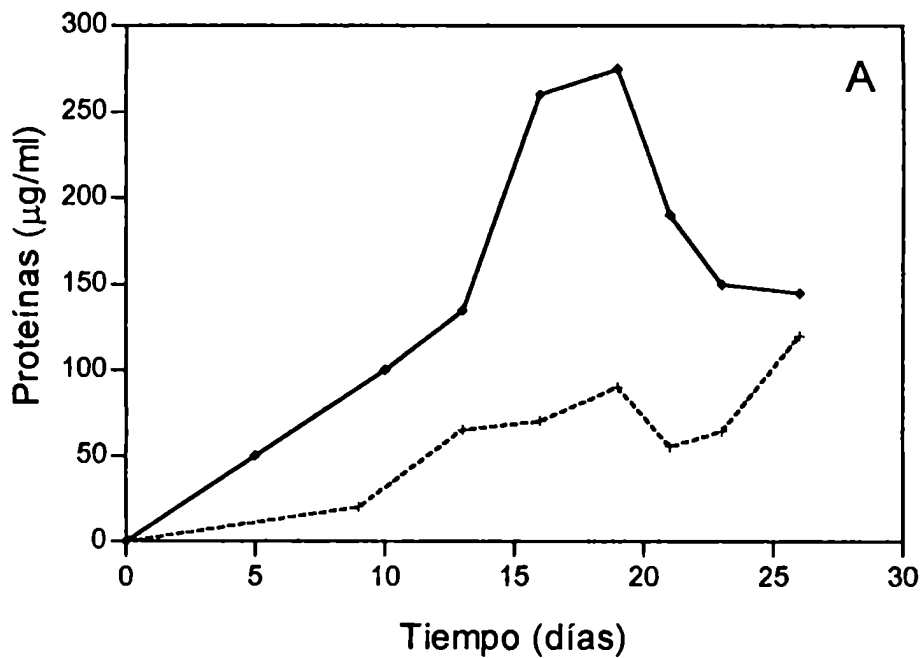
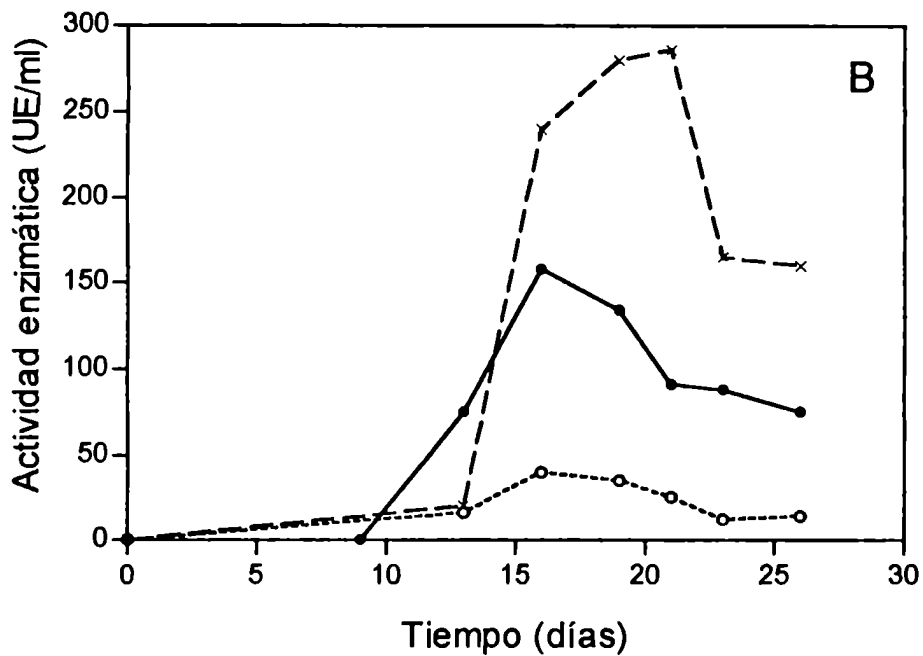


Figura R₇ **A** y **B**: Variación de la concentración de casaminoácidos en el medio de cultivo: actividad enzimática (**A**) y crecimiento y producción de proteínas extracelulares (**B**) medidas a los 21 días de incubación, utilizando celulosa cristalina como fuente de carbono.



—●— Proteína de micelio
 - - -○- - Proteína extracelular



—●— Endoglucanasa
 - - -○- - Exoglucanasa
 - - × - - β-glucosidasa

Figura R_g: **A** y **B**: crecimiento y producción de proteínas extracelulares (**A**) y actividad enzimática (**B**) a lo largo del tiempo de incubación, utilizando un medio con carboximetilcelulosa/celobiosa como fuente de carbono y casaminoácidos como fuente nitrogenada, a las concentraciones previamente determinadas como más favorables (12.72 g/l de casaminoácidos y 5 g/l de cada una de las fuentes carbonadas).

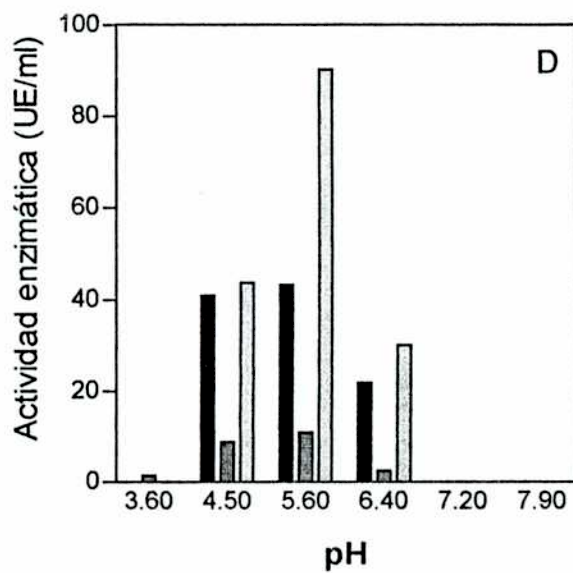
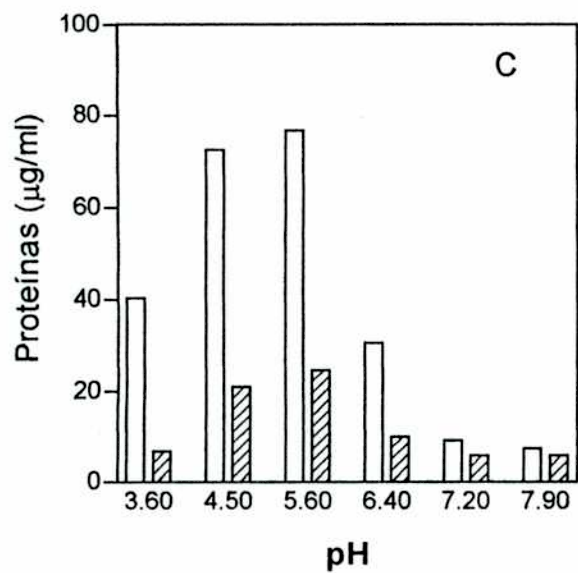
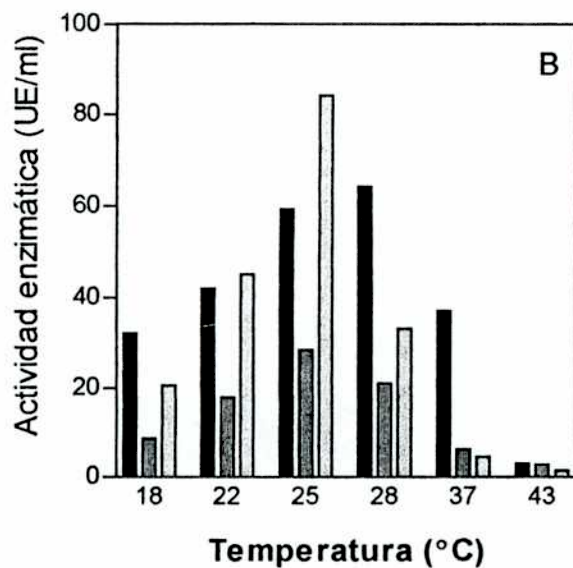
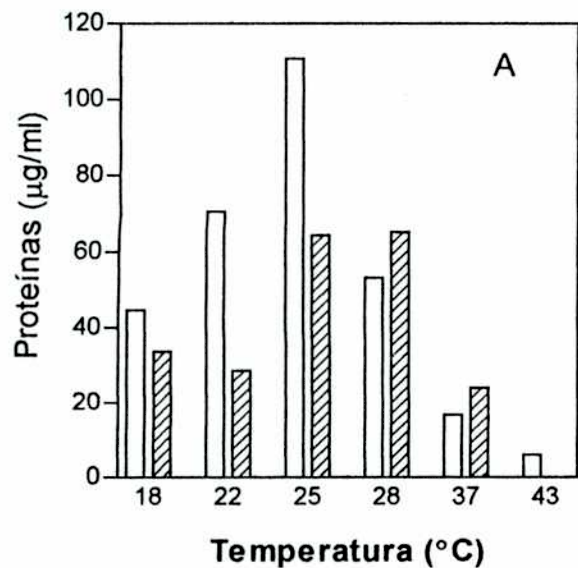
tiempo de incubación requerido para la máxima actividad se redujo en aproximadamente 4 días. La exoglucanasa fue la enzima menos afectada, su producción se incrementó solamente en 1.4 y el tiempo necesario para su inducción fue aproximadamente el mismo.

4.1.8. Efecto de la temperatura y el pH sobre la producción enzimática.

En estos experimentos se cultivó a *T. trogii* en el medio celulosa cristalina/asparagina, a distintas temperaturas entre 18 y 43 °C.

T. trogii fue capaz de crecer en un amplio rango de temperaturas, pero los mejores resultados se obtuvieron a 25 °C (Fig. R_{9A}). Las mayores actividades de β -glucosidasa y exoglucanasa también se registraron a dicha temperatura (Fig. R_{9B}), mientras que la actividad endoglucanasa fue ligeramente mayor a 28 °C. En ambas temperaturas la cantidad de proteínas extracelulares secretadas resultó semejante. Se estudió el efecto del pH inicial sobre el crecimiento y la producción enzimática (Fig. R_{9C,D}) en el medio celulosa cristalina/asparagina, a diferentes valores de pH inicial. Los valores de pH no variaron significativamente luego del período de incubación. El pH óptimo tanto para el crecimiento como para la producción de las tres enzimas del complejo celulasas resultó 5.6, registrándose actividad enzimática en los sobrenadantes entre 4.5 y 6.4. A pH mayor de 7 se inhibió marcadamente el crecimiento y la producción enzimática fue nula. Los valores de pH más favorables a la producción enzimática coincidieron con los mayores rendimientos micelianos también en *Trichoderma* sp. (Mukhopadhyay y Malik, 1980) y *Neurospora sitophila* (Oguntimein y Moo-Young, 1991). En *T. trogii*, creciendo en celulosa cristalina en condiciones estáticas se observó siempre una estrecha relación entre crecimiento y producción enzimática.

Los valores de pH y temperatura que favorecieron el crecimiento y la producción enzimática, estuvieron dentro del rango que resultó favorable en otras especies: *Trichoderma viride* (Kysliková y Volfová, 1981), *Penicillium rubrum* (Menon *et al.*, 1994), *Aspergillus fumigatus* (Stewart y Parry, 1981), *Aspergillus terreus* (D'Souza y Volfová, 1982; Pushalkar *et al.*, 1995), *Aspergillus niveus* (Taj Aldeen



Proteína de micelio
 Proteína extracelular

Endoglucanasa
 Exoglucanasa
 β-glucosidasa

Figura R₉: Efecto de la temperatura de incubación (A,B) y el pH inicial del medio de cultivo (C,D) sobre el crecimiento (A,C) y la producción enzimática (B,D) de *T. trogii* luego de 21 días de crecimiento en medio con celulosa cristalina-asparagina, en condiciones estáticas.

y Alkenany, 1993), *Trichoderma longibrachiatum* (Sandhu y Kalra, 1985), *Schizophyllum commune* (Desrochers *et al.*, 1981) y *Agaricus bisporus* (Manning y Wood, 1983).

4.1.9. Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad enzimática.

Para minimizar la pérdida de actividad enzimática por razones económicas, los complejos enzimáticos deberían poder ser usados con fines industriales tal cual son hallados en los sobrenadantes de cultivo. Luego de una filtración o centrifugación, no debería requerirse otro procesamiento. Debido a ello en este trabajo las caracterizaciones bioquímicas de las diferentes actividades enzimáticas se realizaron utilizando el complejo crudo obtenido a partir de sobrenadantes de cultivo.

Se midieron las actividades enzimáticas entre 30 y 70 °C (en buffer acetato de sodio pH 4.8) y a distintos pH obtenidos por disolución de los sustratos respectivos en buffer citrato fosfato en un rango de valores de pH entre 2.5 y 7.3 (a 37 °C la endo y exoglucanasa y 50 °C la β -glucosidasa) (véase punto 3.7. de materiales y métodos). Las condiciones óptimas fueron: 45 °C y pH 3.1 para endoglucanasa, 50 °C y pH 4.1 para exoglucanasa y 60 °C y pH 5.3 para β -glucosidasa (Fig. R_{10A,B}). Las actividades enzimáticas tuvieron óptimos de pH y temperatura semejantes a los de otras especies (Kitpreechavanich *et al.*, 1986; Bagga *et al.*, 1990; Oguntimein y Moo-Young, 1991; Sengupta *et al.*, 1991; Sharma *et al.*, 1991; Taj Aldeen y Alkenany, 1993; Magnelli *et al.*, 1996). Una excepción es la actividad de endoglucanasa que se vió favorecida por un pH de 3.1, un registro más bajo que los habituales, sólo comparable con el Basidiomycete CPC 142, que presentó un máximo de actividad a pH 3.7 (Shewale y Sadana, 1978).

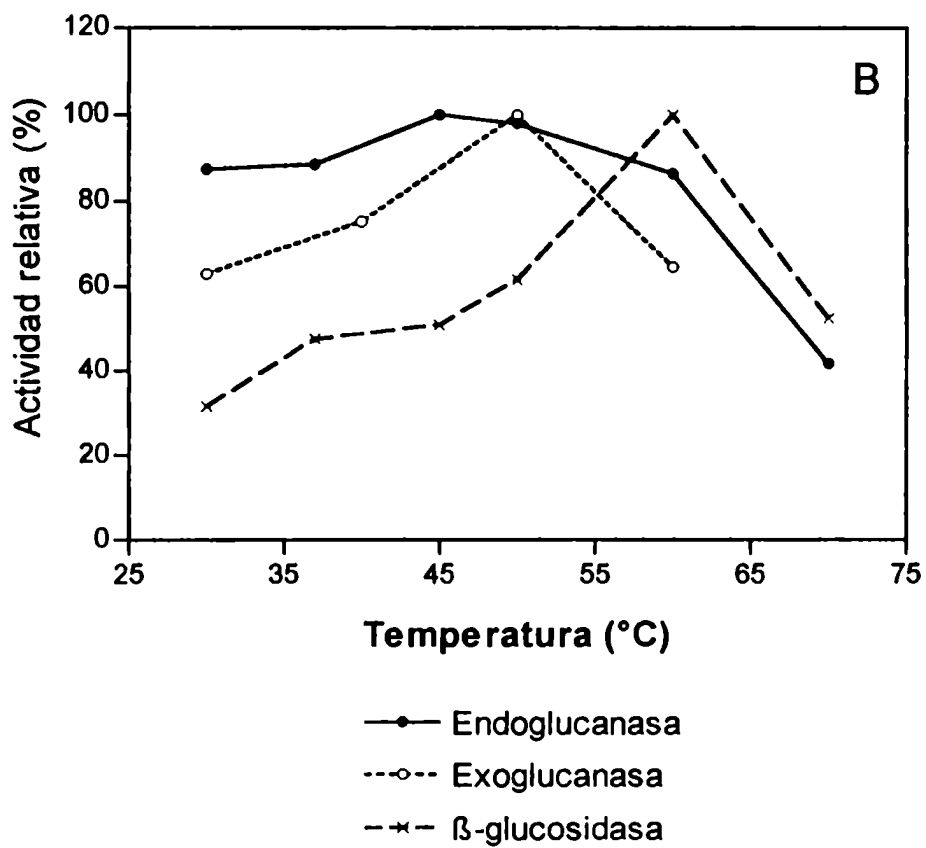
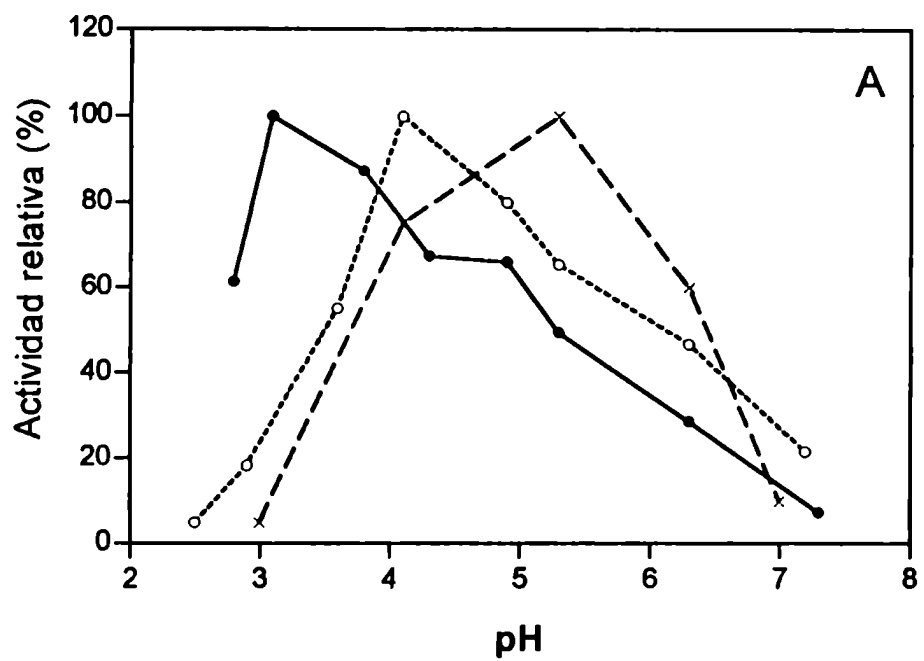


Figura R₁₀: Efecto del pH (A) y la temperatura (B) sobre las actividades de las enzimas del sistema celulolítico de *T. trogii*.

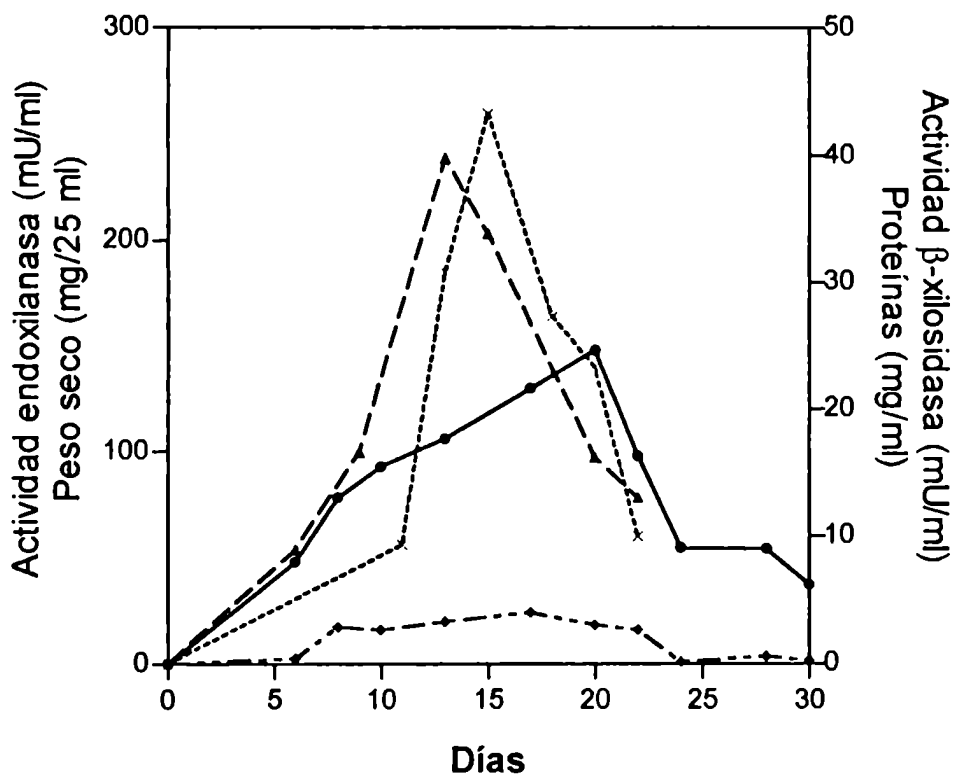
4.2. XILANASAS.

4.2.1. Cinética de crecimiento y producción enzimática.

Para estudiar la cinética de crecimiento y producción de enzimas xilanolíticas se utilizó el medio sintético líquido con xilano (10 g/l) como fuente de carbono y asparagina (4 g/l) como fuente de nitrógeno (pH inicial del medio: 6.5 ± 0.1) (véase sección 3.3.2.1. de materiales y métodos). Como puede observarse en la figura R₁₁, *T. trogii* fue capaz de crecer en un medio con xilano como única fuente de carbono y produjo, en un medio de cultivo adecuado, las actividades enzimáticas responsables de la degradación de la fracción de xilano de las paredes celulares de los vegetales superiores. Bajo las condiciones del ensayo, el máximo crecimiento se obtuvo alrededor del día 18° de incubación. Durante los primeros días de incubación se detectaron bajos niveles de actividad β -xilosidasa y endoxilanasas. Las máximas actividades se obtuvieron un poco antes del pico de máxima biomasa, al día 13° y 15° respectivamente, observándose luego una disminución en la producción enzimática. Los bajos niveles de actividad registrados durante los primeros días de incubación podrían representar niveles constitutivos de las enzimas investigadas, el aumento en la actividad total durante el período de cultivo, demuestra una síntesis activa de dichas enzimas. Resultados similares se obtuvieron en otras especies fúngicas (Hrmova *et al.*, 1991; Alconada y Martínez, 1994; Peltonen *et al.*, 1994). Las enzimas son liberadas al medio durante la fase de crecimiento activo del micelio, demostrando que son realmente enzimas extracelulares, y no una liberación enzimática típica de la fase de autólisis, como ocurre en otros microorganismos (Martínez *et al.*, 1982).

4.2.2. Efecto de la fuente de carbono.

Con el objetivo de estudiar si la fuente de carbono usada en el medio de cultivo afecta la producción de endoxilanasas y β -xilosidasa, se probaron diferentes fuentes (mono, di y polisacáridos), utilizando asparagina como fuente de nitrógeno.



- Peso seco
- ◆- Proteína de micelio
- ×- Endoxilanasas
- ▲- β-xilosidasa

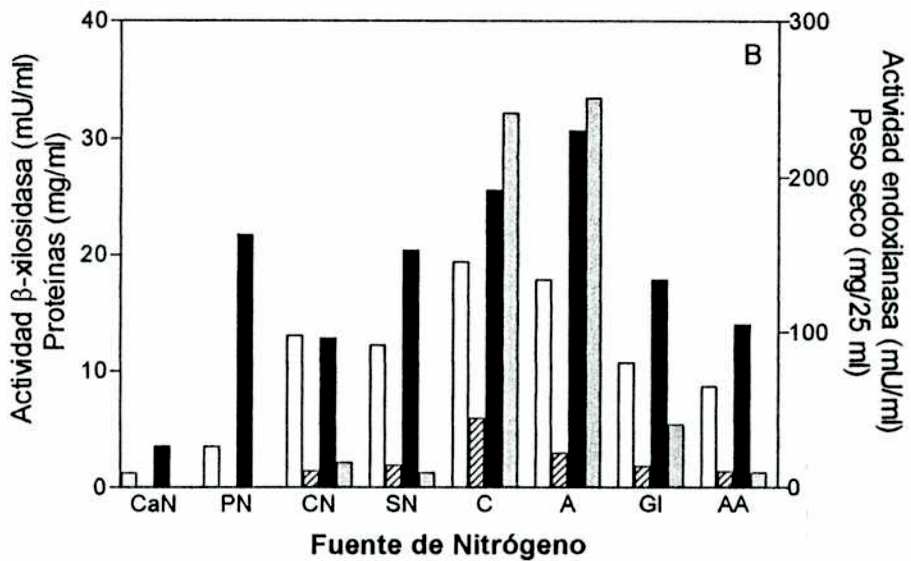
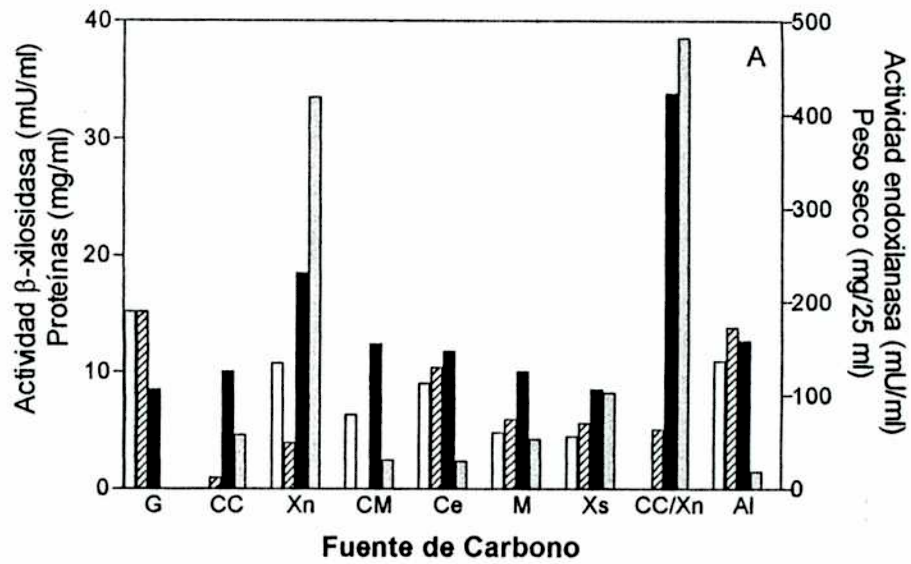
Figura R₁₁: Cinética de crecimiento y producción enzimática en un medio con xilano (10 g/l) como fuente de carbono y asparagina (4 g/l) como fuente de nitrógeno.

La cosecha del micelio (en éste y los siguientes experimentos) se realizó al día 15 de incubación, día en el cual, bajo las mismas condiciones se registró en promedio el mejor crecimiento y producción de xilanasas en el medio basal xilano/asparagina. Los resultados pueden observarse en la Fig. R_{12A}. Los mayores crecimientos (medidos como mg de proteínas intracelulares) se obtuvieron con glucosa, almidón y celobiosa. El crecimiento fue mínimo cuando las fuentes utilizadas fueron celulosa cristalina o carboximetilcelulosa. Como se explicó previamente, el menor crecimiento registrado respondería al hecho de que son polímeros de lenta degradación. Adicionalmente, en el caso de la carboximetilcelulosa, altas concentraciones podrían resultar inhibitorias debido al bajo potencial agua de estos medios de cultivo. Con otras fuentes de carbono como xilano, maltosa, xilosa y celulosa cristalina/xilano; se obtuvieron crecimientos semejantes, intermedios entre ambos grupos mencionados.

Medir el crecimiento obtenido valorando las proteínas intracelulares parece más adecuado en este caso considerando que en fuentes tales como la celulosa cristalina, restos de sustrato quedan adsorbidos al micelio y por esa razón es difícil estimar el peso seco final del micelio.

Como puede observarse los altos niveles de producción enzimática detectados no siempre se correspondieron con rendimientos micelianos significativos. La mezcla xilano/celulosa cristalina resultó el sustrato más efectivo para producción de endoxilanasas y β -xilosidasas, seguido por xilano como única fuente de carbono. A pesar de los diferentes rendimientos en biomasa registrados en las restantes fuentes de carbono, todas ellas resultaron en una producción de endoxilanasas similar, mientras que con las otras fuentes de carbono se registró una actividad de β -xilosidasas de entre el 5 y el 25 % de la medida en el medio con xilano. En el medio con glucosa no se detectó actividad β -xilosidasas.

Celulasas y xilanasas están intrincadamente ligadas. Ambas clivan uniones β -1,4-glicosídicas por mecanismos catalíticos semejantes y están por eso íntimamente relacionadas a nivel funcional. Mas aún, con pocas excepciones los organismos capaces de degradar xilano son invariablemente celulolíticos y a menudo secretan complejas mezclas de celulasas y xilanasas concurrentemente (Biely, 1991).



▨ Proteína de micelio
 □ Peso seco
 ■ Endoxilanasa
 ▤ β -xilosidasa

Figura R₁₂: Efecto de la fuente de carbono (A) y nitrógeno (B) sobre el crecimiento y la producción de enzimas xilanolíticas por *T. troglia*. (A) Usando asparagina como fuente de nitrógeno, las fuentes de carbono probadas fueron: G: glucosa; CC: celulosa cristalina; Xn: xilano; CM: carboximetilcelulosa; Ce: celobiosa; M: maltosa; Xs: xilosa; CC/Xn: xilano más celulosa cristalina; Al: almidón. (B) Con xilano como fuente de carbono, las fuentes de nitrógeno utilizadas fueron: CaN: carbonato de amonio; PN: fosfato de amonio; CN: cloruro de amonio; SN: sulfato de amonio; C: casaminoácidos; A: asparagina; GI: glicina; AA: ácido aspártico.

Adicionalmente la ruptura de las uniones β -1,4-glicosídicas dentro de la cadena principal del xilano puede ser también realizada por endoglucanasas bifuncionales que hidrolizan las uniones β -1,4 en la celulosa y el xilano con comparable facilidad. Por ejemplo los sistemas celulolíticos de *Trichoderma reesei* QM 9414 contienen dos grupos de glicanasas que exhiben actividad endoxilanasas: endo-1,4- β -xilanasas específicas y endo-1,4- β -glucanasas no específicas que hidrolizan tanto celulosa como xilano (Hrmova *et al.*, 1986). Finalmente la celulosa, el xilano y una variedad de sus catabolitos son todos aparentemente capaces de inducir la síntesis de ambas clases de enzimas en diversos microorganismos celulolíticos y xilanolíticos (Coughlan y Hazlewood, 1993).

Debido a lo expuesto anteriormente, elucidar el mecanismo de regulación de la síntesis de xilanasas resulta muy dificultoso y la generalización probablemente nunca sea posible debido a la diversidad de mecanismos de control celular (Biely, 1993; Coughlan y Hazlewood, 1993; Bajpai, 1997). Por ejemplo entre los hongos existen por un lado sólidas evidencias que indican que la regulación de la síntesis de xilanasas en ciertos organismos está estrechamente ligada a la de celulasas, y por otro lado diversos trabajos sugieren que puede existir inducción específica de la síntesis de enzimas xilanolíticas independientemente de la síntesis de celulasas. En forma similar se acepta en general que las xilanasas son inducibles, aunque una baja actividad resultante de síntesis constitutiva puede ser necesaria para generar inductores de bajo peso molecular a partir del xilano nativo (en particular xilobiosa y xilotriosa), ya que el xilano es un polímero complejo de alto peso molecular, incapaz de penetrar la célula fúngica (Hrmova *et al.*, 1991). Sin embargo se detectó producción de xilanasas por completo constitutiva en algunos microorganismos como *Phanerochaete chrysosporium* y *Heterobasidion annosum* (Copa-Patiño *et al.*, 1993; Coughlan y Hazlewood, 1993; Maijala *et al.*, 1995). En ambos casos la síntesis puede ser reprimida por fuentes de carbono fácilmente metabolizables o por uno de los productos finales de la hidrólisis del xilano: la xilosa (Bajpai, 1997). La regulación de las enzimas involucradas en la degradación del xilano, no ha sido aún objeto de un detallado estudio en hongos lignocelulolíticos. El sistema parece ser inducible en todos los organismos estudiados (Biely, 1985), pero existen

diferencias en la naturaleza del inductor (Warzywoda *et al.*, 1983; Hrmova *et al.*, 1986; Royer y Nakas, 1990). Para el estudio de la producción de xilanasas, los hongos se cultivan generalmente con xilano como fuente de carbono, sin embargo algunos producen mayores niveles de xilanasas cuando son cultivados en pulpa de madera en lugar de xilano puro (Saddler *et al.*, 1985; Royer y Nakas, 1989). En general cuando se usaron sustratos naturales como pulpa de madera, residuos de la industria del papel, etc. se obtuvo buena producción de xilanasas (Royer y Nakas, 1990; Peltonen *et al.*, 1994). Diversos datos sugieren que los mecanismos de regulación de las actividades celulolítica y xilanolítica están íntimamente relacionados, un hecho lógico considerando la estrecha asociación existente entre xilano y celulosa en la pared celular de los vegetales. Las mutaciones que afectan la actividad celulasa, a menudo afectan también a la actividad xilanasas. La actividad celulasa de *Trichoderma longibrachiatum* no se observó en ausencia de actividad xilanasas (Royer y Nakas, 1990). La generación de celulasas por *Trichoderma reesei* QM9414 se redujo cuando se removió el xilano de la pulpa de madera (Hrmova *et al.*, 1986). Algunos autores han postulado la existencia de un inductor de bajo peso molecular común a estos sistemas extracelulares degradativos producido a través de la actividad transglucosidasa que poseen las β -glucosidasas y también algunas xilanasas (Royer y Nakas, 1990). Sin embargo en *Aspergillus terreus* (Hrmova *et al.*, 1989), *Trichoderma reesei* QM9414 (Hrmova *et al.*, 1986) y *Trichoderma harzianum* ES8 (Senior *et al.*, 1989), la síntesis de celulasas y xilanasas demostró regularse independientemente. En el caso de *T. trogii*, la combinación xilano/celulosa cristalina resultó el sustrato más efectivo para producción de endoxilanasas y β -xilosidasa, seguido por xilano como única fuente de carbono. También Sivori *et al.* (1996) en *Ascobolus gamundii* indujeron la producción de xilanasas y celulasas, usando una única fuente de carbono (xilano o celulosa cristalina) o una combinación de ambas, encontrando mayor producción enzimática en este último caso, y Royer y Nakas (1990) en *Trichoderma longibrachiatum* indujeron la producción de celulasas y xilanasas usando xilobiosa sola o combinada con otra fuente: celobiosa, celopentaosa o lactosa y encontraron mayor producción de xilanasas usando las fuentes combinadas. Fuentes celulósicas de carbono como

la celulosa cristalina y la carboximetilcelulosa también indujeron actividad xilanasas en otros hongos, entre ellos: *Trichoderma harzianum* (Tan *et al.*, 1985), *Trichoderma koningii* (Huang *et al.*, 1991), *Fusarium oxysporum* (Yoshida *et al.*, 1989), *Dichomitus squalens* (Rouau y Odier, 1986), *Thermoascus aurantiacus* (Khandke *et al.*, 1989), *Ascobolus gamundii* (Sivori *et al.*, 1996) y *Penicillium funiculosum* (Seeta *et al.*, 1989). En particular en *Schizophyllum commune* la celulosa cristalina optimiza la producción de xilanasas (Baltrich *et al.*, 1993). Los hongos celolíticos frecuentemente producen altos niveles de celulasas y xilanasas cuando se los cultiva en sustratos naturales que contienen celulosa y xilano, pero pueden producir sólo xilanasas cuando se los cultiva sobre xilano (Coughlan y Hazlewood, 1993). Como se comprobó anteriormente la presencia de xilano en el medio de cultivo no reprime la síntesis de celulasas por *T. trogii*. Tomando en cuenta la actividad específica obtenida con las diferentes fuentes de carbono, expresada como el cociente entre producción enzimática y rendimiento miceliano (como proteína de micelio), la celulosa cristalina resultó el mejor inductor de la actividad endoxilanasas (cociente: 131.3 mU/mg), a pesar de no ser una buena fuente para el crecimiento de *T. trogii*. La combinación celulosa cristalina/xilano y el xilano sólo, también resultaron buenos inductores de la actividad endoxilanasas (cocientes: 83.2 y 69.1 respectivamente). El mejor inductor de la actividad β -xilosidasa resultó el xilano (8.5), seguido por la mezcla celulosa cristalina/xilano (7.6) y ésta última fuente sola (4.6). En contraste la glucosa resultó la mejor fuente para el crecimiento de *T. trogii*, pero en dicho medio no se detectó actividad β -xilosidasa y la actividad específica endoxilanasas fue muy pobre (cociente: 6.9). La actividad endoxilanasas parece ser por lo tanto, constitutiva en *T. trogii*. Recientemente también se reportó producción constitutiva de xilanasas en *Phanerochaete chrysosporium* (Copa-Patiño *et al.*, 1993), *Heterobasidion annosum* (Maijala *et al.*, 1995) y *Sclerotium rolfsii* (Sachslehner *et al.*, 1998).

4.2.3. Efecto de la variación de la concentración de la fuente de carbono.

El aumento en la concentración de xilano promovió el crecimiento y la producción de xilanasas (Fig. R_{13A}). La máxima actividad endoxilanasas se obtuvo con la mayor concentración de xilano utilizada, mientras que no se detectaron diferencias significativas en la producción de β -xilosidasa cuando se usaron 5 g/l o más de xilano en el medio de cultivo. Como en el caso de *T. trogii*, en *Trichoderma harzianum* (Senior *et al.*, 1989), la actividad específica y la cantidad de xilanasas producidas resultó dependiente de la concentración de xilano en el medio de cultivo.

4.2.4. Efecto de las fuentes nitrogenadas sobre la producción de xilanasas.

Entre las fuentes de nitrógeno ensayadas (Fig. R_{12B}), la asparagina y los casaminoácidos rindieron los mejores resultados tanto de crecimiento como de producción enzimática. Como se demostró previamente, estas fuentes resultaron también las mejores para producción de celulasas en un medio con celulosa cristalina como única fuente de carbono. El uso de sales de amonio de ácidos fuertes (sulfato y cloruro de amonio) resultó, probablemente debido a los valores más bajos de pH obtenidos en dichos medios (véase punto 4.2.5), en crecimientos mayores con respecto a los alcanzados en medios en los cuales se utilizaron sales de amonio de ácidos débiles (carbonato y fosfato). Entre las fuentes inorgánicas de nitrógeno probadas, el fosfato de amonio y el sulfato de amonio promovieron la mayor actividad endoxilanasas. La actividad específica endoxilanasas (producción de endoxilanasas *per* proteínas de micelio) resultó similar en todas las fuentes (aprox. 70 mU/mg) excepto en el caso de los casaminoácidos, donde fue significativamente menor (32). Utilizando fuentes orgánicas de nitrógeno se consiguieron valores más altos de actividad β -xilosidasa que con las fuentes inorgánicas.

4.2.5. Efecto de la temperatura y el pH sobre la producción enzimática.

Se estudió el efecto del pH del medio de cultivo sobre el crecimiento y la producción enzimática, en el medio xilano/asparagina, en un rango de valores de pH iniciales entre 2.7 y 7.4 (véase sección 3.3.2.1.d. de materiales y métodos). Durante

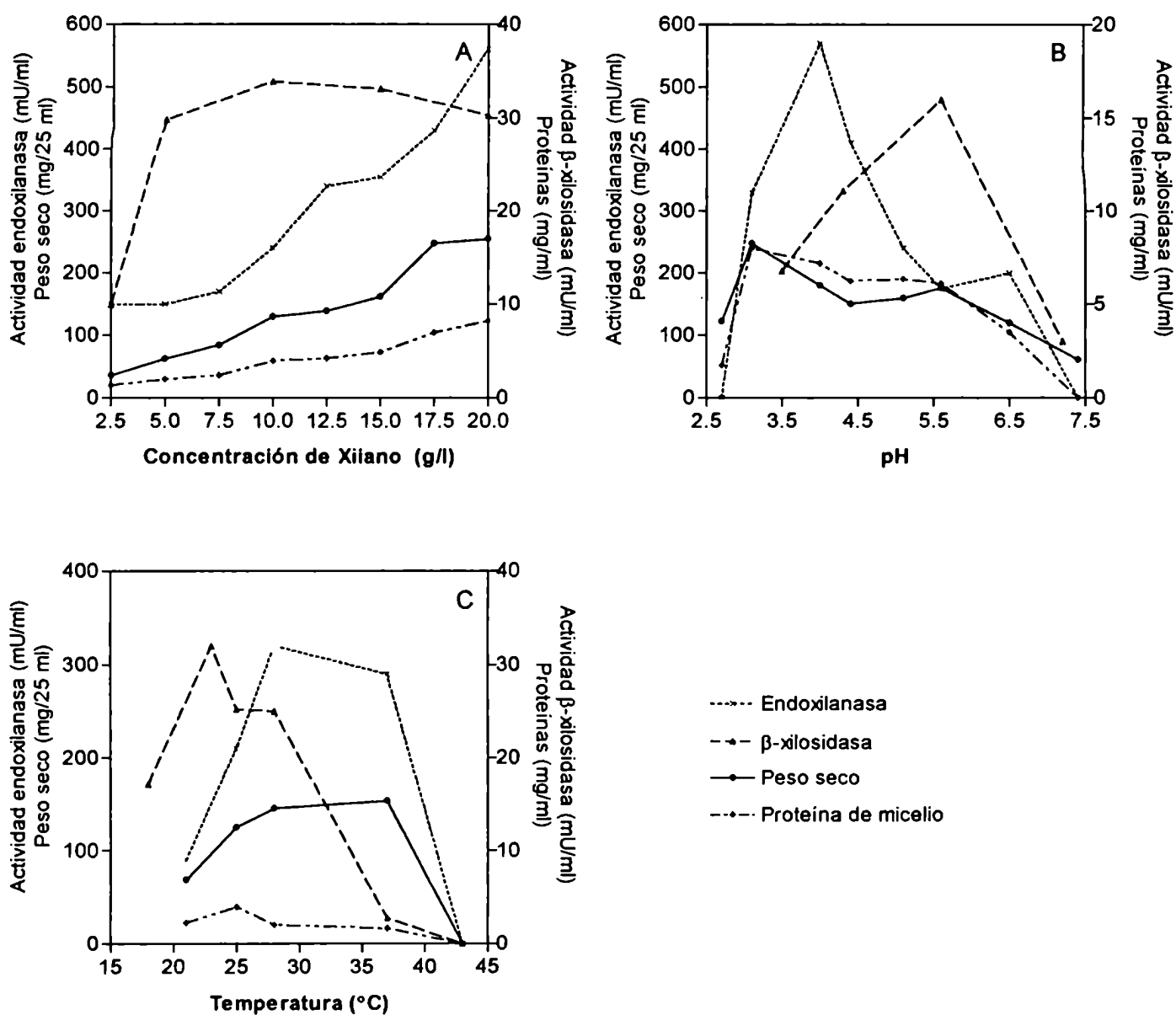


Figura R₁₃: **A**: Efecto de la concentración de xilano sobre el crecimiento y la producción enzimática, en un medio con asparagina como fuente de nitrógeno. Efecto del pH inicial (**B**) y la temperatura (**C**) sobre el crecimiento y la producción enzimática, luego de 15 días de incubación.

el período de incubación los valores de pH no mostraron cambios apreciables. Los mejores resultados de crecimiento, medido como peso seco o proteínas intracelulares, se obtuvieron a pH 3.1 (Fig. R_{13B}). El pH óptimo del medio para producción de endoxilanas resultó 4.0, aunque se detectó producción enzimática entre pH 3.1 y 6.5. La mayor actividad β -xilosidasa se obtuvo a pH 5.5. Valores bajos de pH en general promovieron el crecimiento miceliano y la actividad xilanolítica. Valores ácidos de pH resultaron también los más favorables para la síntesis de xilanasas por *Aspergillus fumigatus* (Bailey y Viikari, 1993). Se cultivó a *T. trogii* en el medio xilano/asparagina, a distintas temperaturas entre 18 y 43 °C. *T. trogii* fue capaz de crecer en un amplio rango de temperaturas como lo muestra la figura R_{13C}. En el rango entre 23 y 28 °C se obtuvieron los mayores crecimientos y mejor producción de ambas enzimas (la máxima producción de endoxilanas fue 320 mU/ml a 28 °C y la máxima de β -xilosidasa 33.5 mU/ml a 23 °C). También temperaturas cercanas a los 30 °C resultaron óptimas para la producción de enzimas xilanolíticas por *Aspergillus ochraceus* (Biswas *et al.*, 1988). Temperaturas más altas de incubación (hasta 37 °C) no afectaron el crecimiento de *T. trogii* (aprox. 150 mg/25 ml a 37 °C) ni la producción de endoxilanas (290 mU/ml a dicha temperatura), pero sí redujeron la actividad β -xilosidasa (2.82 mU/ml a 37 °C). A 43 °C no se registró crecimiento.

4.2.6. Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad enzimática.

Se midieron las actividades enzimáticas entre 30 y 80 °C (en buffer acetato de sodio 50mM pH 5.5) y a distintos valores de pH (por disolución de los sustratos respectivos en buffer citrato fosfato 50 mM entre pH 2.5 y 7.4) (véase sección 3.7. de materiales y métodos). El pH óptimo de ensayo para la actividad endoxilanas fue 5.0 (Fig. R_{14A}), pero la enzima resultó activa entre pH 3.1 y 7.4. El pH óptimo de ensayo para la actividad β -xilosidasa fue 5.5. La temperatura óptima para ambas actividades fue 50 °C (Fig. R_{14B}). Es interesante que a 70 °C la actividad β -xilosidasa detectada correspondió a un 70% de la máxima. Las xilanasas producidas por una amplia variedad de hongos y bacterias mesofílicas usualmente muestran

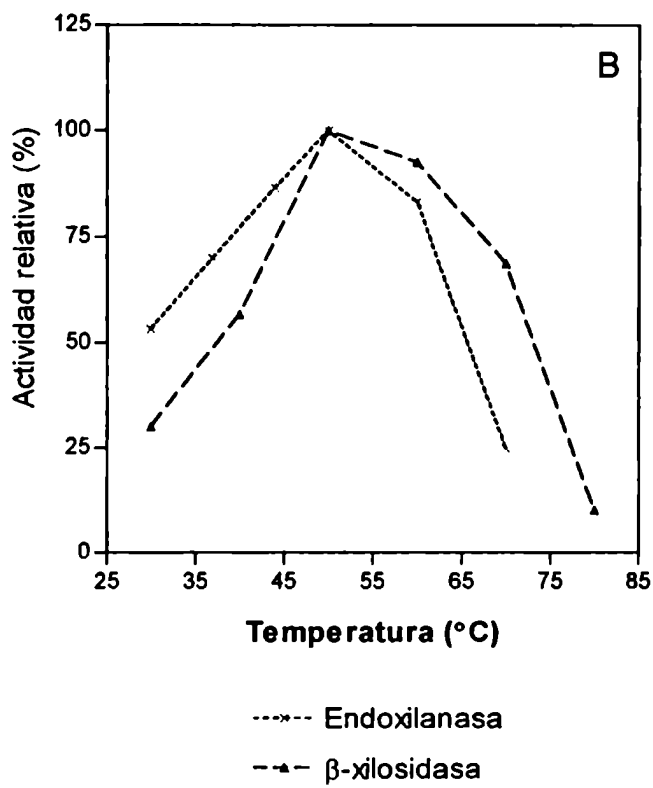
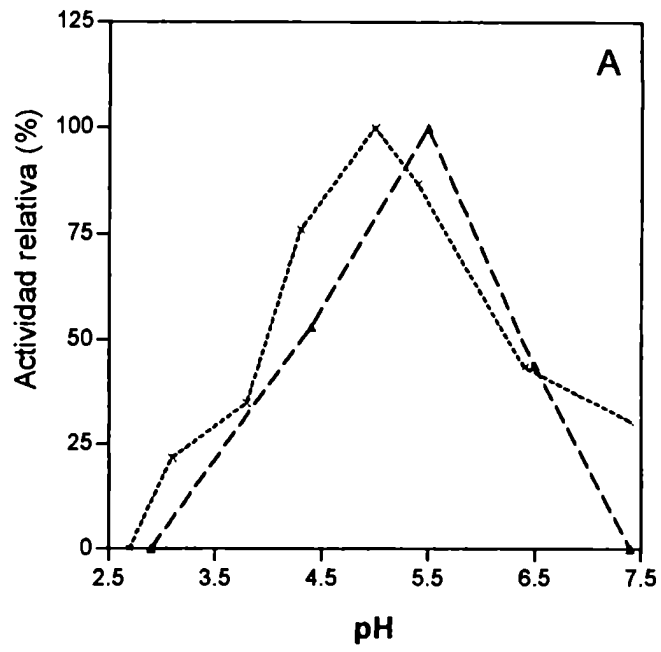


Figura R₁₄: Efecto del pH (A) y la temperatura (B) sobre las actividades enzimáticas de endoxilanasas y β -xilosidasas. Se usaron sobrenadantes de cultivos incubados 15 días.

óptimos de actividad enzimática alrededor de los 50 °C y un gran número de xilanasas aisladas de diferentes hongos poseen óptimos de pH en un rango ácido-neutro (Dekker y Richards, 1976; Wong, 1988; Eriksson *et al.*, 1990; Archer y Wood, 1995). Ambas actividades exhibieron pues propiedades catalíticas comparables, con respecto a temperatura y pH óptimos de reacción, con las enzimas xilanolíticas de otros organismos, como *Fusarium oxysporum* SUF850 (Yoshida *et al.*, 1989), *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (Alconada y Martínez, 1994), *Trichoderma harzianum* (Tan *et al.*, 1985), *Trichoderma lignorum* (John y Schmidt, 1988), *Trichoderma viride* (Ujhe *et al.*, 1991), *Trichoderma koningii* G-39 (Huang *et al.*, 1991), *Thermoascus aurantiacus* (Khandke *et al.*, 1989), *Aspergillus niger* (Kitpreechavanich *et al.*, 1986), *Bipolaris sorokiniana* (Peltonen *et al.*, 1994) y *Helminthosporium turcicum* (Degefu *et al.*, 1995).

La aplicación en la industria de la pulpa y el papel de xilanasas, requiere que éstas estén prácticamente libres de celulasas, ya que las enzimas celulosíticas afectan la calidad del producto (Buchert *et al.*, 1994). La producción mayoritaria, alternativa, de celulasas o xilanasas puede lograrse manipulando el medio de cultivo; aunque resulta dificultoso evitar por completo la producción de la actividad enzimática indeseada (Hrmova *et al.*, 1986; Royer y Nakas, 1990; Gameraith *et al.*, 1992). Es interesante por ello destacar que cultivando a *T. troglia* en un medio con cloruro de amonio como fuente de nitrógeno no se detectó actividad endoglucanasa ni exoglucanasa y la actividad β -glucosidasa fue mínima (Fig. R_{2A}), en cambio sí se valoró actividad xilanolítica (principalmente endoxilanasas) (Fig. R_{12B}); asimismo valores de pH iniciales del medio de alrededor de 3 permiten el crecimiento del hongo y producción de enzimas xilanolíticas, pero no de celulasas (Figs. R_{13B} y R_{9C,D}).

4.3. PECTINASAS.

4.3.1. Cinética de crecimiento y producción enzimática con diferentes fuentes de carbono.

Se estudió la producción *in vitro* de pectinasas extracelulares en un medio sintético con pectina (10 g/l) como fuente de carbono y asparagina (4 g/l) como fuente de nitrógeno (pH inicial del medio: 3.4 ± 0.1) (véase sección 3.3.2.1. de materiales y métodos).

T. trogii fue capaz de crecer en dicho medio (Fig. R_{15A}), y produjo un complejo enzimático extracelular capaz de degradar las uniones α -1,4 de la pectina hidrolíticamente y por un mecanismo de trans-eliminación. Bajo las condiciones del ensayo se valoraron actividades polimetilgalacturonasa, poligalacturonasa y pectin liasa, pero no se detectó actividad pectato liasa (Fig. R_{15B}). Muchos hongos y bacterias fitopatógenos producen enzimas degradadoras de pectina (poligalacturonasas y liasas) cuando son cultivadas en un medio con pectina (Crawford y Kolattukudy, 1987), pero entre los patógenos vegetales que promueven pectinólisis, los hongos en general secretan pectin liasas, mientras que las bacterias producen predominantemente pectato liasas (Pitt, 1988). Sin embargo pectato liasas han sido detectadas en cultivos de diversos hongos, entre otros, *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (Crawford y Kolattukudy, 1987), *Neurospora crassa* (Polizeli *et al.*, 1991), *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* (Perez Artes y Tena, 1990) y *Alternaria alternata* (Vazquez *et al.*, 1985). En *Penicillium italicum* (Alaña *et al.*, 1990) la producción de pectato liasas resultó dependiente de la composición del medio de cultivo, en un medio con pectina no se detectó actividad, y sí en un medio con salvado de trigo. *Penicillium frequentans* (Said *et al.*, 1991; Siessere *et al.*, 1992) produjo pectato liasa y pectin liasa sólo cuando se lo cultivó en medios con pH inicial de entre 6 y 8. También en el caso de *T. trogii* la producción de enzimas pectinolíticas se mostró dependiente de la composición del medio y de las condiciones de cultivo (Figs. R_{16,17,18,19}).

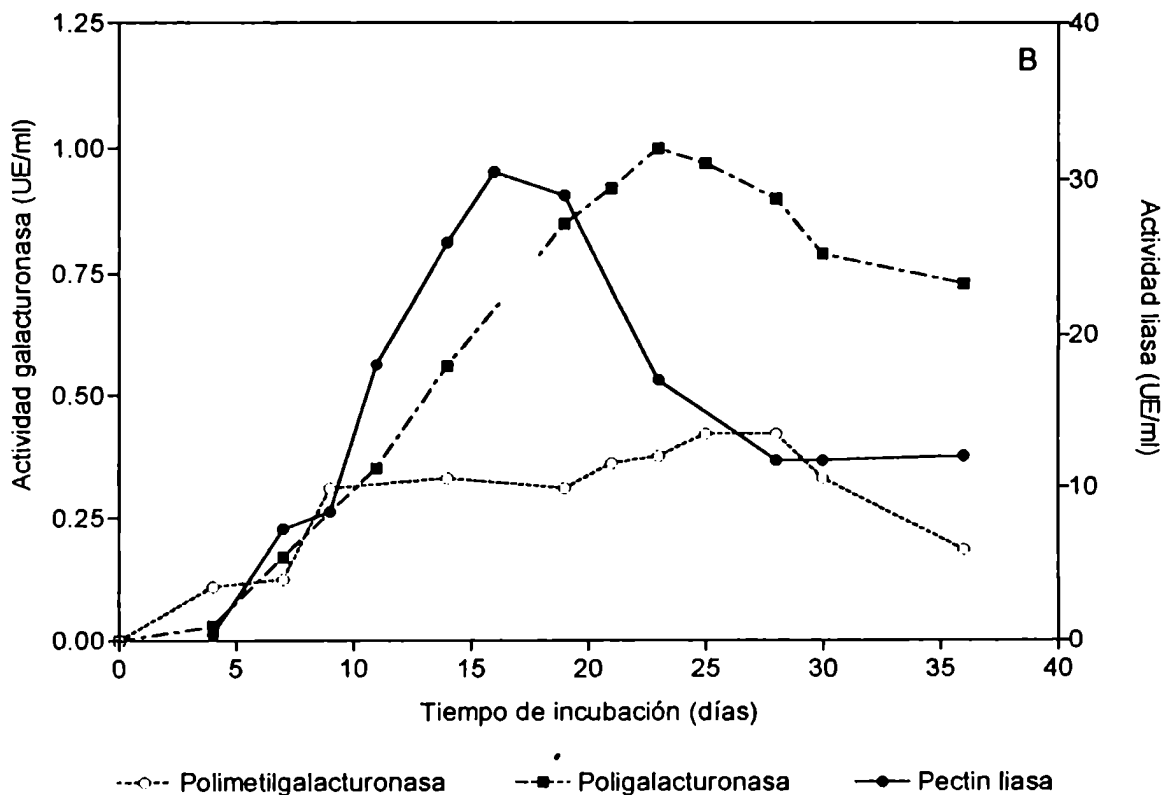
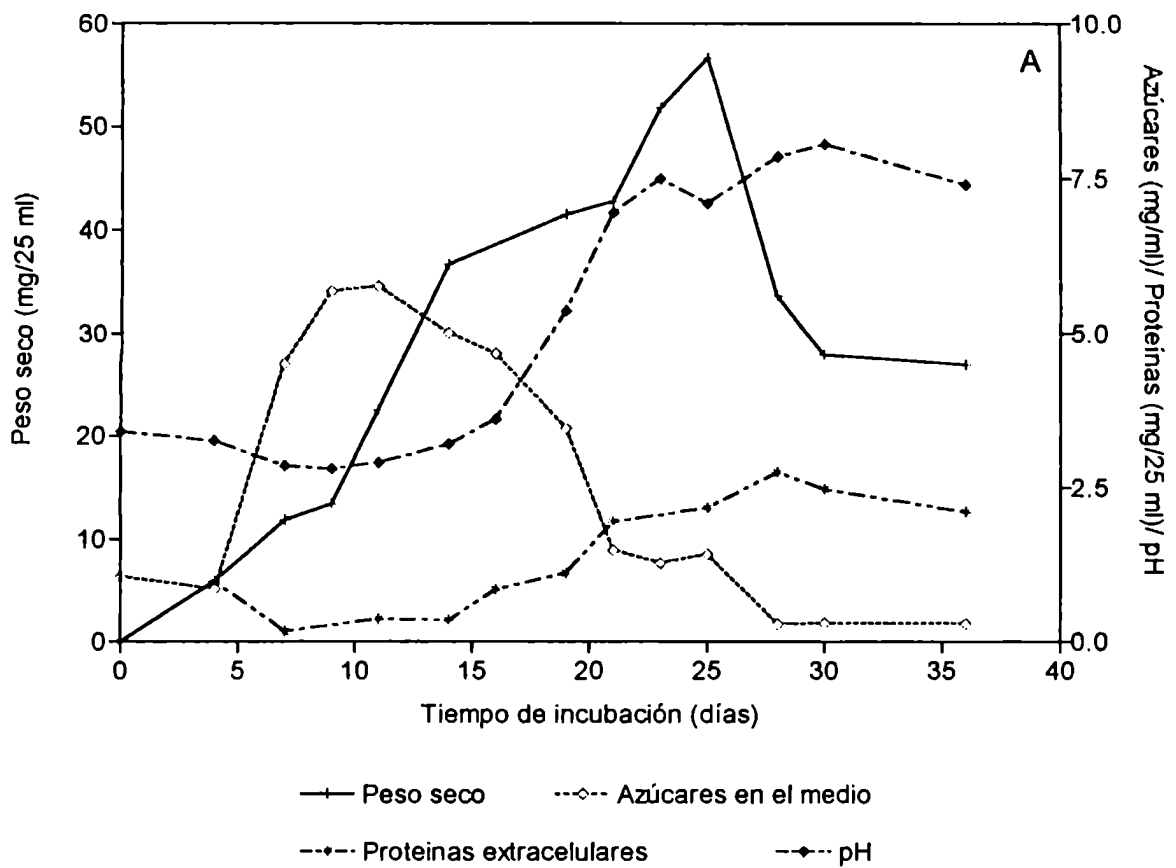


Figura R₁₅: Cinética de crecimiento (A) y producción de pectinasas (B) en un medio con pectina (10 g/l) como fuente de carbono y asparagina (4 g/l) como fuente de nitrógeno.

La fuente de carbono componente del medio de cultivo afecta la producción de enzimas pectinolíticas en diversos hongos, entre ellos: *Cercospora arachidicola* (Alabi y Naqui, 1977), *Colletotrichum lindemuthianum* (Hugouvieux *et al.*, 1997), *Aspergillus niger* (Solis-Pereyra *et al.*, 1993), *Penicillium italicum* (Alaña *et al.*, 1990), *Penicillium citrinum* (Olutiola y Akintunde, 1979), *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (Crawford y Kolattukudy, 1987), *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Patil y Dimond, 1968), *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaeidis* (Osagie y Obuekwe, 1991) y *Aureobasidium pullulans* (Biely *et al.*, 1996).

La cinética de crecimiento y producción de enzimas pectinolíticas, con diferentes fuentes de carbono y asparagina como fuente de nitrógeno, puede observarse en la Fig. R₁₆.

En todos los medios ensayados se verificó un aumento en el pH del medio durante el período de incubación: desde valores de pH iniciales de entre 3-4.5 (excepto por el medio con glucosa, cuyo pH inicial fue 6.4), hasta pHs finales de alrededor de 8 (Fig. R_{16C}). Incrementos en los valores de pH del medio de cultivo luego de transcurrido un cierto tiempo de incubación en medios con diferentes fuentes de carbono han sido también reportados en *Heterobasidion annosum* (Johansson, 1988; Maijala *et al.*, 1995), *Schizophyllum commune* (Haltrich *et al.*, 1993), *Fusarium oxysporum* (Osagie y Obuekwe, 1991; Fernandez *et al.*, 1993) y *Phanerochaete chrysosporium* (Bonnarme *et al.*, 1993; Lestan *et al.*, 1994).

En general el pico de producción enzimática coincidió con el día de máximo crecimiento. Las enzimas fueron co-inducidas, alcanzando sus máximos niveles alrededor del día 15, disminuyendo posteriormente. Excepcionalmente en el medio con pectina (10 g/l), la máxima producción de pectin liasa (día 15) precedió a la mayor producción de galacturonasas que coincidió con el pico de crecimiento (medido como peso seco del micelio) en dicho medio (días 22-25) (Fig R₁₅). En contraste en *Rhizoctonia solani* (Lisker *et al.*, 1975) el pico de producción de poligalacturonasa precedió al de pectin liasa. En *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*, cultivado en un medio con glucosa/pectina, el pico de producción de poligalacturonasa coincide con el de crecimiento, no la pectin liasa que aparece en autólisis (Martinez *et al.*, 1991). La misma relación entre la fase de crecimiento y

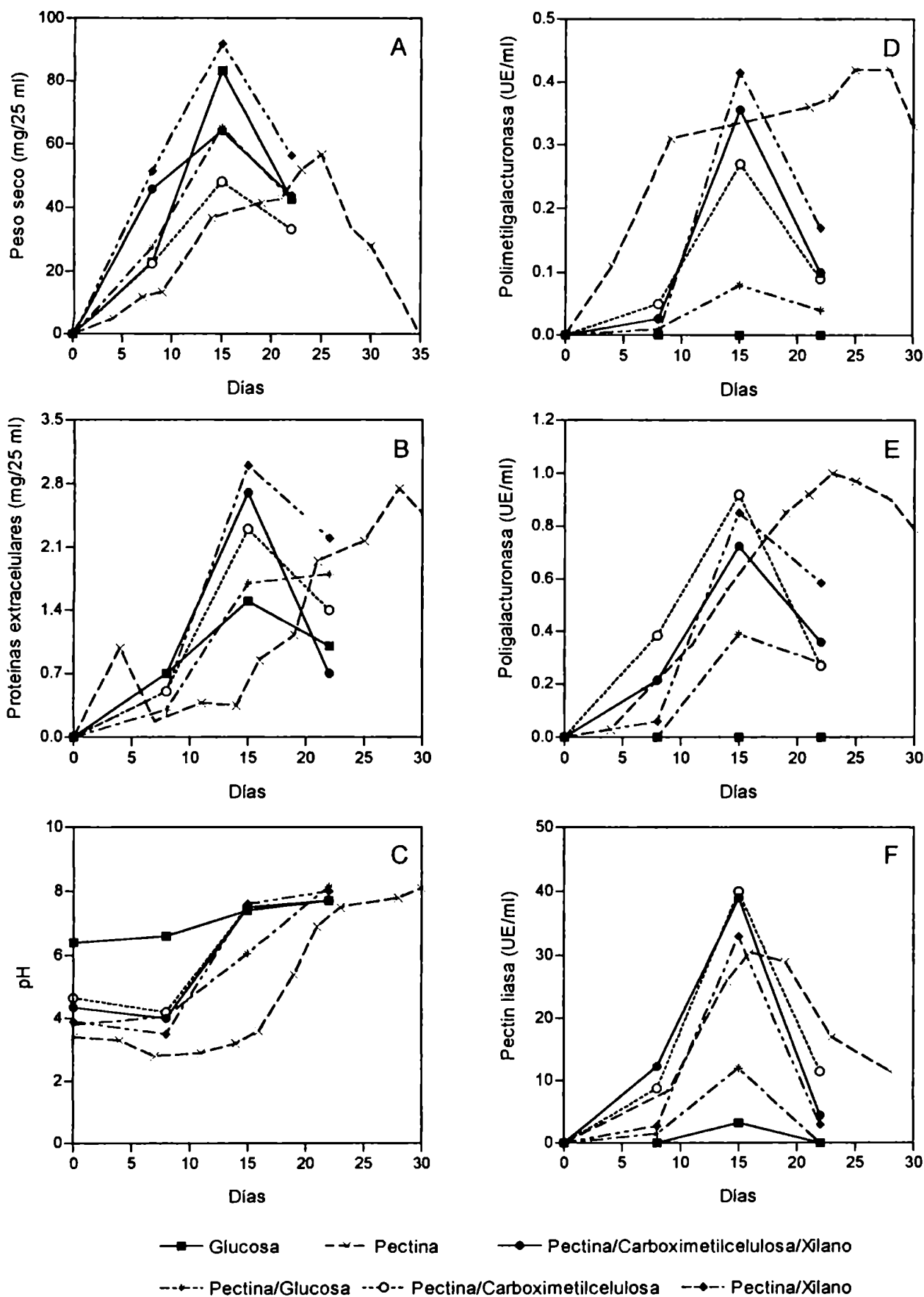


Figura R₁₆: Efecto de distintas fuentes de carbono sobre la cinética de crecimiento y producción enzimática en un medio con asparagina como fuente de nitrógeno. **A**: Crecimiento medido como peso seco. **B**: Proteínas extracelulares. **C**: Variación del pH. **D**: Actividad polimetilgalacturonasa. **E**: Actividad poligalacturonasa. **F**: Actividad pectin liasa.

los máximos niveles de hidrolasas y liasas se encontró previamente también en *Botrytis cinerea* (Leone y van den Heuvel, 1987). En *Botrytis cinerea* se valoraron actividades polimetilgalacturonasa, poligalacturonasa y pectin liasa, en medios con glucosa y pectina, o sin esta última, pero en un medio con pectina las máximas actividades enzimáticas se detectaron en cultivos más jóvenes (Martinez *et al.*, 1988). En *T. trogii* las diferentes combinaciones de fuente de carbono utilizadas, no variaron el día en que se obtuvo el pico de producción enzimática, pero sí lo modificó la concentración de pectina presente en el medio (Fig. R₁₇).

Los mayores crecimientos se obtuvieron con la combinación pectina/xilano, seguidos por glucosa como única fuente de carbono. Sin embargo en el medio con glucosa no se detectó actividad galacturonasa y fue mínima la producción de pectin liasa. Incluso el agregado de glucosa al medio con pectina redujo marcadamente la síntesis enzimática (el efecto represor de la glucosa se observa también en la secreción de proteínas extracelulares).

El agregado de xilano produjo cambios significativos en el crecimiento (el peso seco en dicho medio resultó prácticamente el doble del obtenido con pectina), no así en la producción enzimática. Tampoco el agregado de carboximetilcelulosa o carboximetilcelulosa /xilano produjeron cambios significativos en los máximos de producción de las tres enzimas valoradas.

Resultados similares se obtuvieron en *Neurospora crassa* (Polizeli *et al.*, 1991): la presencia de glucosa reprime la síntesis de poligalacturonasa, pectin liasa y pectato liasa que es inducida por pectina, en cambio otras fuentes de carbono, incluidas xilano y carboximetilcelulosa, no ejercieron efecto alguno sobre dichas actividades enzimáticas.

Se citan en la literatura numerosos ejemplos de represión por glucosa de la síntesis de enzimas pectinolíticas: en *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* la síntesis de poligalacturonasa es reprimida por el agregado de glucosa al medio de cultivo conteniendo pectina (Patil y Dimond, 1968), en *Aspergillus niger* la glucosa reprime la síntesis de polimetilgalacturonasa y la represión se revierte cuando se agrega AMP cíclico al medio de fermentación (Angelova *et al.*, 1987), la síntesis de poligalacturonasas en *Aspergillus niger* es reprimida por glucosa durante los

procesos de transcripción y traducción (Kerzezs, 1955; Torakazu *et al.*, 1975). En *Fusarium moniliforme* la represión por glucosa de la síntesis de poligalacturonasa también es a nivel transcripcional (De Lorenzo *et al.*, 1987), en *Colletotrichum lindemuthianum* el agregado de glucosa al medio impide la expresión del gen para endopoligalacturonasa (Hugouvieux *et al.*, 1997), en *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* en un medio con glucosa no hay transcripción del gen que codifica para la actividad pectato liasa; con pectina y glucosa presentes en el medio, el gen se comienza a transcribir sólo después de que la glucosa ha sido totalmente consumida (Gonzalez-Candelas y Kolattukudy, 1992). Resulta interesante señalar que la glucosa reprime el efecto inductor del ácido galacturónico, pero no el de la galactosa en *Sclerotinia sclerotiorum* (Fraissinet-Tachet y Fevre, 1996), el efecto inductor de la galactosa tampoco resultó represible por glucosa en *Neurospora crassa* (Polizeli *et al.*, 1991).

En los hongos fitopatógenos las enzimas pécticas pueden sintetizarse de modo constitutivo o inducible, pero la presencia de sustratos que contienen pectina en el medio aumenta en general su producción, y su síntesis está sujeta a represión catabólica (Collmer y Keen, 1986; De Lorenzo *et al.*, 1987; Leone y van den Heuvel, 1987; Fraissinet-Tachet y Fevre, 1996). Las poligalacturonasas de *Botrytis cinerea* (Leone y van den Heuvel, 1987; Martinez *et al.*, 1988), *Aspergillus* sp. (Aguilar y Huitron, 1990), *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaedis* (Osagie y Obuekwe, 1991), *Rhizoctonia solani* (Lisker *et al.*, 1975), *Penicillium citrinum* (Olutiola, 1982) y ciertas isoformas de *Sclerotinia sclerotiorum* (Fraissinet-Tachet y Fevre, 1996) y de *Penicillium frequentans* (Fonseca y Said, 1995), constituyen ejemplos de enzimas constitutivas; en cambio las poligalacturonasas de *Fusarium moniliforme* (De Lorenzo *et al.*, 1987) y *Aureobasidium pullulans* (Biely *et al.*, 1996), así como la pectin liasa de *Penicillium citrinum* (Olutiola y Akintunde, 1979) y la pectato liasa de *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* (Crawford y Kolattukudy, 1987), no se detectaron en medios con glucosa y si se producen en medios con pectina.

Dado que la pectina no puede entrar en la célula, se ha sugerido que productos de bajo peso molecular derivados de su hidrólisis (como el ácido galacturónico)

pueden servir como inductores (Cooper, 1983). El ácido galacturónico induce la síntesis de pectinasas en diversos hongos: *Botrytis cinerea* (Leone y van den Heuvel, 1987), *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 (Aguilar y Huitron, 1990), *Sclerotinia sclerotiorum* (Fraissinet-Tachet y Fevre, 1996), *Corticium rolfsii* (Tagawa y Kaji, 1988), en cambio en *Aspergillus nidulans* (Dean y Timberlake, 1989) en un medio con ácido galacturónico no hay producción de enzimas pectinolíticas, y en *Aspergillus* sp. (Aguilar y Huitrón, 1986), dependiendo de la concentración, actúa como inductor o represor de la síntesis enzimática.

A diferencia de lo ocurrido con las actividades galacturonásicas que no se detectaron en un medio con glucosa, haciendo crecer a *T. trogii* en dicho medio, se detectó una baja síntesis de pectin liasa, lo que sugiere que esta enzima es constitutiva. En un medio con pectina los valores de actividad pectin liasa medidos, resultaron marcadamente mayores. Las pectinasas constitutivas son producidas en bajas cantidades por el hongo y su síntesis se incrementa luego de una inducción con el sustrato específico (Blais *et al.*, 1992). Dos mecanismos de regulación se cree ocurren durante la secreción de poligalacturonasas por hongos fitopatógenos (i) la enzima es específicamente inducida por el sustrato (por ejemplo pectina), o (ii) la enzima es constitutiva pero su expresión está restringida por la presencia de azúcares simples (represión catabólica) (Mahn *et al.*, 1989; Peretto *et al.*, 1993; Solis- Pereyra *et al.*, 1993; Biely *et al.*, 1996; Hugouvieux *et al.*, 1997). Ambas posibilidades podrían aplicarse a *T. trogii*.

4.3.2. Cinética de crecimiento y producción enzimática con diferentes concentraciones de pectina.

Diferentes concentraciones de pectina (entre 2.5 y 15 g/l) se probaron en un medio de cultivo con asparagina (4 g/l) como fuente de nitrógeno (Fig. R₁₇).

En concentraciones de pectina de hasta 5 g/l el máximo de crecimiento se registró al día 15 de incubación, en coincidencia con las máximas actividades enzimáticas medidas. En cambio con concentraciones mayores de la fuente carbonada, el máximo de crecimiento se obtuvo más tardíamente, al día 22 de incubación.

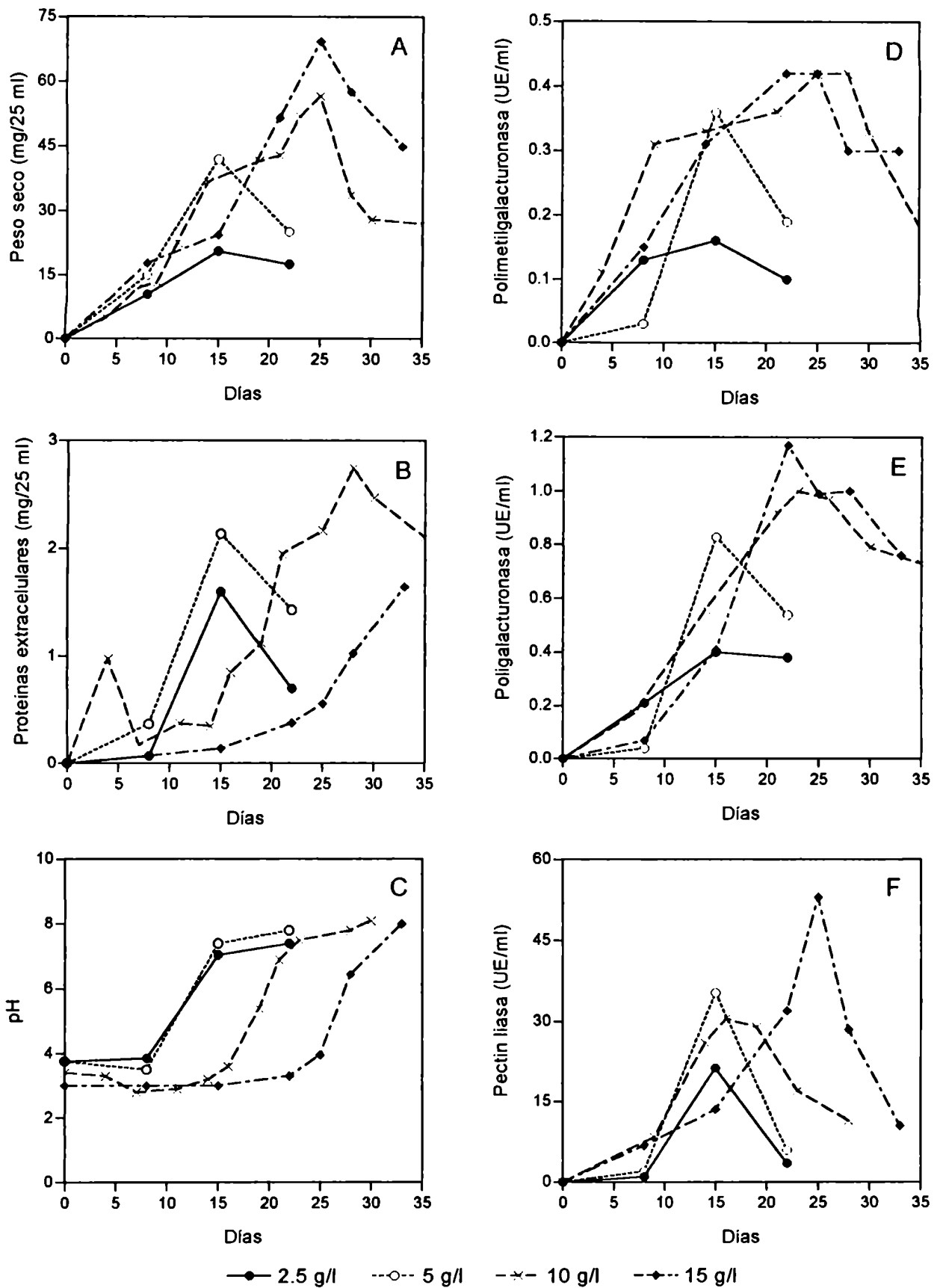


Figura R₁₇: Efecto de distintas concentraciones de pectina sobre la cinética de crecimiento y producción enzimática en un medio con asparagina como fuente de nitrógeno. **A**: Crecimiento medido como peso seco. **B**: Proteínas del sobrenadante. **C**: Variación del pH durante el período de incubación. **D**: Actividad polimetilgalacturonasa. **E**: Actividad poligalacturonasa. **F**: Actividad pectin liasa.

También coincidieron los picos de crecimiento con los de producción enzimática, salvo en el caso de la pectin liasa en un medio con 10 g/l de pectina cuya máxima actividad se valoró al día 15 de incubación.

En general el aumento en la concentración de pectina estimuló el crecimiento y la producción enzimática. Pero mientras que la productividad total de galacturonasas resultó similar con 10 o 15 g/l de pectina (no así de pectin liasa que resultó superior utilizando 15 g/l), las mayores actividades específicas (actividad enzimática *per* microgramos de proteínas extracelulares) se detectaron utilizando 15 g/l, debido a la menor cantidad de proteínas totales secretadas por el hongo durante su crecimiento en dicho medio. En todas las concentraciones ensayadas (salvo pectina 15 g/l), el medio se alcalinizó notoriamente durante el transcurso de la incubación. Se citan otros ejemplos en la bibliografía, en los cuales la concentración del sustrato afectó la producción de enzimas pectinolíticas, tal es el caso de la pectin liasa de *Penicillium citrinum* (Olutiola y Akintunde, 1979) en un medio con distintas concentraciones de pectina, las actividades poligalacturonasa, polimetilgalacturonasa, pectin liasa y pectato liasa de *Alternaria alternata* (Vazquez *et al.*, 1985), también en medios con concentraciones crecientes de pectina, y las actividades poligalacturonasa y polimetilgalacturonasa de *Sclerotinia sclerotiorum* (Fraissinet-Tachet y Fevre, 1996) en medios con diversas concentraciones de ácido galacturónico. En todos estos casos sin embargo, se reportó inhibición en la síntesis de dichas actividades enzimáticas a concentraciones mayores de 10 g/l. Probablemente se desencadenaría un mecanismo de represión cuando la concentración del sustrato que normalmente actúa como inductor, excede la capacidad de utilización por parte del hongo (Fraissinet-Tachet y Fevre, 1996). En todos los medios estudiados el pH del medio de cultivo aumentó marcadamente durante el período de incubación (Fig. R_{17C}).

4.3.3. Efecto de diferentes fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento y la producción enzimática.

De las numerosas fuentes de nitrógeno probadas en estudios previos con *T. trogii*, casaminoácidos y asparagina entre las fuentes orgánicas, y fosfato y sulfato de amonio entre las inorgánicas, resultaron ser las mejores tanto para el crecimiento como para la producción de celulasas y xilanasas. Debido a ello en un medio con pectina como fuente de carbono, se estudió el efecto de estas fuentes de nitrógeno sobre la producción de pectinasas.

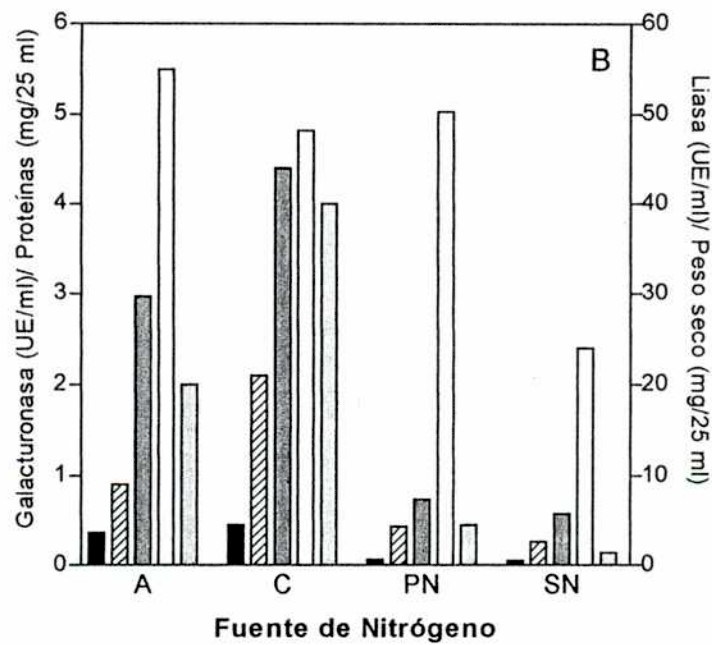
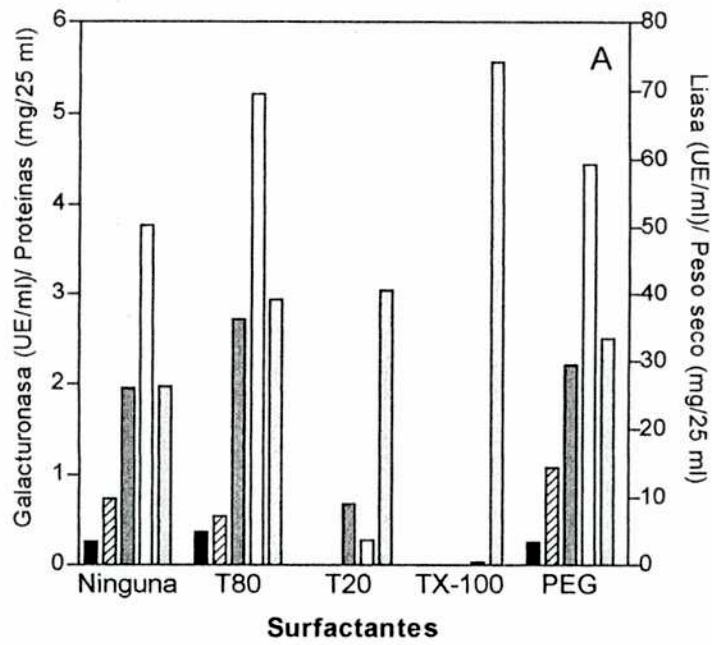
La cosecha del micelio se realizó a los 22 días de incubación, ya que en el medio pectina (10 g/l)/asparagina (4 g/l) el pico de crecimiento, así como la mayor producción de galacturonasas se registró alrededor de dicho día.

Los resultados se muestran en la figura R_{18B}.

A pesar de que se obtuvieron crecimientos comparables con tres de las fuentes ensayadas (casaminoácidos, asparagina y fosfato de amonio), los casaminoácidos resultaron la mejor fuente de nitrógeno para la producción de todas las enzimas valoradas, obteniéndose actividades enzimáticas de pectin liasa y poligalacturonasa significativamente mayores que utilizando asparagina como fuente nitrogenada; y semejantes de polimetilgalacturonasa. Con las fuentes inorgánicas utilizadas, la producción de proteínas extracelulares en general y de pectinasas en particular, resultó mucho menor a la obtenida con las fuentes orgánicas. Pero si se tiene en cuenta la actividad específica referida a las proteínas extracelulares (actividades específicas respectivamente de polimetilgalacturonasa, poligalacturonasa y pectin liasa: en asparagina: 4.5, 11.25, 371.25; en casaminoácidos: 2.75, 13, 275; en fosfato de amonio: 3.75, 26.75, 456.25; en sulfato de amonio: 12.5, 65, 1425 U.E./mg de proteína), utilizando fuentes inorgánicas de nitrógeno se obtuvieron mezclas proteicas más ricas en pectinasas, respecto de las otras fuentes.

4.3.4. Efecto de los surfactantes sobre el crecimiento y la producción enzimática.

Incrementos en la producción de enzimas extracelulares, como consecuencia del agregado de surfactantes al medio de cultivo, han sido reportados en diversas especies fúngicas (Reese y Manguire, 1969; Asther *et al.*, 1987; Okeke y Obi, 1993;



- Polimetilgalacturonasa
- Poligalacturonasa
- Pectin liasa
- Peso seco
- Proteínas extracelulares

Figura R₁₈: **A**: Efecto del Tween 80 (T80), Tween 20 (T20), Triton X-100 (TX-100) y PEG 6000 (PEG) sobre el crecimiento y la producción enzimática. **B**: Efecto de distintas fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento y producción de pectinasas, en un medio con pectina como fuente de carbono. Las fuentes de nitrógeno ensayadas fueron: PN: fosfato de amonio; SN: sulfato de amonio; C: casaminoácidos; A: asparagina.

Pardo, 1996). El efecto de los surfactantes ha sido atribuido a un aumento en la permeabilidad de la membrana celular (Reese *et al.*, 1969), y a la promoción de la liberación enzimática (Reese y Manguire, 1969).

Se estudió en el presente trabajo el efecto de diferentes surfactantes no iónicos (Tween 80, Tween 20, Triton X-100) y PEG 6000, sobre la producción de enzimas pectinolíticas por *T. trogii* (Fig. R_{18A}), en un medio con asparagina como fuente de nitrógeno y pectina como fuente de carbono. Los resultados expuestos corresponden a los valores registrados a los 22 días de incubación.

La adición de Tween 80 promovió el crecimiento y la mayor producción de pectin liasa y polimetilgalacturonasa. En general el efecto de los surfactantes sobre el crecimiento está descrito como inhibitorio, debido a una reducción del suministro de oxígeno (Hulme y Stranks, 1970), o a lo sumo, dependiendo de la especie y del surfactante, sin efecto sobre el crecimiento fúngico (Mercuri, 1987a; Yazdy *et al.*, 1990). Sin embargo en el caso de *T. trogii* el agregado de Tween 80 estimuló el crecimiento, este incremento podría deberse a un aumento en la permeabilidad de la membrana que permitiría un mejor aprovechamiento de los nutrientes del medio de cultivo, sin afectar en forma significativa la disponibilidad de oxígeno (Pardo, 1996). Parece razonable suponer que el aumento en los niveles enzimáticos detectados se debe simplemente al efecto estimulante del Tween 80 sobre la producción de biomasa. Sin embargo podrían también intervenir otros factores como el aumento en la permeabilidad de las membranas celulares y/o promoción de la liberación de enzimas ligadas a la célula. Estas dos últimas posibilidades estarían respaldadas por el hecho de que los cultivos en medio con Tween 80 resultaron en una producción de proteínas extracelulares 50% mayor que en el medio control. El agregado de Tween 80 al medio de cultivo estimuló en otros hongos la producción de celulasas (Reese y Manguire, 1969; Hung *et al.*, 1988; Long y Knapp, 1991; Pardo, 1996), xilanasas (Reese y Manguire, 1969) y lignin peroxidasa (Asther *et al.*, 1987; Janshekar y Fiechter, 1988; Rüttimann *et al.*, 1992a; Lestan *et al.*, 1994). La máxima producción de poligalacturonasa se logró con el agregado de PEG 6000. El agregado de Tween 20 y Triton X-100, provocó un aumento en la producción de proteínas extracelulares (55% con Tween 20 y 3 veces con Triton X-100), pero

inhibió la producción de pectinasas, probablemente debido al efecto inhibitorio que dichos surfactantes ejercieron sobre el crecimiento de *T. trogii*.

El agregado de Tween 20 y Triton X-100 también inhibió el crecimiento de *Nectria catalinensis* (Pardo, 1996), asimismo el Triton X-100 disminuyó el crecimiento en *Neurospora crassa* (Yazdy *et al.*, 1990). Una disminución en la provisión de oxígeno podría ser la causa de dicha merma en el crecimiento miceliano (Hulme y Stranks, 1970).

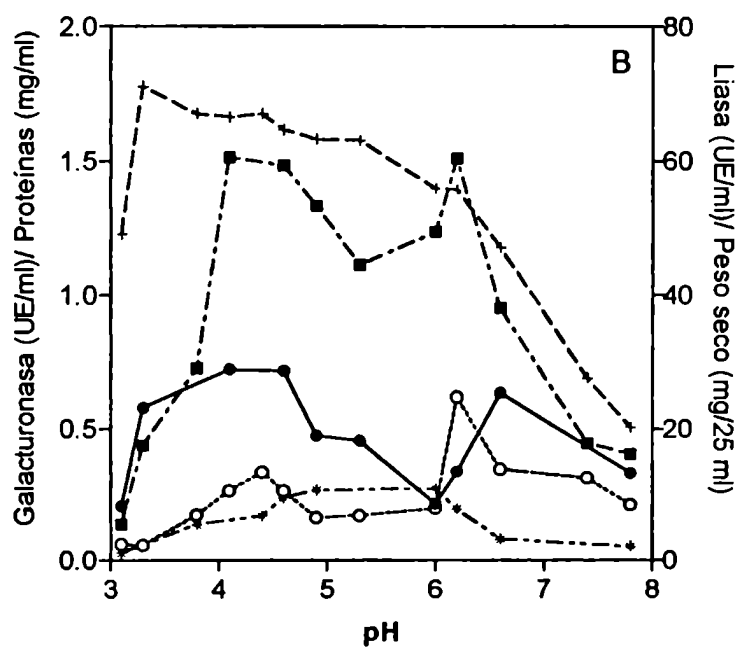
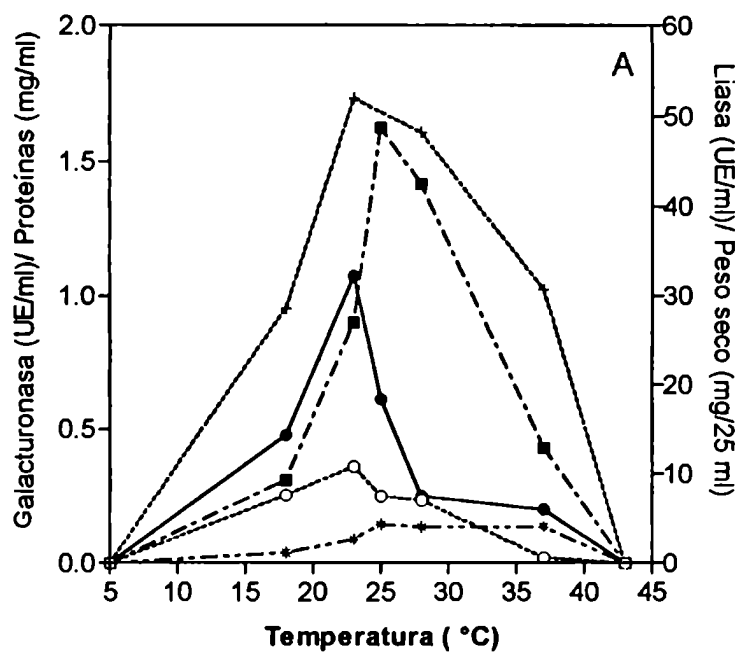
4.3.5. Efecto del pH inicial y la temperatura de incubación sobre la producción de pectinasas.

En estos ensayos se cultivó a *T. trogii* en el medio pectina/asparagina a distintas temperaturas entre 18 y 43 °C. Los resultados expuestos corresponden a los valores registrados a los 22 días de incubación.

Como se muestra en la figura R_{19A}, el hongo en estudio creció en un amplio rango de temperaturas, resultando las temperaturas óptimas para el crecimiento y la producción enzimática entre 23 y 28 °C. A 37 °C se obtuvo producción de poligalacturonasa y pectin liasa, no así de polimetilgalacturonasa. Resultados semejantes se obtuvieron en otras especies: la temperatura óptima para la producción de pectinasas resultó 25 °C para *Cercospora arachidicola* (Alabi y Naqui, 1977) y entre 30-35 °C para *Penicillium frequentans* (Said *et al.*, 1991). Las temperaturas óptimas para el crecimiento de *T. trogii* (23-28 °C) y producción de pectinasas, también lo son para la producción de celulasas y xilanasas (Figs. R_{9A,B}; R_{13C}).

Se estudió el efecto del pH inicial del medio sobre el crecimiento y la producción enzimática en el medio pectina/asparagina, pero en un rango de valores de pH entre 3.1 y 8.5 (véase materiales y métodos sección 3.3.2.1.d.) (Fig. R_{19B}).

T. trogii pudo crecer en los medios con pH inicial entre 3.1 y 7.8, pero los valores bajos de pH resultaron los más favorables para el crecimiento, obteniéndose el máximo de crecimiento a pH 3.3 y la mayor secreción de proteínas extracelulares entre pHs 5 y 6. Un máximo de actividad pectinolítica se detectó a pH 4.5, debido a



- +-- Peso seco
- +-- Proteínas extracelulares
- Pectin liasa
- Polimetilgalacturonasa
- Poligalacturonasa

Figura R₁₉: Efecto de la temperatura de incubación (A) y el pH inicial del medio de cultivo (B) sobre el crecimiento y la producción enzimática en un medio con pectina (10 g/l) como fuente de carbono y asparagina como fuente de nitrógeno.

la presencia de actividad galacturonasa y liasa. Estas actividades decrecieron a valores mayores de pH, pero aumentaron nuevamente a pHs 6.2 y 6.6. Podría tratarse de isoformas de las enzimas en estudio que presenten óptimos de actividad a distintos valores de pH. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Said *et al.* (1991) para las actividades polimetilgalacturonasa y pectinesterasa de *Penicillium frequentans*. Se ha demostrado en numerosos hongos y bacterias fitopatógenas la producción de múltiples isoformas de pectinasas (Bussink *et al.*, 1992; Caprari *et al.*, 1993; Stratilova *et al.*, 1993; Deising *et al.*, 1995; Fonseca y Said, 1995; Martel *et al.*, 1996). La producción de isoformas de las enzimas degradadoras de los componentes de la pared celular les confiere a dichos microorganismos flexibilidad y mayor capacidad adaptativa (Byrde, 1979). El balance entre isoformas de poligalacturonasa resulta afectado en *Sclerotinia sclerotiorum* (Waksman *et al.*, 1991) y *Penicillium frequentans* (Fonseca y Said, 1995) por las condiciones de cultivo.

Escasos trabajos registran el efecto del pH del medio de cultivo sobre la producción de pectinasas. La producción de poligalacturonasa por *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaedis* resultó óptima bajo condiciones alcalinas (pHs 7.1-8.4) (Osagie y Obuekwe, 1991), en cambio en *Aureobasidium pullulans* (Biely *et al.*, 1996) el pH óptimo para producción de poligalacturonasa resultó entre 5 y 6. Sherwood (1966) en *Rhizoctonia solani* asoció los altos niveles de pectin liasa también con la condición alcalina del medio. La pectin liasa de *Fusarium oxysporum* (Blais *et al.*, 1992) resultó apenas detectable a pH 4.5, aunque a este pH la poligalacturonasa de dicho hongo muestra el máximo de actividad, en cambio el máximo de actividad pectin liasa se detectó a pH 8. La pectin liasa es usualmente inducida a valores de pH entre 6.5 y 8 en otras especies (Perley y Page, 1971; Lisker *et al.*, 1975; Parini *et al.*, 1988; Said *et al.*, 1991; Blais *et al.*, 1992), sin embargo en *T. trogii* se obtuvo producción de pectin liasa, en un medio cuyo pH inicial era 3.3.

La descomposición de las paredes celulares de los vegetales durante la invasión de los tejidos y patogénesis, es una característica de numerosas enfermedades de las plantas causadas por hongos fitopatógenos. Estos hongos son capaces de producir

una gran variedad de enzimas degradadoras de la pared celular, tanto en cultivo como en tejidos vegetales atacados. Podrían constituir organismos ideales para producir enzimas útiles en procesos de bioconversión (Riou *et al.*, 1992). En este trabajo optimizamos diversas condiciones de cultivo que influyen sobre la producción *in vitro* de pectinasas por *T. trogii*. Como se comprobó previamente estas condiciones resultaron efectivas también para la producción de celulasas y xilanasas. La presencia de dichas actividades en los sobrenadantes de cultivo es importante por sus potenciales aplicaciones biotecnológicas (Fogarty y Kelly, 1983). La hidrólisis de celulosa y hemicelulosa en los residuos agrícolas de diverso origen es facilitada por inclusión de enzimas degradadoras de pectina, en las mezclas de sacarificación (Gillespie y Coughlan, 1989). La remoción de la pectina facilita a las enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas un mayor acceso a sus sustratos respectivos incrementándose así la conversión. Debido a ello un sistema enzimático extracelular fúngico capaz de sintetizar todas estas actividades enzimáticas sería particularmente útil en la conversión de la biomasa.

4.4. ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA DEGRADACION DE LIGNINA.

4.4.1. Cinética de crecimiento y producción enzimática en un medio sintético.

Se comenzó a analizar en *T. trogii* el sistema enzimático involucrado en la degradación de lignina utilizando un medio sintético (véase sección 3.3.2.1. de materiales y métodos) con glucosa (10 g/l) como fuente de carbono y asparagina (0.5 g/l) como fuente de nitrógeno. Se seleccionó dicho medio, porque permite el crecimiento de *T. trogii* (Levin *et al.*, 1992), y con el objetivo de lograr que en lo posible la concentración de nitrógeno fuera limitante (condición que favorece la aparición de actividad ligninolítica y de glucosa oxidasa en *Phanerochaete chrysosporium* (Kirk *et al.*, 1978; Kelley y Reddy, 1986)). Se utilizaron Erlenmeyers de 250 ml con 25 ml de medio para aumentar la relación

superficie/volumen del medio de cultivo, ya que la concentración de oxígeno también afecta la degradación de lignina, pero más que su concentración en la atmósfera, sería su difusión en el medio de cultivo, el principal factor limitante de la síntesis de ligninasas (Rothschild *et al.*, 1995).

Se analizó la presencia en los sobrenadantes de cultivo de *T. trogii* de: lignin peroxidasa, Mn-peroxidasa, peroxidasa Mn-independiente, lacasa, y glioxal oxidasa y se estudió en extractos libres de células la producción de glucosa oxidasa intracelular. Se valoraron dichas actividades enzimáticas a lo largo del ciclo de crecimiento vegetativo de *T. trogii*, determinándose en forma paralela el crecimiento como peso seco del micelio, pH y glucosa residual en el medio (Fig. R₂₀). En las condiciones descritas se observó que *T. trogii* crece en forma exponencial hasta aproximadamente el día 12° de cultivo (Fig. R_{20A}). A medida que el hongo crece se registra una disminución en el pH del medio (alcanzándose el mínimo valor al día 18° de incubación) y luego un aumento del mismo en la fase de autólisis (Fig. R_{20A}). La concentración de glucosa residual en el medio de cultivo se pudo correlacionar con las variaciones observadas en el peso seco del micelio (Fig. R_{20B}). Como puede observarse, al agotarse la fuente de carbono (glucosa) e iniciarse la fase de metabolismo secundario del hongo, aparecen las actividades lignin peroxidasa, Mn-peroxidasa, peroxidasa Mn-independiente y glucosa oxidasa (Fig. R_{20C,F,D,H}). Esto coincide con lo verificado previamente en *Phanerochaete chrysosporium* y otros Basidiomycetes causantes de pudrición blanca estudiados (Kelley y Reddy, 1986; de Jong *et al.*, 1994a; Peláez *et al.*, 1995), aunque no en todos, ya que a pesar de que la ligninólisis ocurre durante la fase de metabolismo secundario en respuesta a la falta de nutrientes (Boominathan y Reddy, 1992), ocasionalmente, la producción de enzimas ligninolíticas por hongos de pudrición blanca se detectó también durante el metabolismo primario (Buswell *et al.*, 1995; Eggert *et al.*, 1996b).

En *T. trogii* las actividades lacasa y glioxal oxidasa no se limitan a la fase de metabolismo secundario (Fig. R_{20E,G}). La actividad glioxal oxidasa ha sido detectada en sobrenadantes de cultivo de *Phanerochaete chrysosporium* (Kersten y Kirk, 1987) y otros Basidiomycetes causantes de pudrición blanca (Orth *et al.*,

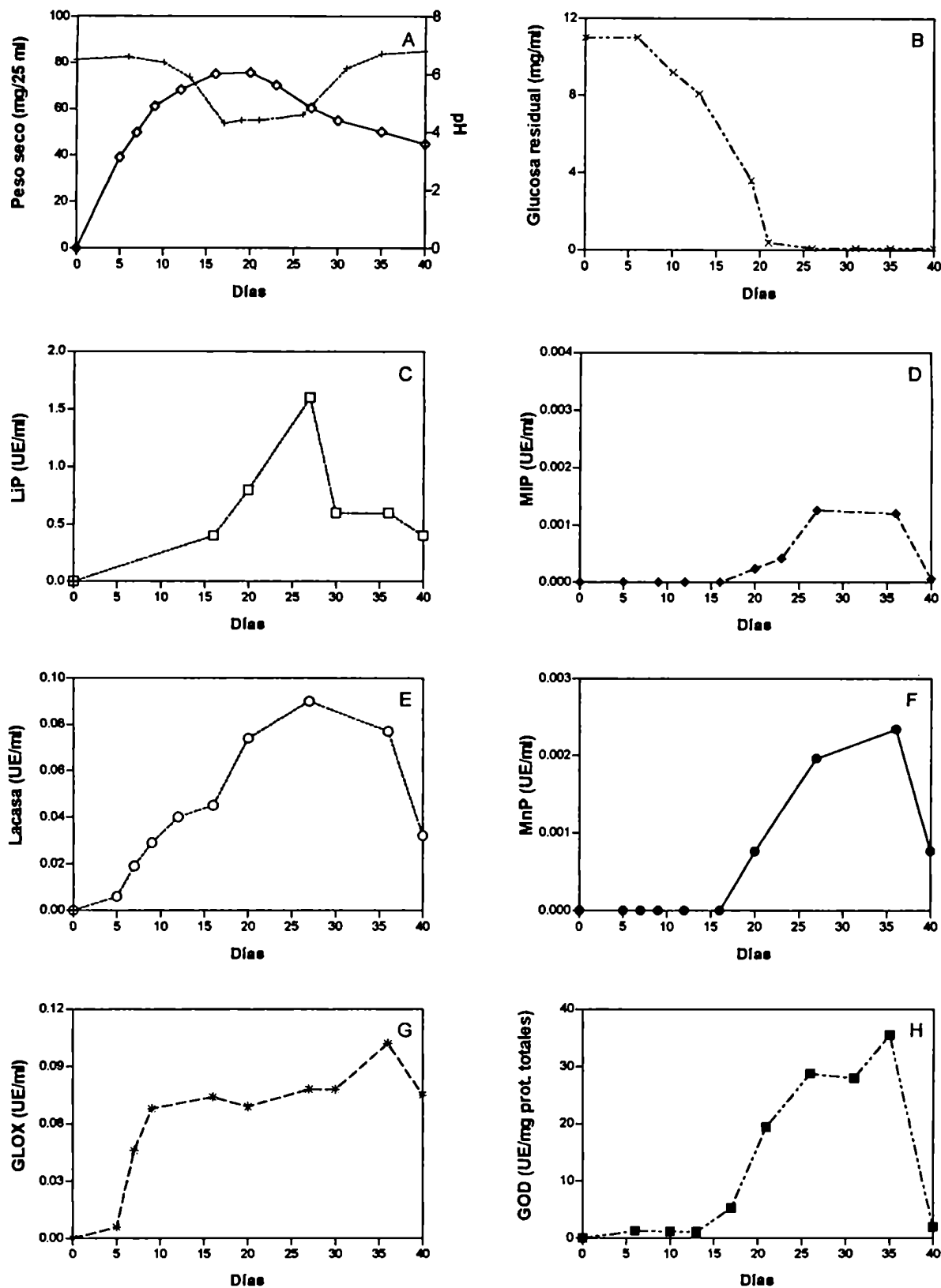


Figura R₂₀: Cinética de crecimiento y actividad enzimática en un medio sintético con glucosa (10 g/l) como fuente de carbono y asparagina (0.5 g/l) como fuente de nitrógeno. A: Peso seco (◇) y variación del pH (+). B: Glucosa residual. C: Lignin peroxidasa. D: Peroxidasa Mn-independiente (MIP). E: Lacasa. F: Mn-peroxidasa (MnP). G: Glioxal oxidasa (GLOX). H: Glucosa oxidasa (GOD).

1993). Esta enzima tiene una amplia especificidad de sustrato y oxida aldehidos simples, α -hidroxicarbonil y compuestos α -dicarbonil, en particular glioxal y metilglioxal; mientras que los carbohidratos (glucosa, xilosa, galactosa, celobiosa) no son sustratos para la glioxal oxidasa (Kersten y Kirk, 1987). El ciclo catalítico de la glioxal oxidasa ha demostrado estar íntimamente ligado con el de la lignin peroxidasa, en la oxidación de un compuesto modelo de lignina β -O-4 (Hammel *et al.*, 1994), lo que indica que esta enzima productora de H_2O_2 cumpliría un importante rol en la depolimerización de lignina. Es producida durante el metabolismo secundario, y es activada por lignin peroxidasa más alcohol veratrílico (Kersten y Kirk, 1987; Kurek y Kersten, 1995).

La actividad lacasa por el contrario no se limita a esa fase del metabolismo y es secretada por diversos hongos bajo una variedad de condiciones (Leonowicz *et al.*, 1978). En *Pycnoporus cinnabarinus* la lacasa fue producida constitutivamente durante el metabolismo primario (Eggert *et al.*, 1996b). La lacasa parece ser secretada en *Phlebia brevispora* en ciclos (Rüttimann *et al.*, 1992a). La lacasa que es producida por la mayoría de los hongos de pudrición blanca (de Jong *et al.*, 1994b; Hatakka, 1994), es la enzima que actúa en el proceso de biodegradación de lignina más comúnmente producida por los hongos de pudrición blanca pertenecientes a las Polyporaceae, y muchas especies secretan considerables niveles de esta enzima en cultivos líquidos (Peláez *et al.*, 1995). Vares y Hatakka (1997) detectaron recientemente en otra cepa de *T. trogii*, en un medio líquido sintético adicionado con veratril alcohol, actividades lacasa, Mn-peroxidasa, lignin peroxidasa y glioxal oxidasa; y comprobaron que *T. trogii* es capaz de mineralizar y solubilizar lignina sintética (DHP). En cambio, la producción de peroxidasa Mn-independiente y de glucosa oxidasa por *T. trogii*, se reporta por primera vez en el presente trabajo.

Recientemente se han descrito peroxidasas diferentes de la lignin peroxidasa y de la Mn-peroxidasa, a menudo llamadas peroxidasas Mn-independientes (MIP) en diferentes hongos de pudrición blanca: entre otros *Bjerkandera* sp., *Junghuhnia separabilima*, *Coriolopsis polyzona*, *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor* (Waldner *et al.*, 1988; Lobarzewski, 1990; de Jong *et al.*, 1992; Vares *et al.*, 1992;

Vyas *et al.*, 1994; Novotny *et al.*, 1997), los roles que dichas enzimas pueden cumplir en el proceso de biodegradación de lignina son todavía desconocidos. Las glucosas oxidasas están ampliamente distribuidas entre los hongos de pudrición blanca (Volc *et al.*, 1985; Daniel *et al.*, 1994; Schafer *et al.*, 1996; Zhao y Janse, 1996). En *Phanerochaete chrysosporium* se verificó una correlación temporal entre la actividad ligninolítica, la producción de H₂O₂ y la actividad de glucosa oxidasa, ya que en todos los casos se encontraron asociadas con la fase de metabolismo secundario (Forney *et al.*, 1982; Eriksson *et al.*, 1986; Kelley y Reddy, 1986). Mutantes de *Phanerochaete chrysosporium* glucosa oxidasa negativos (obtenidos por exposición de los conidios a radiación U.V.) no eran capaces de degradar la lignina sintética, mientras que los revertantes glucosa oxidasa positivos recuperaron su habilidad para degradar la lignina (Ramasamy *et al.*, 1985). Aunque descritas como enzimas intracelulares (Eriksson *et al.*, 1986; Kelley y Reddy, 1986), se detectó en sobrenadantes de cultivo la presencia de glucosa-1-oxidasa (Golovleva *et al.*, 1986) y de glucosa 2-oxidasa (Daniel *et al.*, 1992; 1994). La distribución en el espacio periplásmico (es decir en la interfase membrana-pared celular fúngica) y extracelular de la glucosa 2-oxidasa (Daniel *et al.*, 1994) coincide con la reportada previamente para la Mn-peroxidasa y la lignin peroxidasa de *Phanerochaete chrysosporium* (Daniel *et al.*, 1990). Estos resultados indican que la actividad glucosa oxidasa juega un rol importante en el proceso de degradación de lignina. Además de proveer H₂O₂ para las reacciones de ligninólisis, otro posible rol de la glucosa oxidasa podría ser su colaboración con la lacasa para mantener un ciclo glucosa:quinona oxidorreductasa, para prevenir la espontánea repolimerización de las quinonas formadas durante la ligninólisis (Szklarz y Leonowicz, 1986). Las glucosas oxidasas producidas por diferentes hongos se utilizan en diversas industrias. Debido a su modo de acción selectivo, las glucosas oxidasas han sido usadas como agentes catalíticos en la industria química en la síntesis de carbohidratos de importancia económica. El principal uso de la glucosa oxidasa es en tecnología alimentaria, como un antioxidante natural para extraer el azúcar de los huevos antes de su deshidratación y para remover el oxígeno de alimentos y bebidas. También se las ha aplicado en química clínica y en monitoreo de procesos

industriales. La importancia biotecnológica de las glucosas oxidasas se refleja en la existencia de una amplia literatura sobre patentes de estas enzimas (Schafer *et al.*, 1996).

4.4.2. Cinética de producción enzimática en un medio seminatural.

El agregado de aserrín (1 g por Erlenmeyer) al medio estimuló notablemente la producción de todas las enzimas valoradas (Fig. R₂₁): la producción de lignin peroxidasa fue 50% mayor, la actividad lacasa aumentó aproximadamente 20 veces, la actividad Mn-peroxidasa 106 veces, la actividad peroxidasa Mn-independiente 60 veces y la glioxal oxidasa alrededor de 30 veces (con respecto a los resultados obtenidos en el medio sintético glucosa/asparagina). Los picos de producción de todas las enzimas resultaron coincidentes, registrándose el máximo de producción al día 21 de incubación.

Se sabe que entre los más eficientes inductores de enzimas ligninolíticas se cuentan las preparaciones de lignina y los compuestos aromáticos. Por ejemplo se reportó inducción por lignina de lacasa en *Heterobasidion annosum* (Haars y Hüttermann, 1983) y por ácido verátrico en *Phlebia radiata* (Rogalski y Leonowicz, 1992). La lacasa de *Trametes versicolor* es inducida a nivel de transcripción génica por dos compuestos aromáticos: 2,5-xylidine y 1-hidroxibenzotriazole (Collins y Dobson, 1997). Ácidos aromáticos de bajo peso molecular como el ferúlico, verátrico y gálico, que están estructuralmente relacionados con la lignina también inducen la producción de lacasa por diferentes hongos (Collins y Dobson, 1997). La adición de ácido verátrico y alcohol veratrílico al medio sintético, estimuló en otra cepa *T. trogii* respectivamente la producción de lignin peroxidasa y lacasa (Vares, 1996). La adición de paja de trigo-algodón al medio de cultivo líquido aumentó 10 veces la producción de lacasa e incrementó la decolorización del poly-B por *Pleurotus pulmonarius* (Masaphy y Levanon, 1992). El agregado de alcalilignina a un medio sintético líquido con glucosa y tartrato de amonio, incrementó 6 veces la producción de lacasa por *Pleurotus eryngii* (Muñoz *et al.*, 1997).

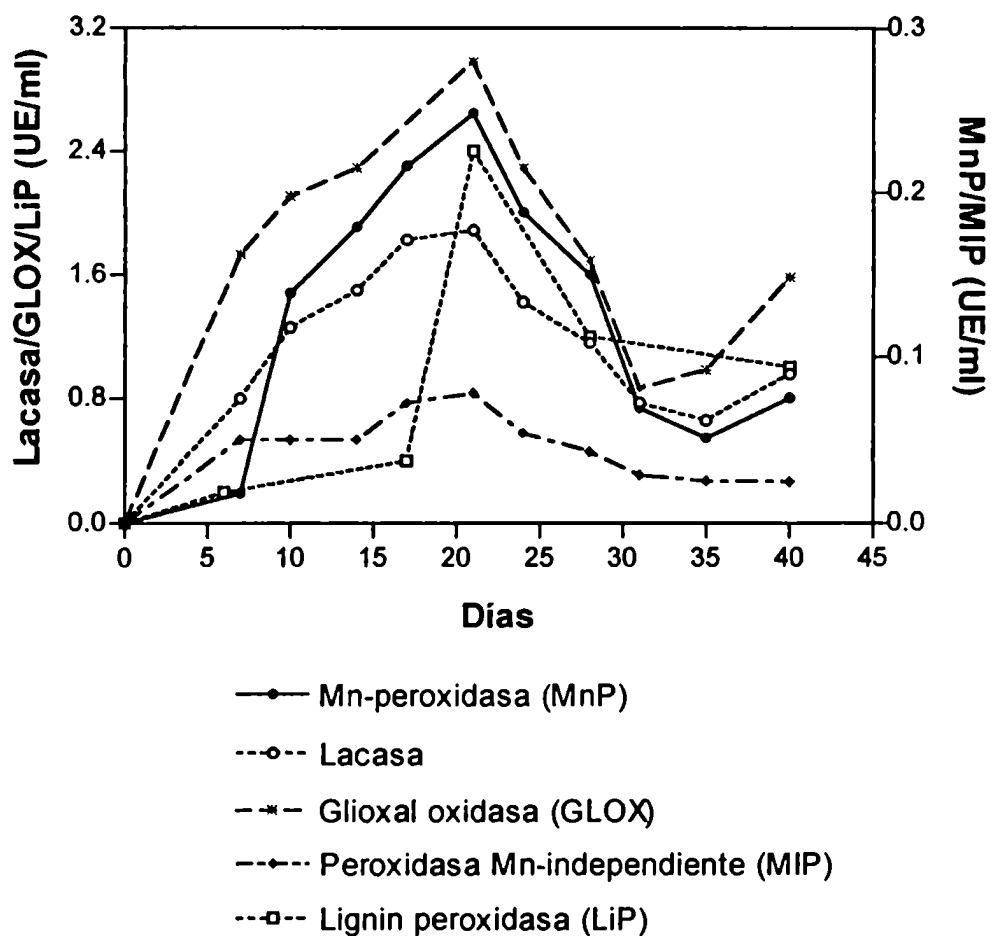


Figura R₂₁: Cinética de producción de enzimas involucradas en la degradación de lignina por *T. trogl* cultivado en un medio seminatural con glucosa (10 g/l), asparagina (0.5 g/l) y aserrín (40 g/l).

Cuando *Phanerochaete chrysosporium* crece en pulpa de madera como fuente de carbono la enzima ligninolítica producida más abundantemente es la Mn-peroxidasa (Datta *et al.*, 1991). La presencia de paja u otros metabolitos en el medio de cultivo indujo la producción de altos niveles de Mn-peroxidasa en *Pleurotus sp.* (Lang *et al.*, 1996), en *Trametes versicolor* y en *Coriolopsis polyzona* (Vyas *et al.*, 1994). La presencia de pulpa y/o iones Mn(II) en el medio aumentó también la producción de Mn-peroxidasa en *Trametes versicolor* (Paice *et al.*, 1993). La producción de Mn-peroxidasa por *T. trogii* también resultó estimulada por altas concentraciones de Mn en presencia de un quelante (Vares y Hatakka, 1997).

Una mezcla de peroxidasa, celulasa y glucosa oxidasa de *Trametes versicolor* demostró ser capaz de solubilizar lignocelulosa (Lobarzewski y Paszczynski, 1985). La presencia de dichas enzimas en cultivos en medio líquido de *T. trogii*, ha sido comprobada en nuestro laboratorio.

Debido a la variedad de actividades enzimáticas involucradas en la degradación de lignina detectadas en *T. trogii* y los altos títulos registrados para algunas de ellas (del orden de los citados para activos degradadores de lignina tales como *Phanerochaete chrysosporium* (Kelley y Reddy, 1986; Rothschild *et al.*, 1995), *Ceriporiopsis subvermispota* (Tapia y Vicuña, 1995) y *Trametes versicolor* (Collins y Dobson, 1997)), se podría considerar que la cepa BAFC 463 de *T. trogii* constituye una buena fuente para la obtención de los sistemas enzimáticos empleados en distintos procesos de bioconversión.

4.5. ENSAYOS DE PUDRICIÓN *IN VITRO* DE MADERA DE SALICACEAS.

Se describen diferentes estadios del deterioro causado por *T. trogii* en madera de *Populus sp.* y *Salix sp. in vitro*. Se estudiaron las pérdidas de peso seco, como así también los principales caracteres anatómicos de diagnóstico (estructurales y ultraestructurales). La metodología empleada se detalla en la sección 3.8. de materiales y métodos.

4.5.1. Pérdida de peso seco.

La pérdida de peso seco (biomasa) constituye una de las medidas más frecuentemente usadas para medir la capacidad de deterioro.

Como puede observarse (Fig. R₂₂), ambos tipos de madera perdieron porcentajes similares de peso durante los diferentes períodos de incubación. Entre los 4 y 6 meses decrece la velocidad de degradación. Resultados similares fueron obtenidos en ensayos de degradación *in vitro* de madera de salicáceas utilizando otras especies de Basidiomycetes (Job y Wright, 1986; Job y Rajchenberg, 1988). La pérdida de peso seco (a los 6 meses) fue de alrededor del 55 % en los dos casos. De acuerdo al criterio de Findlay (1967), ambas maderas no son resistentes al ataque por este hongo (pérdida de peso superior al 30 %). Lopez y Deschamps (1978) y Anselmi y Nicolotti (1988), informaron resultados similares usando otros aislamientos de *T. trogii* en ensayos de pudrición *in vitro* de madera de álamo.

4.5.2. Anatomía normal de la madera.

La anatomía normal de ambas maderas estudiadas, presenta como principales características: anillos de crecimiento distinguibles, porosidad difusa, vasos solitarios y agrupados en patrones radiales múltiples de 2-4 elementos (Fig. R_{23A}; Fig. R_{26A}). Placas de perforación simple y entre los vasos puntuaciones areoladas alternas. Fibras abundantes. Parénquima axial escaso, marginal o terminal. Radios uniseriados, homocelulares en *Populus* sp. y heterocelulares en *Salix* sp. (Fig. R_{26B,C}).

4.5.3. Morfología del deterioro.

Aunque no se detectaron diferencias significativas en los porcentajes de pérdida de peso causados por el ataque de *T. trogii* sobre ambos tipos de madera, se observó en cambio un patrón diferente de cambios estructurales y ultraestructurales durante los distintos estadios del deterioro.

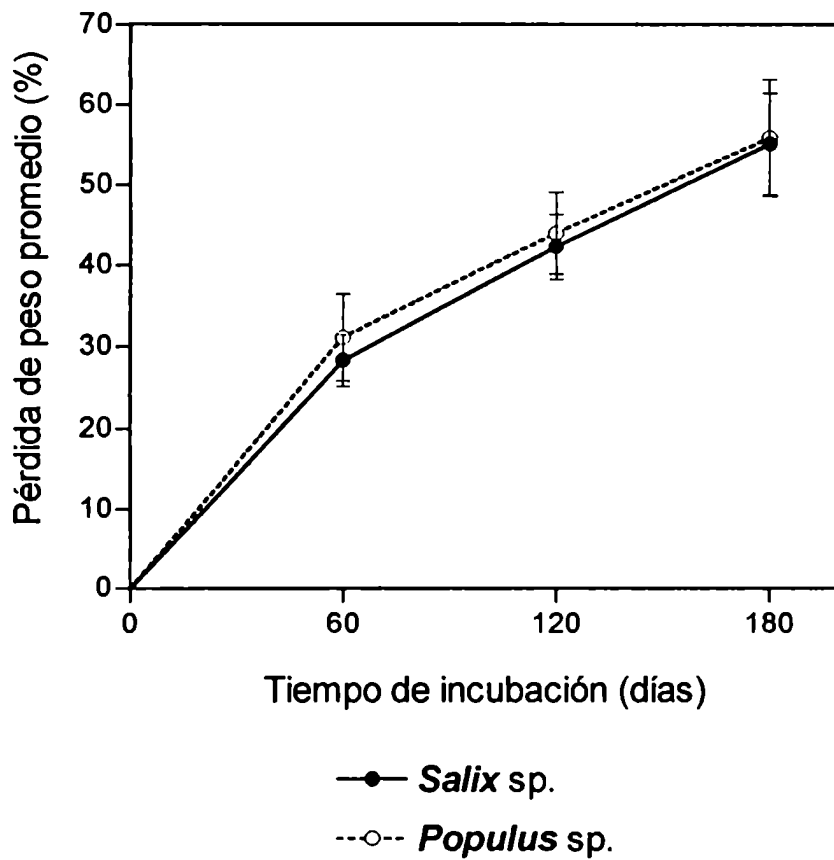


Figura R₂₂: Pérdida de peso seco como consecuencia de la pudrición *in vitro* de maderas de sauce y álamo por *T. trogii*, durante diferentes períodos de incubación. Barras de error: error estándar.

En ambas maderas estudiadas pudo observarse abundante cantidad de hifas fibuladas, colonizando el lumen de elementos de vaso, fibras y células parenquimáticas (Fig. R_{23D}; Fig. R_{24A-D}; Fig. R_{26D-E}); causando erosión y adelgazamiento de las paredes de dichas células. Las hifas, numerosas en los estadios tempranos y moderados de la pudrición, decrecieron en número, a medida que progresó el deterioro. La penetración de las hifas fue principalmente a través de las puntuaciones (Fig. R_{24H}; Fig. R_{27B}), cuyas aperturas internas fueron agrandadas enzimáticamente durante el proceso de pudrición, aunque también a través de orificios de perforación producidos enzimáticamente por el hongo (Fig. R_{24G,I}; Fig. R_{25C-E}).

4.5.4. Deterioro en *Populus* sp.

Durante el proceso de pudrición de *Populus* sp. por *T. trogii*, se evidenció un patrón combinado de degradación selectiva y simultánea. En algunas áreas ocurrió un ataque simultáneo de todos los componentes de la pared celular (lignina y polisacáridos), detectándose erosionadas las paredes secundarias adyacentes a las hifas (Fig. R_{24D-G}). El deterioro progresó centrífugamente desde el lumen hacia la laminilla media. Una vez que la erosión alcanzó la laminilla media, esta región también resultó degradada en un área localizada. Estos caracteres anatómicos pudieron ser observados con microscopía óptica como paredes rotas o discontinuas en sección transversal, en elementos de vaso, fibras y parénquima radial; pero el tejido en general se observó lignificado y se tiñó de rojo con safranina-fast green (Fig. R_{23D,E}). Con microscopio electrónico de barrido, pudieron observarse fácilmente orificios de perforación con bordes irregulares, y cavidades elongadas axialmente adyacentes a las hifas en crecimiento (Fig. R_{24H,I}). Sin embargo en algunas zonas se produjo una degradación selectiva de lignina, que recién resultó claramente evidente en los estadios más avanzados de la pudrición. El deterioro no fue uniforme, y zonas prácticamente inalteradas del tejido coexistieron con otras severamente dañadas. En estadios avanzados de la pudrición, los bloques de madera adquirieron una estructura esponjosa. Pudieron observarse grandes huecos en la

madera, donde todos los tipos celulares ya se habían desintegrado. En las fibras y elementos de vaso restantes, se evidenció una remoción selectiva de la lignina. En secciones transversales teñidas con safranina-fast green, sus paredes secundarias se tiñeron de color verde, indicando la ausencia de lignina, mientras que la lignina presente en las ángulos celulares y en la laminilla media se tiñó de rojo (Fig. R_{23F,G}). La delignificación afectó también la rigidez de las paredes de los vasos y algunos elementos de vaso colapsados pudieron observarse con MEB (Fig. R_{25A,B}). En zonas donde desapareció la lignina, se evidenció una pérdida de birrefringencia, que indica la despolimerización generalizada de la celulosa junto con el cambio en sus propiedades anisotrópicas (Fig. R_{23H,I}).

Como se encontró en este trabajo, existen varios otros ejemplos de hongos causantes de pudrición blanca que producen ambos tipos de ataque (selectivo y simultáneo) en el mismo sustrato. Este fenómeno fue descrito por primera vez por Hartig (1878) y es frecuente en maderas atacadas por *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma tsugae*, *Heterobasidion annosum* y muchos otros Basidiomycetes (Adaskaveg y Gilbertson, 1986; Blanchette y Reid, 1986; Adaskaveg *et al.*, 1990; Blanchette, 1991; 1995). Los motivos que ocasionan estos diferentes patrones de ataque a las paredes celulares aún no han sido esclarecidos. El uso de diferentes cepas o condiciones de cultivo, puede cambiar la preferencia de ciertos hongos por la lignina (Otjen *et al.*, 1987; Blanchette, 1991). La diversidad observada dentro de una misma especie hacia la degradación selectiva de lignina puede deberse a diversos factores, incluyendo el sustrato y el ambiente en donde crecen los hongos (Otjen y Blanchette, 1986). Debido a que la mayoría de los hongos que degradan selectivamente lignina son capaces también de causar degradación simultánea, el sustrato o factores ambientales que regulan las actividades celulolítica y hemicelulolítica, serían los responsables en última instancia de la selectividad hacia la lignina observada. En cambio, para la mayoría de los hongos que causan degradación simultánea, cambios en el sustrato o en las condiciones medioambientales, no tienen efecto sobre su patrón de degradación (Otjen *et al.*, 1987; Blanchette, 1995; Reid, 1995). Diversos factores influyen sobre la síntesis de celulasas, por ejemplo la presencia de celobiosa, glucosa y otros azúcares de la

madera, fenoles y proteasas (Eriksson *et al.*, 1990). Sin embargo existe escasa información sobre los factores involucrados en la regulación de las celulasas durante el proceso de delignificación (Blanchette, 1991).

4.5.5. Deterioro en *Salix* sp.

En *Salix* sp. *T. trogii* produjo sólo pudrición blanca del tipo de degradación simultánea de todos los componentes de la pared celular. En estadios tempranos y moderados del ataque, las primeras señales del deterioro aparecieron en las paredes más delgadas del leño temprano (Fig. R_{26D-E}). Mientras que las fibras y células del parénquima radial mostraron signos de degradación, los elementos de vaso evidenciaron una marcada resistencia al deterioro (Fig. R_{26G}; Fig. R_{27A,C-E}). En estos estadios de la pudrición, en algunas células ya había desaparecido por completo la pared secundaria, quedando sólo la laminilla media y los ángulos celulares (Fig. R_{26G}, flecha). El contenido de lignina es mayor en la laminilla media y ángulos celulares e imparte a estas zonas mayor resistencia al deterioro, los polisacáridos que son más abundantes en la pared secundaria, contribuyen a acelerar su degradación. En las fibras, la laminilla media contiene una proporción mayor de G-lignina y las paredes secundarias son más ricas en S-lignina. Los hongos causantes de pudrición blanca degradan preferentemente las unidades siringilpropil (S) de la lignina, mientras que las unidades guayacilpropil (G) son más resistentes a la degradación (Faix *et al.*, 1985; Saka y Goring, 1988; Blanchette *et al.*, 1988b; 1994; Obst *et al.*, 1994; Blanchette, 1995).

En las fibras del leño tardío, se detectaron frecuentemente cavidades hemiesféricas en las gruesas paredes adyacentes a las hifas (Fig. R_{26F}). Las diferencias observadas en los patrones de pudrición de leño temprano y tardío, pueden explicarse por el hecho de que debido al mayor grosor de las paredes celulares y el menor número de puntuaciones de las células componentes del leño tardío, éste resulta menos accesible a las hifas (Wilcox, 1993).

En estadios avanzados del deterioro, la madera adquirió una apariencia fibrosa debido a que las fibras y células parenquimáticas habían sido completamente degradadas y sólo quedaban los vasos (Fig. R_{27F-H}).

Patrones similares de degradación fueron observados por Blanchette *et al.* (1988b), cuando realizaron estudios de pudrición blanca en maderas de *Acer* y *Tilia* y también en madera de *Acacia koa* var. *koa* atacada por *Phellinus kawakamii*. La resistencia de los vasos a la completa degradación parece ser una característica común en los casos avanzados de pudrición blanca fibrosa. Entre los hongos que causan también este tipo de pudrición están: *Armillaria mellea*, *Bondarzewia berkeleyi* y *Dichomitus squalens* (Blanchette *et al.*, 1988b).

La conjunción de caracteres químicos y anatómicos de la madera aparenta gobernar el comportamiento de las enzimas responsables del tipo de pudrición blanca fibrosa, que resulta en una degradación diferencial inusual de todos los tipos celulares excepto los vasos. El mayor contenido de lignina, la capa S₃ de mayor grosor, y un incremento en la concentración de guayacil versus siringil lignina en los elementos de vaso de ciertas maderas de angiospermas les conferirían conjuntamente mayor resistencia al ataque enzimático, causando este tipo particular de pudrición blanca (Blanchette *et al.*, 1988b).

Phlebia tremellosus causó una delignificación diferencial de todos los tipos celulares de la madera, incluidos los elementos de vaso, en *Populus* sp. (Blanchette y Reid, 1986). Del mismo modo, la pudrición de madera de *Populus* por *T. trogii* afectó a todas las células xilemáticas (resultados similares fueron obtenidos por Lopez y Deschamps (1978)). Probablemente existen diferencias en aspectos químicos y ultraestructurales en los elementos de vaso de ambas maderas estudiadas que modifican el patrón de degradación.

La extensiva remoción de la lignina de una célula entera o un grupo de células, a partir de una sola hifa ubicada en el lumen celular, constituye aún un aspecto no esclarecido del proceso de delignificación (Blanchette, 1994).

Los compuestos responsables de la degradación de lignina deben ser lo suficientemente pequeños para difundir dentro de la pared celular a través de poros existentes o espacios interfibrilares. Investigaciones previas han demostrado que las

enzimas responsables de la degradación de la madera son incapaces de penetrar las paredes celulares sanas de las células xilemáticas (Srebotnik *et al.*, 1988; Blanchette *et al.*, 1989; Nicole *et al.*, 1992). Cambios en el tamaño de los poros por agentes no enzimáticos o depolimerización de los componentes de la pared como la hemicelulosa pueden proveer acceso a las enzimas que degradan la lignina. Sin embargo en un estudio reciente de degradación de leño de tensión por *Trametes versicolor*, las enzimas causantes del deterioro resultaron capaces de difundir a través de la capa gelatinosa (capa G, capa relativamente gruesa constituida enteramente por celulosa cristalina que recubre la superficie interna de la pared celular en fibras del leño de tensión), y causaron un ataque simultáneo en la pared secundaria subyacente, a pesar de que en la capa G las alteraciones resultaron mínimas (Blanchette *et al.*, 1994). En estadios avanzados del deterioro la pared secundaria y la laminilla media resultaron completamente degradadas pero la capa G quedó relativamente inalterada. Aparentemente un conjunto completo de enzimas degradativas difundieron a través de la pared para atacar a la lignina, celulosa y hemicelulosa. A pesar de que en la capa G los cambios ultraestructurales fueron mínimos, ciertas alteraciones habrían sido inducidas, resultando en poros de tamaño suficiente como para permitir la penetración incluso de celulasas con pesos moleculares más altos. Cambios en la porosidad de la pared celular durante estadios incipientes de la pudrición blanca también fueron demostrados, usando tinciones citoquímicas, en chips de madera pretratados con *Ceriporiopsis subvermispora* (Blanchette *et al.*, 1992a).

Como en el estudio de Blanchette (1994), previamente mencionado, en el presente trabajo, las micrografías de *Salix* sp. atacado por *T. trogii* muestran fibras gelatinosas extensivamente degradadas (Fig. R_{271,J}), y en la figura R_{25J} se observa claramente que la pared secundaria subyacente ha sido erosionada. Asimismo comparando con zonas donde no existe capa G, las fibras gelatinosas mostraron mayor resistencia al deterioro. Los factores que contribuyen a la persistencia de la capa gelatinosa son todavía desconocidos (Obst *et al.*, 1994).

Las micrografías de la madera deteriorada por *T. trogii* avalan los resultados de los estudios previos sobre producción enzimática *in vitro*. *T. trogii* es capaz de producir las enzimas necesarias para degradar eficientemente los principales componentes de las paredes celulares vegetales (celulasas, xilanasas, pectinasas y ligninasas), lo que se evidencia en estadios avanzados del deterioro por la desintegración total de células parenquimáticas y fibras en *Salix* y de todos los tipos celulares que conforman la madera en *Populus*. Asimismo se comprobó que *T. trogii* es capaz de degradar selectivamente lignina bajo ciertas condiciones. En la actualidad existe un gran interés en hongos con esta habilidad, debido a su potencial para usos industriales.

LEYENDAS DE LAS FIGURAS R₂₃ A R₂₇:

Fig. R₂₃ : A-I, Pudrición blanca causada por *T. trogii* en madera de álamo, micrografías ópticas: **A-C**, anatomía normal de la madera: secciones transversales, tangenciales y radiales respectivamente; **D-E**, degradación simultánea: paredes interrumpidas en fibras, elementos de vaso y parénquima radial (flecha); **F-G**, degradación selectiva en estadio avanzado de la pudrición: pared secundaria delignificada (flecha) y laminilla media lignificada (flecha); **H-J**, pérdida de birrefringencia de la celulosa, luz polarizada. h= hifas; p = perforación. Escala = **A-C** = 100 μ m; **D-I** = 50 μ m.

Fig. R₂₄ : A-I, Pudrición blanca en madera de álamo, estadios tempranos y moderados de la pudrición: micrografías con MEB: **A-I**, hifas colonizando el lumen de células del parénquima, elementos de vaso y fibras: **A-C**, células con paredes celulares que mantienen prácticamente su grosor original; **A-B**, aspecto general; **C**, fibras con hifas fibuladas (detalle); **D-I**, adelgazamiento y erosión de las paredes celulares: **D-E**, aspecto general; **F**, paredes celulares interrumpidas en fibras; **G**, perforaciones en el parénquima radial, vista superficial; **H-I**, elementos de vaso: **H**, hifas pasando a través de puntuaciones intervasculares agrandadas; **I**, coalescencia de orificios de perforación y cavidades elongadas adyacentes a las hifas en crecimiento. Escala = **A-B,D** = 100 μ m; **C** = 10 μ m; **E-J** = 50 μ m.

Fig. R₂₅ : A-E, estadio avanzado del deterioro en álamo: micrografías con MEB: **A-B**, elementos de vaso, fibras y células de parénquima parcialmente destruidas, secciones transversales, aspecto general; **C-E**, secciones longitudinales: paredes celulares erosionadas, **C-D**, en elementos de vaso; **E**, en fibras y parénquima radial. Escala = **A-C** = 100 μ m; **D** = 10 μ m; **E** = 50 μ m.

Fig. R₂₆: A-J, Pudrición blanca causada por *T. trogii* en madera de sauce, micrografías ópticas: **A-C**, anatomía normal de la madera: secciones transversales, tangenciales y radiales respectivamente; **D-G,I**, estadios tempranos y moderados de la pudrición: **D-E**, aspecto general; **F**, cavidades hemiesféricas en las paredes celulares de fibras del leño tardío (flecha); **G**, vasos y ángulos celulares lignificados en leño temprano (flecha); **H**, estadio avanzado de la pudrición: sólo quedan los elementos de vaso lignificados; **I**, pérdida de birrefringencia de la pared, con luz polarizada, en estadio temprano del deterioro. Escala = **A-F,H** = 100; **G,I** = 50 μ m.

Fig. R₂₇ : Deterioro progresivo en madera de sauce, micrografías con MEB: A-B, estadios tempranos; **A**, aspecto general; **B**, hifa pasando a través de una puntuación intervascular agrandada; **C-E**, estadios moderados de la pudrición: note el parénquima radial y las fibras parcialmente destruidas; **F-G**, estadios avanzados: **F**, apariencia fibrosa de la madera en vista longitudinal; **G-H**, sólo quedan los vasos; **G**, aspecto general; **H**, detalle de algunos vasos colapsados; **I-J**, leño de tensión: **I**, aspecto general; **J**, detalle de fibras gelatinosas. Escala = **A,C,D,F,G** = 100 μ m; **B,J** = 10 μ m; **E,H,I** = 50 μ m.

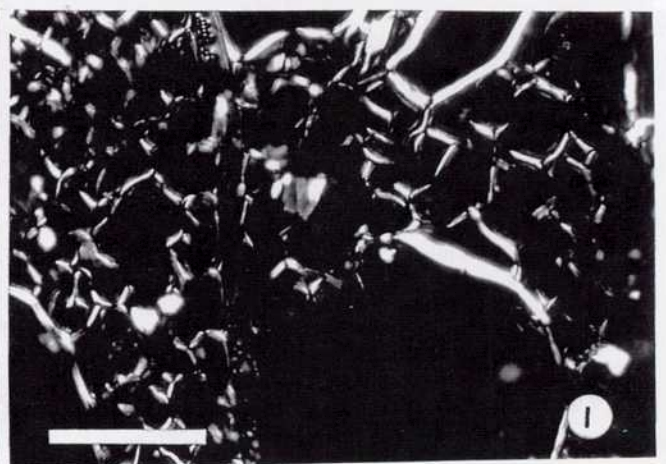
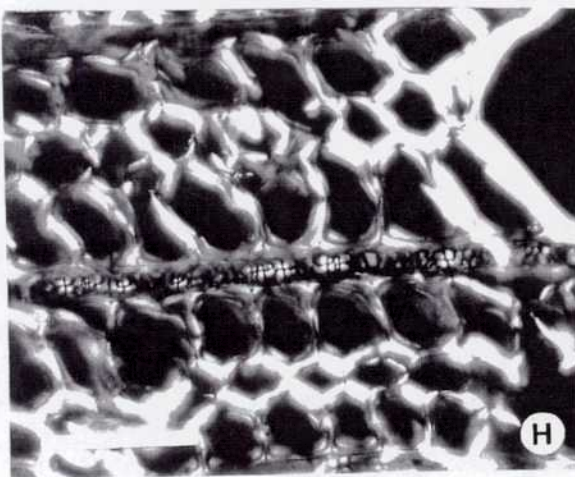
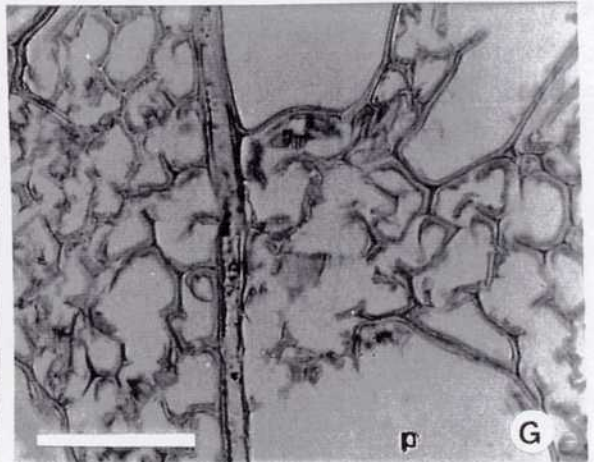
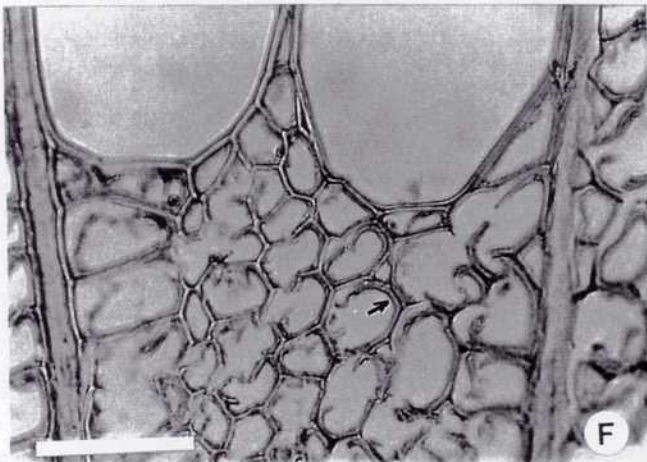
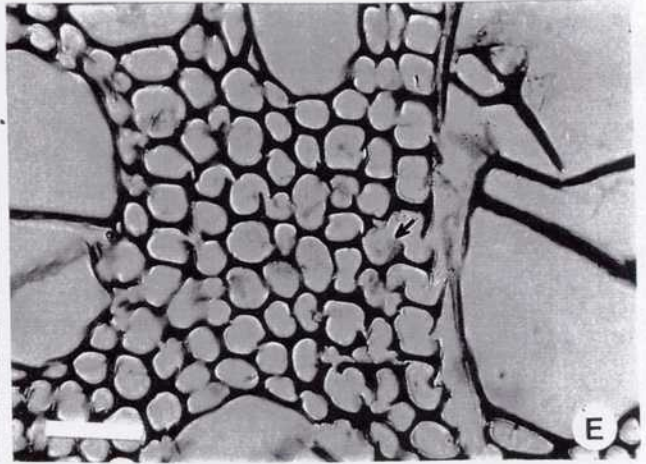
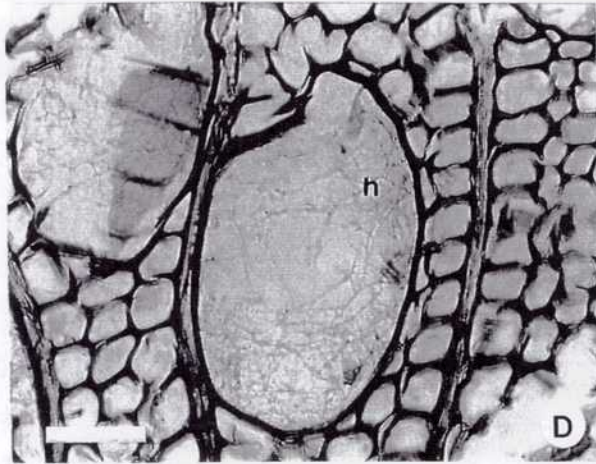
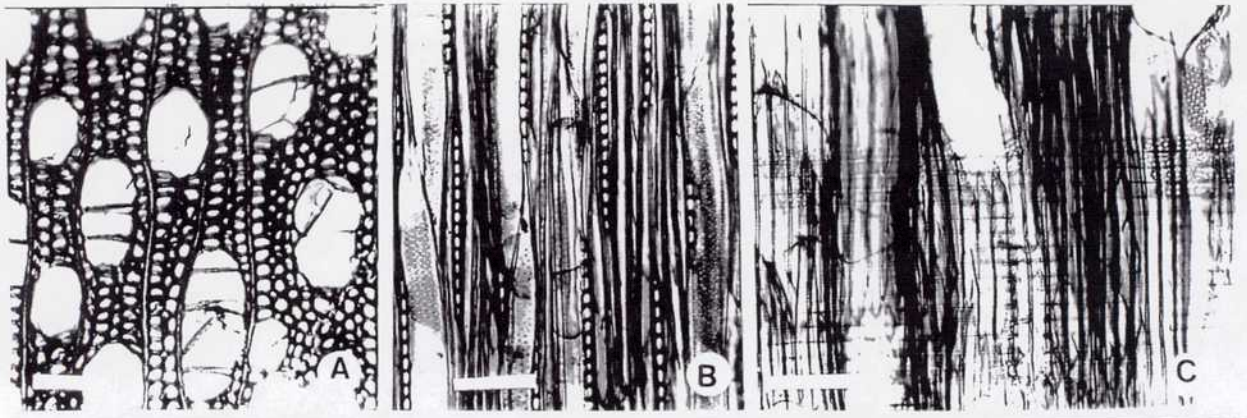


Fig. R23

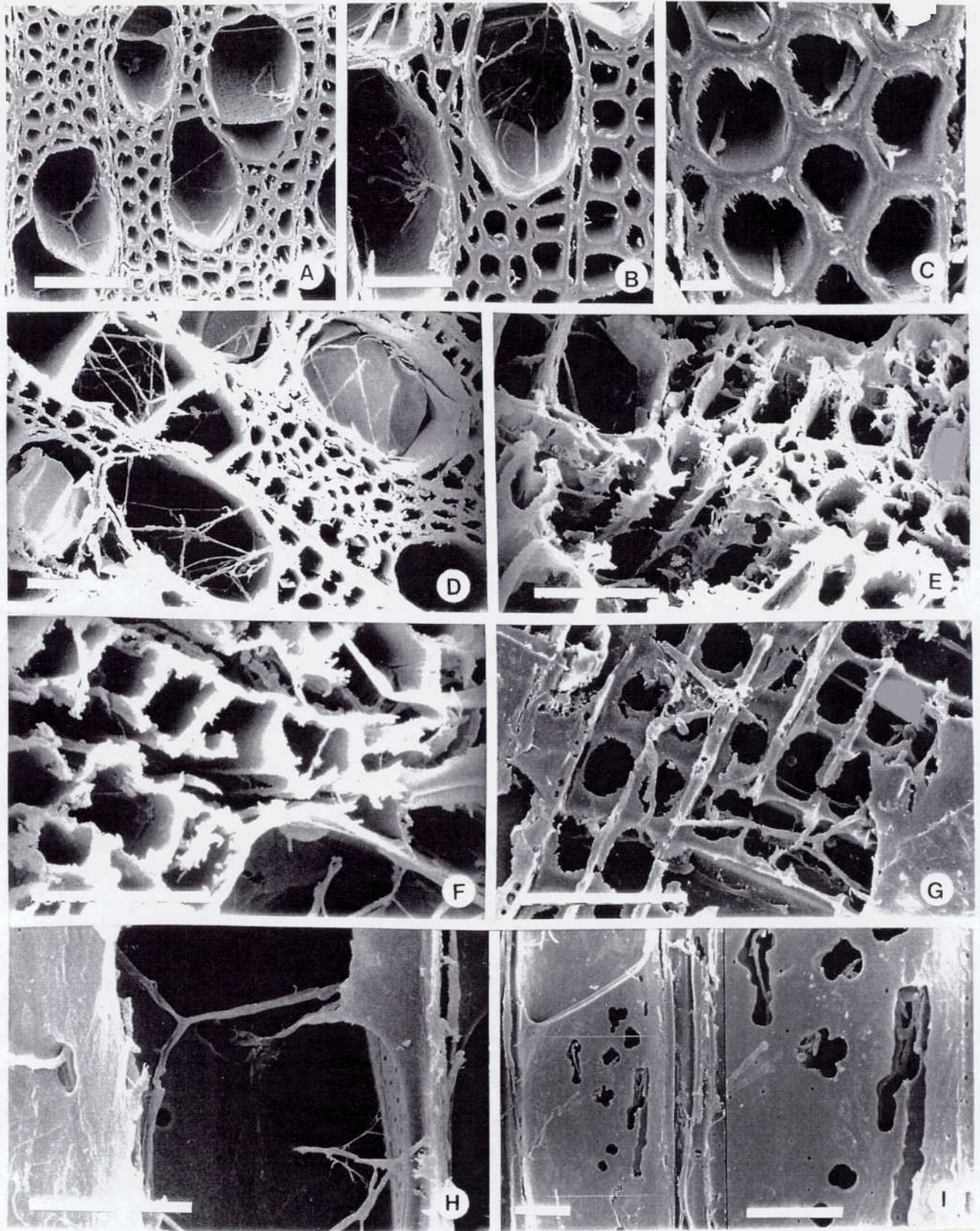


Fig. R24

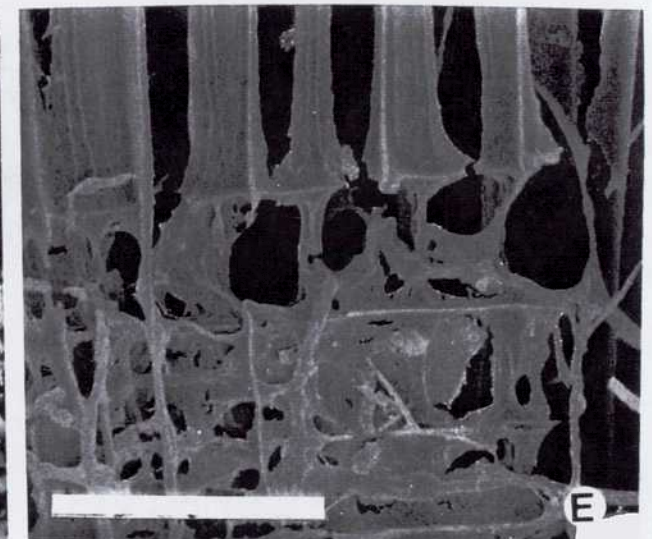
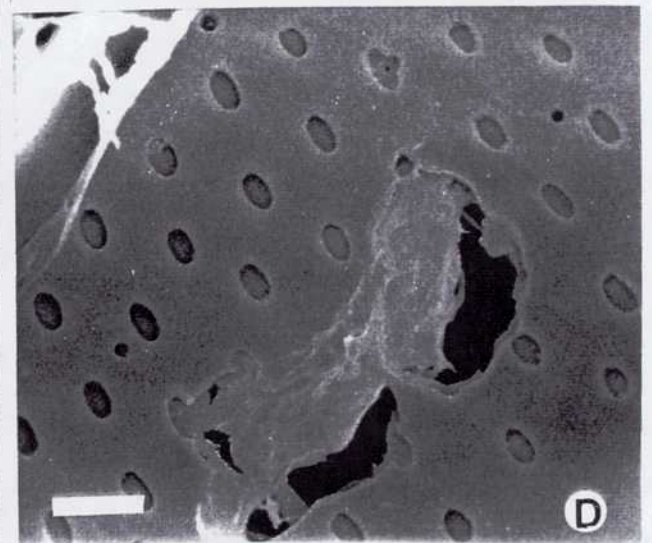
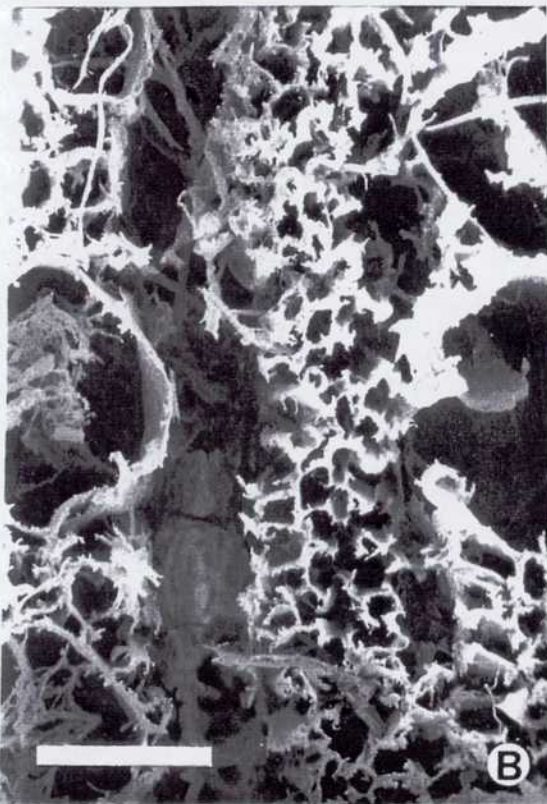
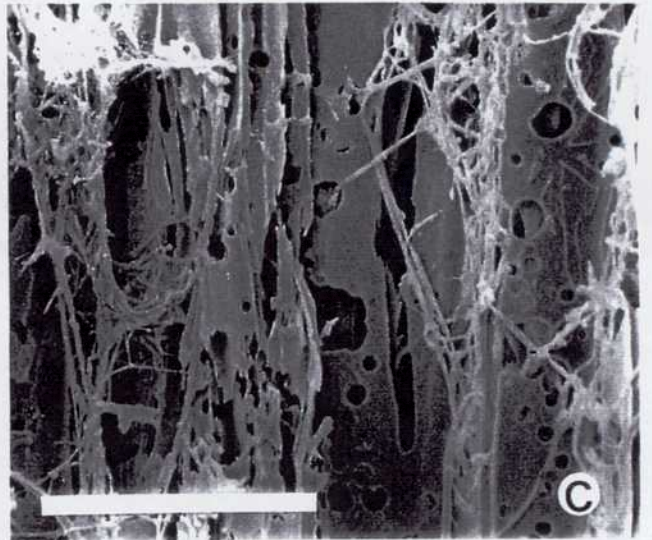
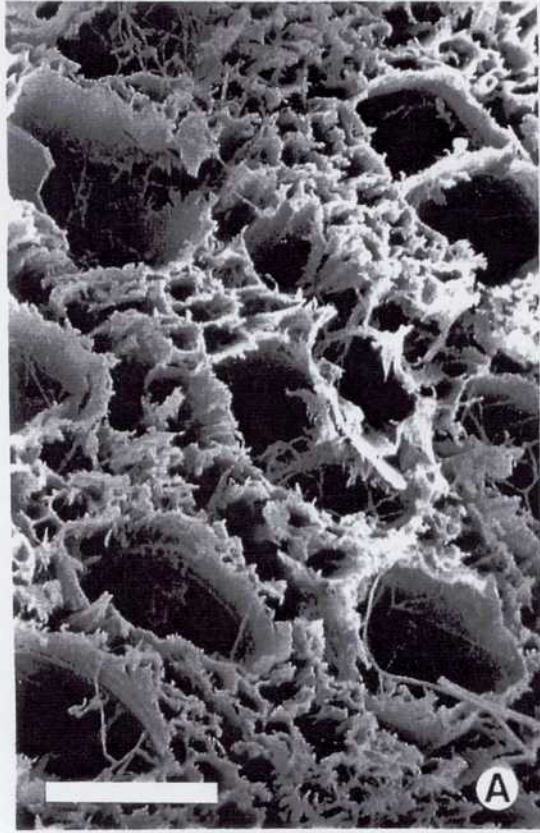


Fig. R25

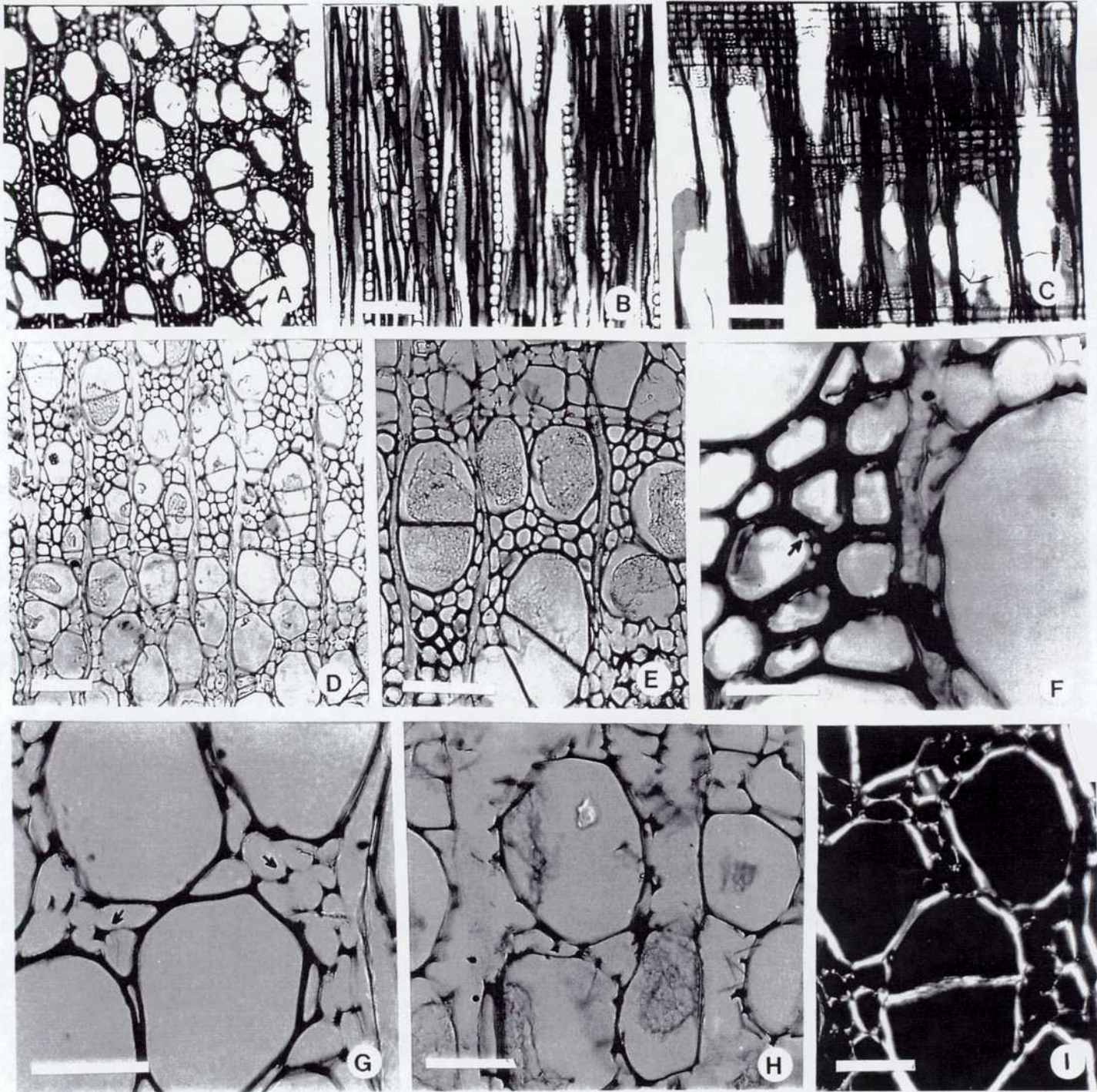


Fig. R₂₆

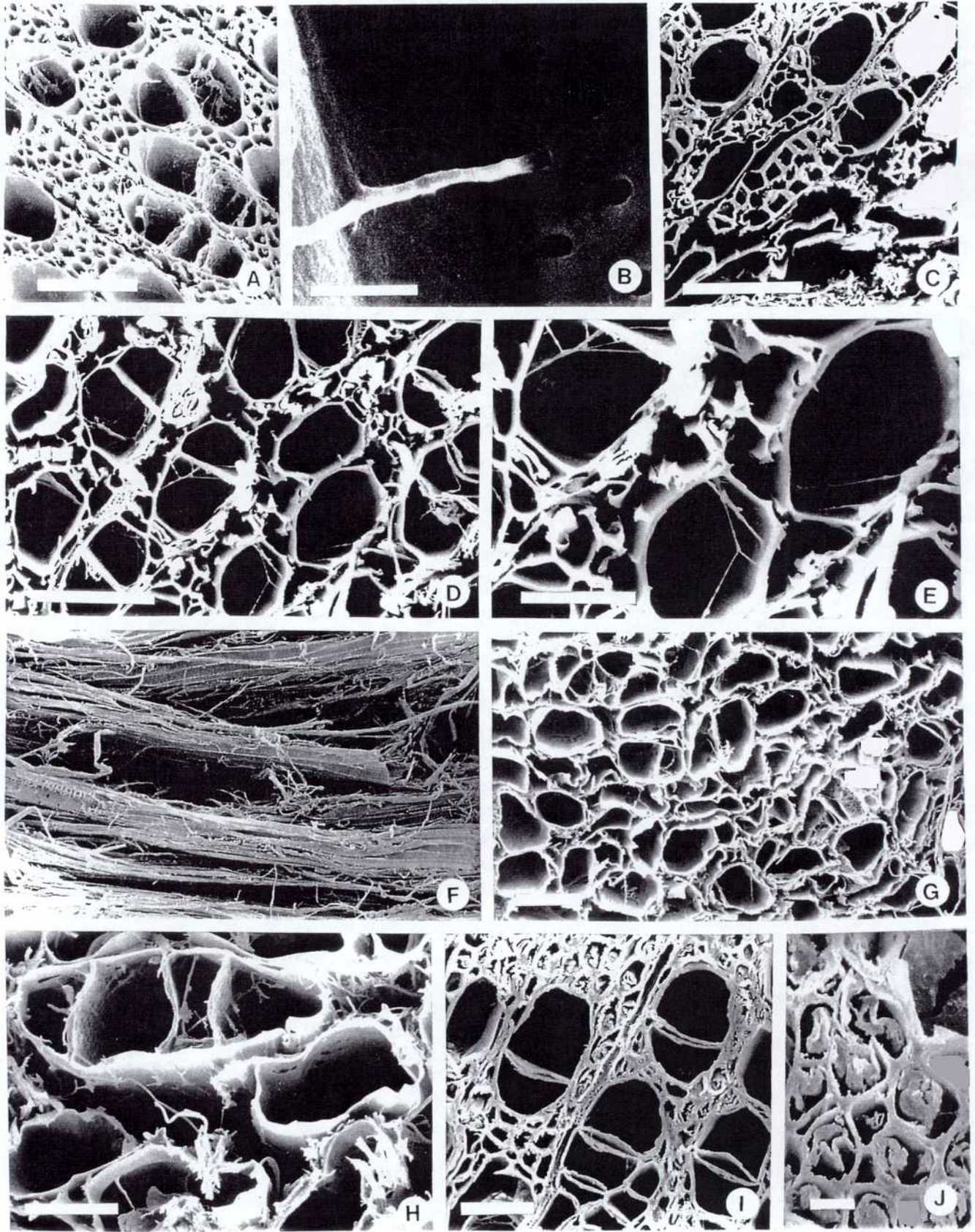


Fig. R27

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES:

Producción de los sistemas enzimáticos responsables de la biodegradación de materiales lignocelulósicos:

T. trogii produjo en un medio de cultivo bajo condiciones adecuadas los sistemas enzimáticos extracelulares necesarios para degradar los principales constituyentes de las paredes celulares de las plantas superiores. Se detectó la presencia de las siguientes actividades enzimáticas:

a. Celulolíticas:

Actividad endo- β -D-1,4-glucanasa (EC 3.2.1.4)

Actividad exo- β -D-1,4-glucanasa (EC 3.2.1.91)

Actividad β -glucosidasa (EC 3.2.1.21)

b. Xilanolíticas:

Actividad endoxilanasas (EC 3.2.1.8)

Actividad β -xilosidasa (EC 3.2.1.37)

c. Pectinolíticas:

Actividades poligalacturonásicas (EC 3.2.1.82) (poligalacturonasa y polimetilgalacturonasa).

Actividad pectin liasa (EC 4.2.2.10)

d. Involucradas en la degradación de lignina:

Ligninolíticas:

Actividad lignin peroxidasa (EC 1.11.1.14)

Actividad lacasa (EC 1.10.3.2)

Actividad Mn-peroxidasa (EC 1.11.1.13)

Actividad Peroxidasa Mn-independiente.

Productoras de H₂O₂:

Actividad glioxal oxidasa (EC 1.2.3.5)

Actividad glucosa oxidasa.

Se trata por lo tanto de un organismo celulolítico, xilanolítico, pectinolítico y ligninolítico.

Estudio de los parámetros nutricionales y condiciones de cultivo que afectan la producción de dichas enzimas y caracterización parcial de las distintas actividades enzimáticas:

Celulasas:

Se comprobó en *T. trogii* la capacidad de producir el sistema enzimático celulolítico completo dependiendo de las condiciones de cultivo.

Se demostró además que puede crecer en un medio con celulosa cristalina como única fuente de carbono.

T. trogii produjo el sistema celulolítico completo creciendo en celulosa cristalina como única fuente de carbono en condiciones estáticas y de agitación. Las condiciones de cultivo afectaron marcadamente la cinética de crecimiento y de producción enzimática, pero no los máximos valores registrados de endo y exoglucanasa. La máxima producción enzimática se alcanzó 10 días antes en los cultivos estáticos.

Las celulasas de *T. trogii* no fueron inactivadas por agitación, como se comprobó que ocurre en otras especies, incluso la actividad β -glucosidasa se duplicó en el caso de cultivos sometidos a agitación continua, con respecto a la obtenida en cultivos estáticos. La morfología del micelio resultó diferente en ambas condiciones. En los cultivos con agitación se observó un patrón de crecimiento macromorfológico globoso. Esta morfología puede ser responsable de las bajas cantidades de enzimas liberadas al medio extracelular, ya que éstas pueden estar adsorbidas o encerradas en la masa globular del micelio. En condiciones estáticas el crecimiento miceliano presentó un patrón macromorfológico plumoso y la producción enzimática resultó lineal con el crecimiento registrado. En estas condiciones dado que la celulosa precipita y las hifas del hongo permanecen cerca de la superficie del líquido, no existiría una estrecha interfase hifa-partícula de

celulosa, como en el caso de agitación, por lo tanto estaría facilitada la difusión de las enzimas celulolíticas para poder degradar el polímero y se encontrarían en mayor cantidad en el sobrenadante de cultivo.

La adición de glucosa resultó en un buen crecimiento miceliano pero reprimió, aunque no totalmente, la síntesis de celulasas. Cuando disminuyó la concentración de glucosa por debajo de un cierto nivel crítico, al haber sido consumida por el hongo para su crecimiento, aumentó notoriamente la producción de celulasas. Los niveles bajos de actividad celulasa en el medio con glucosa constituirían un nivel basal constitutivo capaz de gatillar la síntesis del complejo enzimático en presencia del inductor adecuado.

Se probaron diversas fuentes carbonadas con el objetivo de estudiar si la fuente de carbono utilizada en el medio afecta la producción de celulasas. En todos los medios utilizados hubo crecimiento, pero el nivel de éste no siempre se correspondió con el nivel de producción de celulasas.

Se detectó actividad celulasa en todos los medios ensayados lo cual comprobaría que la inducción no es altamente específica. A pesar de ello los mejores sustratos para la producción de endoglucanasas y exoglucanasas resultaron ser de naturaleza celulósica (celulosa cristalina, celobiosa y la mezcla de carboximetilcelulosa y celobiosa). Para la β -glucosidasa las mejores fuentes fueron: almidón, celobiosa, carboximetilcelulosa/celobiosa y xilosa.

La concentración óptima de la fuente de carbono fue de 10 g/l.

La actividad específica referida a las proteínas extracelulares indicó que utilizando la combinación carboximetilcelulosa/celobiosa se obtiene una mezcla proteica más rica en celulasas respecto de las otras fuentes.

Las fuentes orgánicas de nitrógeno resultaron mejores que las inorgánicas promoviendo tanto el crecimiento como la liberación de las enzimas del sistema celulolítico. Entre ellas los casaminoácidos resultaron los más efectivos para estimular el crecimiento y la liberación de las tres enzimas del complejo celulolítico de *T. trogii*. De las fuentes inorgánicas la mejor fue el fosfato de amonio. La producción enzimática se incrementó al aumentar la concentración de nitrógeno en el medio.

En un medio con carboximetilcelulosa /celobiosa y casaminoácidos en concentraciones óptimas prácticamente se duplicó la producción de celulasas. El pH óptimo para la síntesis del sistema celulolítico fue 5.6, mientras que los óptimos para las actividades enzimáticas fueron 3.1, 4.1 y 5.3 para endoglucanasa, exoglucanasa y β -glucosidasa respectivamente. La mayor actividad en el sobrenadante se obtuvo en cultivos incubados entre 25 y 28 °C. Las temperaturas que optimizaron las actividades enzimáticas fueron 45 °C (endoglucanasa), 50 °C (exoglucanasa) y 60 °C (β -glucosidasa). Las actividades enzimáticas tuvieron por lo tanto óptimos de pH y temperatura semejantes a los de otras especies, con la excepción de la actividad de endoglucanasa que se vio favorecida por un pH de 3.1, un registro más bajo que los habituales.

Xilanasas:

T. trogii produjo, en un medio de cultivo adecuado, las actividades enzimáticas responsables de la degradación de la fracción de xilano de las paredes celulares de los vegetales superiores. Fue capaz de crecer en un medio con xilano como única fuente de carbono.

La mezcla xilano/celulosa cristalina resultó el sustrato más efectivo para producción de endoxilanasas y β -xilosidasas, seguido por xilano como única fuente de carbono.

Los hongos celulolíticos frecuentemente producen altos niveles de celulasas y xilanasas cuando se los cultiva en sustratos naturales que contienen celulosa y xilano, pero pueden producir sólo xilanasas cuando se los cultiva sobre xilano; como se comprobó previamente, la presencia de xilano en el medio de cultivo no reprime la síntesis de celulasas por *T. trogii*.

Tomando en cuenta la actividad específica obtenida con las diferentes fuentes de carbono, expresada como el cociente entre producción enzimática y rendimiento miceliano (como proteína de micelio); la celulosa cristalina resultó el mejor inductor de la actividad endoxilanasas, a pesar de no ser una buena fuente para el crecimiento de *T. trogii*. La combinación xilano/celulosa cristalina y el xilano sólo, también resultaron buenos inductores de la actividad endoxilanasas. El mejor

inductor de la actividad β -xilosidasa resultó el xilano, seguido por la mezcla xilano/celulosa cristalina y ésta última fuente sola. En contraste la glucosa resultó la mejor fuente para el crecimiento de *T. trogii*, pero en dicho medio no se detectó actividad β -xilosidasa y la actividad específica endoxilanasas fue muy pobre. La actividad endoxilanasas parece ser por lo tanto, constitutiva en *T. trogii*. El aumento de la concentración de xilano incrementó la producción de endoxilanasas, mientras que no se detectaron diferencias significativas en la producción de β -xilosidasa con más de 5 g/l de xilano en el medio de cultivo. Entre las fuentes de nitrógeno ensayadas, las orgánicas (especialmente la asparagina y los casaminoácidos) rindieron los mejores resultados tanto de crecimiento como de producción enzimática. Entre las fuentes inorgánicas de nitrógeno, el fosfato de amonio y el sulfato de amonio promovieron la mayor actividad endoxilanasas. El pH óptimo del medio para producción de endoxilanasas resultó 4.0, aunque se detectó producción enzimática entre pHs 3.1 y 6.5. La mayor actividad β -xilosidasa se obtuvo a pH 5.5. Valores bajos de pH en general promovieron el crecimiento miceliano (el mayor crecimiento se registró a pH 3.1) y la actividad xilanolítica. En el rango de entre 23 y 28 °C se obtuvieron los mayores crecimientos y mejor producción de ambas enzimas. Temperaturas más altas de incubación (hasta 37 °C) no afectaron el crecimiento ni la producción de endoxilanasas, pero sí inhibieron la actividad β -xilosidasa. El pH óptimo de ensayo para la actividad endoxilanasas fue 5.0, pero la enzima resultó activa entre pHs 3.1 y 7.4. El pH óptimo de ensayo para la actividad β -xilosidasa fue 5.5. La temperatura óptima para ambas actividades fue 50 °C. Interesantemente, a 70 °C la actividad β -xilosidasa detectada correspondió a un 70% de la máxima. Ambas actividades exhibieron pues propiedades catalíticas comparables con las enzimas xilanolíticas de otros organismos con respecto a temperatura y pH óptimos de reacción. La aplicación en la industria de la pulpa y el papel de xilanasas, requiere que éstas estén prácticamente libres de celulasas, ya que las enzimas celulolíticas afectan la calidad del producto. Es interesante por ello destacar que cultivando a *T. trogii* en un medio con cloruro de amonio como fuente de nitrógeno no se detectó actividad

endoglucanasa ni exoglucanasa y la actividad β -glucosidasa fue mínima, en cambio sí se valoró actividad xilanolítica (principalmente endoxilanasas); asimismo valores de pH iniciales del medio de alrededor de 3 permiten el crecimiento del hongo y producción de enzimas xilanolíticas, pero no de celulasas.

Pectinasas:

T. trogii fue capaz de crecer en un medio sintético con pectina como fuente de carbono y asparagina como fuente de nitrógeno, y produjo un complejo enzimático extracelular capaz de degradar las uniones α -1,4 de la pectina hidrolíticamente y por un mecanismo de trans-eliminación.

Bajo las condiciones del ensayo se valoraron actividades polimetilgalacturonasa, poligalacturonasa y pectin liasa, pero no se detectó actividad pectato liasa.

Los mayores crecimientos se obtuvieron con la combinación pectina/xilano, seguidos por glucosa como única fuente de carbono.

Sin embargo el agregado de xilano, carboximetilcelulosa o ambos al medio conteniendo pectina, no produjo cambios significativos en los máximos de producción de las tres enzimas valoradas. En cambio la adición de glucosa a dicho medio redujo marcadamente la producción de todas las enzimas y en un medio con glucosa como única fuente de carbono no se detectó actividad galacturonasa y la actividad pectin liasa fue mínima. La baja síntesis de pectin liasa en cultivos conteniendo glucosa sugiere que esta enzima es constitutiva en contraste con las poligalacturonasas que no se detectaron.

El aumento en la concentración de pectina en el medio de cultivo estimuló el crecimiento y la producción enzimática. Las máximas actividades específicas se obtuvieron con la mayor concentración de pectina ensayada (15 g/l).

Los casaminoácidos resultaron la mejor fuente de nitrógeno para la producción de todas las enzimas valoradas.

La adición de Tween 80 promovió el crecimiento y la mayor producción de pectin liasa y polimetilgalacturonasa. El aumento en los niveles enzimáticos detectados podría deberse al efecto estimulante del Tween 80 sobre la producción de biomasa,

o a otros factores como el aumento en la permeabilidad de las membranas celulares y/o promoción de la liberación de enzimas ligadas a la célula. Estas dos últimas posibilidades estarían respaldadas por el hecho de que los cultivos en medio con Tween 80 resultaron en una producción de proteínas extracelulares 50% mayor que en el medio control. La máxima producción de poligalacturonasa se logró con el agregado de PEG 6000. El agregado de Tween 20 y Triton X-100, provocó un aumento en la producción de proteínas extracelulares (55% con Tween 20 y 3 veces con Triton X-100), pero inhibió la producción de pectinasas, probablemente debido al efecto inhibitorio que dichos surfactantes ejercieron sobre el crecimiento de *T. trogii*. Una disminución en la provisión de oxígeno podría ser la causa de dicha merma en el crecimiento miceliano.

Temperaturas entre 23-28 °C resultaron óptimas para el crecimiento y la producción enzimática.

T. trogii pudo crecer en los medios cuyo pH inicial fue de entre 3.1 y 7.8, pero los valores bajos de pH resultaron los más favorables para el crecimiento, obteniéndose el máximo de crecimiento a pH 3.3. Un máximo de actividad pectinolítica se detectó a pH 4.5, debido a la presencia de actividad galacturonasa y liasa. Estas actividades decrecieron a valores mayores de pH, pero aumentaron nuevamente a pHs 6.2 y 6.6, respectivamente. Podría tratarse de isoformas de las enzimas en estudio que presenten óptimos de actividad a distintos valores de pH.

La actividad pectin liasa resultó inducida a valores de pH del medio de cultivo de entre 6.5 y 8 en otros hongos estudiados, interesantemente *T. trogii* produce pectin liasa en un medio con pH inicial 3.3.

La hidrólisis de celulosa y hemicelulosa en los residuos agrícolas de diverso origen es facilitada por inclusión de enzimas degradadoras de pectina, en las mezclas de sacarificación, ya que la remoción de la pectina facilita a las enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas un mayor acceso a sus sustratos respectivos incrementándose así la conversión. Debido a ello un sistema enzimático extracelular fúngico como el de *T. trogii*, capaz de sintetizar todas estas actividades enzimáticas sería particularmente útil en la conversión de la biomasa

Enzimas involucradas en la degradación de lignina:

En un medio sintético con glucosa (10 g/l) como fuente de carbono y asparagina (0.5 g/l) como fuente de nitrógeno se estudió la cinética de producción de diversas enzimas involucradas en el proceso de degradación de lignina.

Se detectó la presencia de lignin peroxidasa, Mn-peroxidasa, peroxidasa Mn-independiente y lacasa, todas enzimas con actividad ligninolítica.

Asimismo se valoró en el sobrenadante de cultivo una actividad productora de H₂O₂ (la glioxal oxidasa) y en extractos libres de células obtenidos a partir del micelio molido, la actividad glucosa oxidasa, también implicada en la producción de H₂O₂, componente clave del sistema de ligninólisis.

La aparición de las actividades lignin peroxidasa, Mn-peroxidasa, peroxidasa Mn-independiente y glucosa oxidasa, coincidió con el agotamiento de la glucosa en el medio y el inicio de la idiofase, en cambio las actividades lacasa y glioxal oxidasa no se limitaron a dicha fase del metabolismo.

El agregado de aserrín al medio de cultivo estimuló notablemente la producción de todas las actividades enzimáticas (hasta alrededor de 100 veces en el caso de la Mn-peroxidasa) y la cinética de producción de todas las enzimas resultó en este medio coincidente.

Debido a la variedad de actividades enzimáticas involucradas en la degradación de lignina detectadas en *T. trogii* y los altos títulos registrados para algunas de ellas, se podría considerar que la cepa BAFC 463 de *T. trogii* constituye una buena fuente para la obtención de los sistemas enzimáticos empleados en distintos procesos biotecnológicos.

Ensayos de pudrición “in vitro” en madera de salicáceas:

Se describieron los principales cambios anatómicos, que pueden proveer la base para evaluar y diagnosticar la pudrición de madera por *T. trogii*.

El deterioro por *T. trogii* originó pérdidas similares de peso seco en ambas maderas estudiadas. La pérdida de peso seco (a los 6 meses) fue de alrededor del 55 % en los

dos casos. De acuerdo al criterio de Findlay, ambas maderas no son resistentes al ataque por este hongo (pérdida de peso superior al 30 %).

A pesar de que ambos tipos de madera poseen propiedades xilotecnológicas semejantes, los patrones de deterioro resultaron marcadamente diferentes.

En *Populus* sp. la pudrición blanca desarrolló un patrón combinado de degradación simultánea y selectiva. Mientras que en ciertas zonas de la madera se produjo un ataque no-selectivo de todos los componentes de la pared celular, en otras áreas hubo degradación selectiva de lignina; pero todos los tipos celulares que constituyen la madera resultaron afectados. En estadios avanzados de la pudrición, los bloques de madera adquirieron una estructura esponjosa, apareciendo grandes huecos en la madera, adonde todos los tipos celulares ya se habían desintegrado. Como se encontró en este trabajo, existen varios otros ejemplos de hongos causantes de pudrición blanca que producen ambos tipos de ataque (selectivo y simultáneo) en el mismo sustrato. Los motivos que ocasionan estos diferentes patrones de ataque a las paredes celulares aún no han sido esclarecidos, pero probablemente estén relacionados con diferencias en las enzimas oxidativas producidas por el hongo y también sistemas de represión de las celulasas y hemicelulasas.

En *Salix* sp. ocurrió un tipo particular de pudrición blanca que se caracterizó por la degradación simultánea de lignina y polisacáridos de la pared celular, afectando a las fibras y células del parénquima, pero no a los elementos de vaso. En estadios avanzados del deterioro sólo quedaron los vasos y la madera adquirió una apariencia fibrosa.

La conjunción de caracteres químicos y anatómicos de la madera aparenta gobernar el comportamiento de las enzimas responsables del tipo de pudrición blanca fibrosa, que resulta en una degradación selectiva inusual de todos los tipos celulares excepto los vasos. El mayor contenido de lignina, la capa S₃ de la pared de mayor grosor, y un incremento en la concentración de guayacil versus siringil lignina en los elementos de vaso de ciertas maderas de angiospermas les conferirían conjuntamente mayor resistencia al ataque enzimático, causando este tipo particular de pudrición blanca. Probablemente existen diferencias en aspectos químicos y

ultraestructurales en los elementos de vaso de ambas maderas estudiadas que modifican el patrón de degradación.

Las micrografías de la madera deteriorada por *T. trogii* avalan los resultados de los estudios previos sobre producción enzimática *in vitro*. *T. trogii* es capaz de producir las enzimas necesarias para degradar eficientemente los principales componentes de las paredes celulares vegetales (celulasas, xilanasas, pectinasas y ligninasas), lo que se evidencia en estadios avanzados del deterioro por la desintegración total de células parenquimáticas y fibras en *Salix* y de todos los tipos celulares que conforman la madera en *Populus*. Asimismo se comprobó que *T. trogii* es capaz de degradar selectivamente lignina bajo ciertas condiciones. En la actualidad existe un gran interés en hongos con esta habilidad, debido a su potencial para usos industriales.

Por último:

Los hongos causantes de pudrición blanca o sus complejos enzimáticos, pueden ser utilizados en diversos procesos biotecnológicos: para bioconversión de materiales lignocelulósicos en productos utilizables tales como proteína fúngica y forraje para el ganado, combustibles líquidos, ácidos orgánicos, glucosa, alcoholes, etc; en la industria papelera en los procesos de pulpado y blanqueado para disminuir el uso de químicos y la contaminación ambiental asociada; y en procesos de biorremediación de suelos ya que son capaces de degradar numerosos contaminantes ambientales como DDT, PCB, dioxano, etc.

Dado que se demostró que *T. trogii* (cepa 463 BAFC) presenta sistemas enzimáticos extracelulares capaces de degradar activamente los materiales lignocelulósicos, y dados los altos títulos y la tolerancia a situaciones extremas registrados para algunas de dichas actividades enzimáticas, se considera la posible utilización de esta cepa con fines biotecnológicos.

PERSPECTIVAS:

- 1. Estudios mas detallados de las enzimas involucradas en la degradación de lignina, incluyendo detección de otras actividades enzimáticas. Optimización de un medio de cultivo para la producción de enzimas ligninolíticas.**
- 2. Análisis de las condiciones que favorezcan la expresión de enzimas degradadoras de lignina en ausencia de celulasas, con el objetivo de emplear esta cepa de *T. troglia* en la industria papelera.**
- 3. Investigación de la producción enzimática en otras cepas de la misma especie.**
- 4. Estudio de la degradación de contaminantes ambientales, como compuestos aromáticos policíclicos, con miras a la posible utilización de esta cepa en detoxificación ambiental.**

BIBLIOGRAFIA

- Abe, Y. (1989).** Effect of moisture on the colonization by *Lentinus edodes* and *Hypoxylon truncatum* in wood. *Eur. J. For. Path.* 19, 423-434.
- Acebal, C., Arache, R., Castillon, M. P., Estrada, P. y Romero, D. (1988).** β -glucosidase production by *Trichoderma reesei* QM9414 on wheat straw. Location and some kinetic features. *Acta Biotechnol.* 8, 341-348.
- Adaskaveg, J. E. y Gilbertson, R. L. (1986).** In vitro decay studies of selective delignification and simultaneous decay by the white-rot fungi *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae*. *Can. J. Bot.* 64, 1611-1619.
- Adaskaveg, J. E., Gilbertson, R. L. y Blanchette, R. A. (1990).** Comparative study of delignification caused by *Ganoderma* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1932-1943.
- Addleman, K. y Archibald, F. S. (1993).** Kraft pulp bleaching and delignification by dikaryons and monokaryons of *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 266-273.
- Adler, E. (1977).** Lignin chemistry-past, present and future. *Wood Sci. Technol.* 11, 169-218.
- Agosin, E., Tollier, M. T., Brillonet, J. M., Thivend, P. y Odier, E. (1986).** Fungal pretreatment of wheat straw: effects on the biodegradability of cell walls, structural polysaccharides, lignin and phenolic acids by rumen microorganisms. *J. Sci. Food. Agr.* 37, 97-106.
- Agosin, E., Blanchette, R. A., Silva, H., Lapierre, C., Cease, K. R., Ibach, R. E., Abad, A. R. y Muga, P. (1990).** Characterization of palo podrido, a natural process of delignification in wood. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 65-74.
- Aguilar, G. y Huitrón, C. (1986).** Application of fedbatch cultures in the production of extracellular pectinases by *Aspergillus* sp. *Enzyme Microb. Technol.* 8, 541-545.
- Aguilar, G. y Huitron, C. (1987).** Stimulation of the production of extracellular pectinolytic activities of *Aspergillus* sp. by galacturonic acid and glucose addition. *Enzyme Microb. Technol.* 9, 690-696.
- Aguilar, G. y Huitron, C. (1990).** Constitutive exo-pectinase produced by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 on different carbon sources. *Biotechnol. Lett.* 12, 655-660.
- Akhtar, M. (1994).** Biomechanical pulping of aspen wood chips with 3 strains of *Ceriporiopsis subvermispota*. *Holzforschung* 48, 199-202.
- 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.
- Akin, D. E., Sethuraman, A., Morrison, W. H., Martin, S. A. y Eriksson, K.-E. L. (1993).** Microbial delignification with white rot fungi improves forage digestibility. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 4274-4282.
- Alabi, R. O. y Naqui, S. H. Z. (1977).** Production of cellulolytic and pectinolytic enzymes by *Cercospora arachidicola*. *Trans. Br. mycol. Soc.* 68, 296-298.
- Alaña, A., Alkorta, I., Dominguez, J. B., Llama, M. J. y Serra, J. L. (1990).** Pectin lyase activity in a *Penicillium italicum* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 3755-3759.

- Alconada, T. M. (1992).** Enzimas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* involucradas en la degradación de la pared celular de las plantas superiores. Tesis Doctoral. Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Alconada, T. M. y Martínez, M. J. (1994).** Purification and characterization of an extracellular endo 1,4- β -xylanase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 118, 305-310.
- Alconada, T. M. y Martínez, M. J. (1996).** Purification and characterization of a β -glucosidase from the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 22, 106-110.
- Amadioha, A. C. (1993).** Production of cellulolytic enzymes by *Rhizopus oryzae* in culture and *Rhizopus*-infected tissues of potato tubers. *Mycologia* 85, 574-578.
- Ander, P. (1994).** The cellobiose-oxidizing enzymes CBQ and CbO as related to lignin and cellulose degradation- a review. *FEMS Microbiol. Rev.* 13, 297- 312.
- Ander, P. y Eriksson, K. E. (1976).** The importance of phenoloxidase activity in lignin degradation by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Arch. Microbiol.* 109, 1-8.
- Ander, P., Mishra, C., Farrell, R. L. y Eriksson, K. E. (1990).** Redox reactions in lignin degradation: interactions between laccase, different peroxidases, and cellobiose:quinone oxidoreductase. *J. Biotechnol.* 13, 189-198.
- Angelova, M. B., Bukaro, I. V. y Grigorov, N. S. (1987).** Regulating the biosynthesis of polymethylgalacturonase from strain *Aspergillus niger* 26 by the mechanism of catabolic repression. *C. Rendus. Acad. Bulg. Sci. Biol. Microbiol.* 40, 93-95.
- Anselmi, N. (1990).** Wood deterioration in poplars following decline after water stress. *Eur. J. For. Path.* 20, 321-328.
- Anselmi, N. y Nicolotti, G. (1988).** Biological aspects and biodegradatory activities on poplar wood of *Trametes trogii* Berk. *Mater. Org.* 25, 71-80.
- Archer, D. B. y Wood, D. A. (1995).** Fungal exoenzymes. En: *The growing fungus*. pp. 137-155. N. A. R. Gow y G. M. Gadd (eds.). Chapman and Hall, London.
- Archibald, F. S. (1992).** A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye azure B. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3110-3116.
- Archibald, F. S. y Roy, B. (1992).** Production of manganic chelates by laccase from the lignin-degrading fungus *Trametes (Coriolus) versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1496-1499.
- Asther, M., Corrieu, G., Dracon, R. y Odier, E. (1987).** Effect of Tween 80 and oleic acid in ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium* INA-12. *Enzyme Microb. Technol.* 9, 245-249.
- Asther, M., Tonon, F., Corrieau, G. y Odier, E. (1988).** En: *Biochemistry and genetics of cellulose degradation*. pp. 333-347. J. P. Aubert, P. Beguin y J. Millet (eds.). Academic Press, London.
- Ayers, A. R., Ayers, S. B. y Eriksson, K.-E. (1978).** Cellulose oxidase, purification and partial characterization of a hemoprotein from *Sporotrichum pulverulentum*. *Eur. J. Biochem.* 90, 171-181.

- Ayers, M. A., Papavizas, G. C. y Diem, A. F. (1966).** Polygalacturonate-trans-eliminase and polygalacturonase production by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 56, 1006-1011.
- Backa, S., Gierer, J., Reitberger, T. y Nilsson, T. (1992).** Hydroxyl radical activity in brown-rot fungi studied by a new chemiluminescence method. *Holzforschung* 46, 61-67.
- Bagga, P. S., Sandhu, D. K. y Sharma, S. (1990).** Purification and characterization of cellulolytic enzymes produced by *Aspergillus nidulans*. *J. Appl. Bacteriol.* 68, 61-68.
- Bailey, M. J. y Pessa, E. (1990).** Strain and process for production of polygalacturonase. *Enzyme Microb. Technol.* 12, 266-271.
- Bailey, M. J. y Viikari, L. (1993).** Production of xylanases by *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus oryzae* on xylan-based media. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 9, 80-84.
- Bajpai, P. (1997).** Microbial xylanolytic enzyme system: properties and applications. *Adv. Appl. Microbiol.* 43, 141-194.
- Baltrich, D., Preiss, O. y Steiner, W. (1993).** Optimization of a culture medium for increased xylanase production by a wild strain of *Schizophyllum commune*. *Enzyme Microb. Technol.* 15, 854-860.
- Bao, W. y Renganathan, V. (1992).** Cellobiose oxidase of *Phanerochaete chrysosporium* enhances crystalline cellulose degradation by cellulases. *FEBS Lett.* 302, 77-80.
- Bao, W., O'Malley, D. M., Whetten, R. y Sederoff, R. R. (1993a).** A laccase associated with lignification in Loblolly pine xylem. *Science* 260, 672-674.
- Bao, W., Usha, S. N. y Renganathan, V. (1993b).** Purification and characterization of cellobiose dehydrogenase, a novel hemoflavoenzyme from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* 300, 705-713.
- Barr, D. P. y Aust, S. D. (1994).** Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 28, 78A- 87A.
- Barr, D. P., Shah, M. M., Grover, T. A. y Aust, S. D. (1992).** Production of hydroxyl radical by lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* 298, 480-485.
- Barr, B. K., Hsieh, Y.-L., Ganem, B. y Wilson, D. B. (1996).** Identification of two functionally different classes of exocellulases. *Biochemistry* 35, 586-592.
- Barrasa, J. M., Gutiérrez, A., Escaso, V., Guillén, F., Martínez, M. J. y Martínez, A. T. (1998).** Electron and fluorescence microscopy of extracellular glucan and aryl-alcohol oxidase during wheat-straw degradation by *Pleurotus eryngii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 325-332.
- Beguin, P. y Aubert, J.-P. (1994).** The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.* 13, 25-38.
- Berg, B. y Petterson, G. (1977).** Location and formation of cellulases in *Trichoderma viride*. *J. Appl. Bacteriol.* 42, 65-73.
- Bernicchia, A. R. (1990).** *Polyporaceae s.l. in Italia*. Istituto di Patologia Vegetale. Università degli Studi, Bologna.
- Biely, P. (1985).** Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* 3, 286-290.

- Biely, P. (1991).** Biotechnological potential and production of xylanolytic systems free of cellulases. En: *Enzymes in biomass conversion*, pp. 408-416. G. F. Leatham y M. E. Himmel (eds.). American Chemical Society, Washington.
- Biely, P. (1993).** Biochemical aspects of the production of microbial hemicellulases. En: *Hemicellulose and hemicellulases*. pp. 29-52. M. P. Coughlan y G. P. Hazlewood (eds.). Portland Press, London.
- Biely, P., Heirichová, K. y Kruziková, M. (1996).** Induction and inducers of the pectolytic system in *Aureobasidium pullulans*. *Curr. Microbiol.* 33, 6-10.
- Bigelis, R. (1991).** Fungal enzymes in food processing. En: *Handbook of applied mycology*. K. G. Mukerji y E. H. Marth (eds.). Marcel Dekker Inc., New York.
- Biggs, A. R. (1992).** Anatomical and physiological responses of bark tissues to mechanical injury. En: *Defense mechanisms of woody plants against fungi*. pp. 13-40. R. A. Blanchette y A. R. Biggs (eds.). Springer-Verlag, Berlin.
- Bisaria, V. S. y Mishra, S. (1989).** Regulatory aspects of cellulase biosynthesis and secretion. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* 9, 61-103.
- Biswas, S. R., Mishra, A. K. y Nanda, G. (1988).** Xylanase and β -xylosidase production by *Aspergillus ochraceus* during growth on lignocelluloses. *Biotechnol. Bioeng.* 31, 613-616.
- Blais, P., Rogers, P. A. y Charest, P. M. (1992).** Kinetic of the production of polygalacturonase and pectin lyase by two closely related formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Exp. Mycol.* 16, 1-7.
- Blanchette, R. A. (1983).** An unusual decay pattern in brown-rotted wood. *Mycologia* 75, 552-556.
- Blanchette, R. A. (1984a).** Manganese accumulation in wood decayed by white rot fungi. *Phytopathology* 74, 153-160.
- Blanchette, R. A. (1984b).** Screening wood decayed by white rot fungi for preferential lignin degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 647-653.
- Blanchette, R. A. (1984c).** Selective delignification of eastern hemlock by *Ganoderma tsugae*. *Phytopathology* 64, 153-160.
- Blanchette, R. A. (1991).** Delignification by wood decay fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29, 381-398.
- Blanchette, R. A. (1992).** Anatomical responses of xylem to injury and invasion by fungi. En: *Defense mechanisms of woody plants against fungi*. pp. 76-95. R. A. Blanchette y A. R. Biggs (eds.). Springer-Verlag, Berlin.
- Blanchette, R. A. (1994).** Lignin biodegradation in cell walls of woody plant. En: *Host wall alterations by parasitic fungi*. pp. 55-65. O. Petrini y G. B. Ouellette (eds.). APS PRESS, Minnesota.
- Blanchette, R. A. (1995).** Degradation of the lignocellulose complex in wood. *Can. J. Bot.* 73 Suppl. 1, S999-S1010.
- Blanchette, R. A. y Reid, I. D. (1986).** Ultrastructural aspects of wood delignification by *Phlebia (Merulius) tremellosus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 239-245.

- Blanchette, R. A., Burnes, T. A., Leatham, G. F. y Effland, M. J. (1988a).** Selection of white rot fungi for biopulping. *Biomass* 15, 93-101.
- Blanchette, R. A., Obst, J. R., Hedges, J. L. y Weliky, K. (1988b).** Resistance of hardwood vessels to degradation by white rot Basidiomycetes. *Can. J. Bot.* 66, 1841-1847.
- Blanchette, R. A., Abad, A. R., Farrell, R. L. y Leathers, T. D. (1989).** Detection of lignin peroxidase and xylanase by immunocytochemical labeling in wood decayed by Basidiomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1457-1465.
- Blanchette, R. A., Nilsson, T., Daniel, G. y Abad, A. (1990).** Biological degradation of wood. En: *Archaeological wood: properties, chemistry and preservation*. R. M. Rowell y R. J. Barbour (eds.): Adv. Chem. Ser. 225.
- Blanchette, R. A., Akhtar, M. y Attridge, M. C. (1992a).** Using simons stain to evaluate fiber characteristics of biomechanical pulps. *Tappi J.* 75, 121-124.
- Blanchette, R. A., Burnes, T. A., Eerdmans, M. M. y Akhtar, M. (1992b).** Evaluating isolates of *Phanerochaete chrysosporium* and *Ceriporiopsis subvermispora* for use in biological pulping processes. *Holzforschung* 46, 109-115.
- Blanchette, R. A., Obst, J. R. y Timell, T. E. (1994).** Biodegradation of compression wood and tension wood by white and brown rot fungi. *Holzforschung* 48 Suppl., 34-42.
- Boddy, L. (1986).** Water and decomposition processes in terrestrial ecosystems. En: *Water, fungi and plants*. pp. 375-398. P. G. Ayres y L. Boddy (eds.). Cambridge Univ. Press., Cambridge.
- Boddy, L. (1991).** Importance of wood decay fungi in forest ecosystems. En: *Handbook of applied mycology*, vol.1, pp. 507-540. D. K. Arora, B. Rai, K. G. Mukerji y G. R. Knudsen (eds.). Marcel Dekker, New York.
- Bollag, J.-M., Shuttleworth, K. L. y Anderson, D. H. (1988).** Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 3086-3091.
- Bondarcev, A. (1953).** *The Polyporaceae of the European USSR and Caucasia*. Academy of Science USSR, Moscow.
- Bonnarme, P. y Jeffries, T. W. (1990).** Mn (II) regulation of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidases from lignin-degrading white rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 210-217.
- Bonnarme, P., Delattre, M., Drouet, H., Corrieu, G. y Asther, M. (1993).** Toward a control of lignin and manganese peroxidases hypersecretion by *Phanerochaete chrysosporium* in agitated vessels: evidence of the superiority of pneumatic bioreactors on mechanically agitated bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 41, 440-450.
- Bonnen, A. M., Anton, L. H. y Orth, A. B. (1994).** Lignin-degrading enzymes of the commercial button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 960-965.
- Boominathan, K. y Reddy, C. A. (1992).** Fungal degradation of lignin: biotechnological applications. En: *Handbook of applied mycology*, vol.4, pp. 763-822. D. K. Arora, R. P. Elander y K. G. Mukerji (eds.). Marcel Dekker, New York.
- Bourbounnais, R. y Paice, M. G. (1988).** Veratryl alcohol oxidases from the lignin-degrading Basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. *Biochem. J.* 255, 445-450.

- Bourbounnais, R. y Paice, M. G. (1990).** Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett.* 267, 99-102.
- Bourbounnais, R. y Paice, M. G. (1992).** Demethylation and delignification of Kraft pulp by *Trametes versicolor* laccase in the presence of 2,2'-azinobis- (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36, 823- 827.
- Bourbounnais, R., Paice, M. G., Reid, I. D., Lanthier, P. y Yaguchi, M. (1995).** Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1876-1880.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Broda, P., Birch, P. R. J., Brooks, P. R. y Sims, P. F. G. (1995).** PCR-mediated analysis of lignocellulolytic gene transcription by *Phanerochaete chrysosporium*: substrate-dependent differential expression within gene families. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2358-2364.
- Broda, P., Birch, P. R. J., Brooks, P. R. y Sims, P. F. G. (1996).** Lignocellulose degradation by *Phanerochaete chrysosporium*: gene families and gene expression for a complex process. *Mol. Microbiol.* 19, 923-932.
- Brown, D. E. (1983).** Lignocellulose hydrolysis. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 300, 305-322.
- Buchert, J., Ranua, M., Siika-aho, M., Pere, J. y Viikari, L. (1994).** *Trichoderma reesei* cellulases in the bleaching of Kraft pulp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40, 941-945.
- Bussink, H., Buxton, F., Fraaye, B., de Graaff, L. y Visser, J. (1992).** The polygalacturonases of *Aspergillus niger* are encoded by a family of diverged genes. *Eur. J. Biochem.* 208, 83-90.
- Buswell, J. A. (1991).** Fungal degradation of lignin. En: *Handbook of applied mycology*, vol.1, pp. 425-480. D. K. Arora, B. Rai, K. G. Mujerki y G. R. Knudsen (eds.). Marcel Dekker, New York.
- Buswell, J. A. y Odier, E. (1987).** Lignin biodegradation. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* 6, 1-59.
- Buswell, J. A., Cai, Y. J. y Chang, S. T. (1995).** Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. *FEMS Microbiol. Lett.* 128.
- Byrde, R. J. W. (1979).** Role of polysaccharide-degrading enzymes in microbial pathogenicity. En: *Microbial polysaccharides and polysaccharases*. pp. 417-436. R. C. W. Berkeley, G. W. Gooday y D. C. Ellwood (eds.). Academic Press, London.
- Cai, Y. J., Buswell, J. A. y Chang, S. T. (1994).** Production of cellulases and hemicellulases by the straw mushroom, *Volvariella volvacea*. *Mycol. Res.* 98, 1019-1024.
- Call, H. P. (1994).** Process for modifying, breaking down or bleaching lignin, materials containing lignin or like substances. World patent application WO 94/29510.
- Call, H. P. y Mucke, L. (1994).** State of the art of enzyme bleaching and disclosure of a breakthrough process. En: *International non-chlorine-bleaching conference proceedings*. pp. 1-6. I. Miller Freeman (ed.). San Francisco, California.

- Canevascini, G., Coudray, M. R., Rey, J. P., Southgate, R. J. G. y Meier, H. (1979).** Induction and catabolite repression of cellulase synthesis in the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile*. *J. Gen. Microbiol.* 110, 291-303.
- Caprari, C., Bergmann, C., Micheli, Q., Salvi, C., Alberheim, P., Darvill, A., Cervone, F. y De Lorenzo, G. (1993).** *Fusarium moniliforme* secretes four endopolygalacturonases derived from a single gene product. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 43, 453-462.
- Carle-Urioste, J. C., Escobar-Vera, J., El-Gogary, S., Henrique-Silva, F., Torigoi, E., Crivellaro, O., Herrera-Estrella, A. y El-Dorry, H. (1997).** Cellulase induction in *Trichoderma reesei* by cellulose requires its own basal expression. *J. Biol. Chem.* 272, 10169-10174.
- Chahal, D. S. (1994).** Biological disposal of lignocellulosic wastes and alleviation of their toxic effluents. En: *Biological degradation and bioremediation of toxic chemicals*. pp. 364-385. G. R. Chaudhry (ed.). Chapman and Hall, London.
- Chanzy, H. (1990).** Aspects of cellulose structure. En: *Cellulose sources and exploitation. Industrial utilization, biotechnology and physico-chemical properties*. pp. 3-12. J. F. Kennedy, G. O. Phillips y P. A. Williams (eds.). Ellis Horwood.
- Chanzy, H., Henrissat, B., Voung, R. y Schülein, M. (1983).** The action of 1,4- β -D-glucan cellobiohydrolase on *Valonia* cellulose microcrystals. An electron microscope study. *FEBS Lett.* 153, 113-118.
- Chen, C.-I. y Chang, H.-M. (1985).** Chemistry of lignin biodegradation. En: *Biosynthesis and biodegradation of wood components*. pp. 535-556. T. Higuchi (ed.). Academic Press, Orlando, Florida.
- Chen, S. y Wayman, M. (1992).** Novel inducers derived from starch for cellulase production by *Trichoderma reesei*. *Process. Biochem.* 27, 327-334.
- Collins, P. J. y Dobson, A. D. W. (1995).** Extracellular lignin and manganese peroxidase production by the white-rot fungus *Coriolus versicolor* 290. *Biotechnol. Lett.* 17, 989-992.
- Collins, P. J. y Dobson, A. D. W. (1996).** Oxidation of fluorene and phenanthrene by Mn(II) dependent peroxidase activity in whole cultures of *Trametes (Coriolus) versicolor*. *Biotechnol. Lett.* 18, 801-804.
- Collins, P. J. y Dobson, A. D. W. (1997).** Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3444-3450.
- Collmer, A. y Keen, N. T. (1986).** The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Ann. Phytopathol.* 24, 383-409.
- Cooper, R. M. y Wood, R. K. S. (1973).** Induction of synthesis of extracellular cell wall degrading enzymes in vascular wilt fungi. *Nature* 246, 309-311.
- Cooper, R. M. (1983).** The mechanisms and significance of enzyme degradation of host cell walls. En: *Biochemical plant pathology*. pp. 101-137. J. A. Callow (ed.). Wiley, New York.
- Copa-Patiño, J. L., Young, G. K. y Broda, P. (1993).** Production and initial characterisation of the xylan-degrading system of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40, 69-76.

- Cor, F. B., Witteveen, B., Vennhuis, M. y Visser, R. (1992).** Localization of glucose oxidase and catalase activities in *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1190-1194.
- Cotoras, M. y Agosin, E. (1992).** Regulatory aspects of endoglucanase production in the brown rot fungus *Gloeophyllum trabeum*. *Exp. Mycol.* 16, 253-260.
- Coughlan, M. P. (1985).** The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 3, 39-109.
- Coughlan, M. P. y Ljungdahl, L. G. (1988).** Comparative biochemistry of fungal and bacterial cellulolytic enzyme systems. En: *Biochemistry and genetics of cellulose degradation*. pp. 11-31. J. P. Aubert, P. Beguin y J. Millet (eds.). Academic Press, New York.
- Coughlan, M. P. y Hazlewood, G. P. (1993).** β -1,4-D-xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 17, 259-289.
- Cowling, E. B. (1961).** Comparative biochemistry of the decay of sweetgum sapwood by white rot fungi and brown rot fungi. *USDA Technical Bulletin* 1258.
- Crawford, M. S. y Kolattukudy, P. E. (1987).** Pectate lyase from *Fusarium solani* f. sp. *pisi*: purification, characterization, in vitro translation of the mRNA, and involvement in pathogenicity. *Arch. Biochem. Biophys.* 258, 196-205.
- Cui, F., Dolphin, D., Wijesekera, T., Farrell, R. y Skerker, P. (1990).** En: *Biotechnology in the pulp and paper manufacture. Applications and fundamental investigations*. pp. 481-491. T. K. Kirk y H. M. Chang (eds.). Butter-worth-Heinem, Boston.
- Daniel, G. (1994).** Use of electron microscopy for aiding our understanding of wood biodegradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 13, 199-233.
- Daniel, G. y Nilsson, T. (1989).** Interactions between soft rot fungi and CCA preservatives in *Betula verrucosa*. *J. Inst. Wood Sci.* 11, 162-171.
- Daniel, G., Petterson, B., Nilsson, T. y Volc, J. (1990).** Use of immunogold cytochemistry to detect Mn(II)-dependent and lignin peroxidases in wood degraded by the white rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Lentinula edodes*. *Can. J. Bot.* 68, 920-933.
- Daniel, G., Volc, J., Kubatova, E. y Nilsson, T. (1992).** Ultrastructural and immunocytochemical studies on the H₂O₂-producing enzyme pyranose oxidase in *Phanerochaete chrysosporium* grown under liquid culture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3667-3676.
- Daniel, G., Volc, J. y Kubatova, E. (1994).** Pyranose oxidase, a major source of H₂O₂ during wood degradation by *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, and *Oudemansiella mucida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2524-2532.
- D'Annibale, A., Crestini, C., Di Mattia, E. y Sermani, G. G. (1996).** Veratryl alcohol oxidation by manganese-dependent peroxidase from *Lentinus edodes*. *J. Biotechnol.* 48, 231-239.
- Datta, A., Bettermann, A. y Kirk, T. K. (1991).** Identification of a specific manganese peroxidase among ligninolytic enzymes secreted by *Phanerochaete chrysosporium* during wood decay. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1453-1460.

- de Jong, E., Field, J. A. y de Bont, J. A. M. (1992).** Evidence for a new extracellular peroxidase. Manganese-inhibited peroxidase from the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. BOS 55. *FEBS Lett.* 299, 107-110.
- de Jong, E., Cazemier, A. E., Field, J. A. y de Bont, J. A. M. (1994a).** Physiological role of chlorinated aryl alcohols biosynthesized de novo by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 271-277.
- de Jong, E., Field, J. A. y de Bont, J. A. M. (1994b).** Aryl alcohols in the physiology of ligninolytic fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 13, 153- 188.
- De Lorenzo, G., Salvi, G., Degrá, L., D'Ovidio, R. y Cervone, F. (1987).** Induction of extracellular polygalacturonase and its mRNA in the phytopathogenic fungus *Fusarium moniliforme*. *J. Gen. Microbiol.* 133, 3365-3373.
- Dean, R. A. y Timberlake, W. E. (1989).** Regulation of the *Aspergillus nidulans* pectate lyase gene (pel A). *Plant Cell* 1, 275-284.
- Degefu, Y., Fagerstrom, R. y Kalkkinen, N. (1995).** Purification and partial characterization of xylanase from the fungal maize pathogen *Helminthosporium turcicum* (Pass). *Eur. J. Plant Path.* 101, 291-299.
- Deguchi, T., Kakezawa, M. y Nishida, T. (1997).** Nylon biodegradation by lignin-degrading fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 329-331.
- Deguchi, T., Kitaoka, Y., Kakezawa, M. y Nishida, T. (1998).** Purification and characterization of a nylon-degrading enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1366-1371.
- Deising, H., Frittrang, A. K., Kunz, S. y Mendgen, K. (1995).** Regulation of pectin methylesterase and polygalacturonate lyase activity during differentiation of infection structures in *Uromyces viciae-fabae*. *Microbiology* 141, 561-571.
- Dekker, R. F. H. y Richards, G. N. (1976).** Hemicellulases: their occurrence, purification, properties and mode of action. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 32, 277-352.
- Desrochers, M., Jurasek, L. y Paice, M. G. (1981).** High production of β -glucosidase in *Schizophyllum commune*. Isolation of the enzyme effect of the culture filtrate on cellulose hydrolysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 222-228.
- Diem, K. (1973).** *Tablas científicas*. Ciba Geigy 6a Ed., Basilea.
- Dix, N. J. y Webster, J. (1995).** *Fungal ecology*. Chapman and Hall, London.
- Dosoretz, C. y Grethlein, H. E. (1991).** Physiological aspects of the regulation of extracellular enzymes of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 28, 253-265.
- D'Souza, J. y Vollova, O. (1982).** The effect of pH on the production of cellulases in *Aspergillus terreus*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 16, 123-125.
- Duff, S. J. B. y Murray, W. D. (1996).** Bioconversion of forest products industry waste cellulosics to fuel ethanol: a review. *Biores. Technol.* 55, 1-33.
- Eaton, R. A. y Hale, M. D. C. (1993).** *Wood: decay pests and protection*. Chapman and Hall, London.

- Eggert, C., Temp, U., Dean, J. F. D. y Eriksson, K.-E. L. (1996a).** A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Lett.* 391, 144-148.
- Eggert, C., Temp, U. y Eriksson, K.-E. L. (1996b).** The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1151-1158.
- Enari, T. M. y Niku-Paalova, M. L. (1987).** Enzymatic hydrolysis of cellulose: Is the current theory of the mechanism of hydrolysis valid? *CRC Crit. Revs. Biotechnol.* 5, 67-87.
- Eriksson, K.-E. (1978).** Enzyme mechanisms involved in cellulose hydrolysis by the rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Biotech. Bioeng.* 20, 317-332.
- Eriksson, K.-E. y Petterson, B. (1982).** Purification and partial characterization of two acidic proteases from the white rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Eur. J. Biochem.* 124, 635-642.
- Eriksson, K.-E., Petterson, B., Volc, J. y Musilek, V. (1986).** Formation and partial characterization of glucose 2-oxidase a H₂O₂ producing enzyme in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23, 257-262.
- Eriksson, K.-E., Blanchette, R. A. y Ander, P. (1990).** *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components*. Springer-Verlag, New York.
- Esau, K. (1977).** *Anatomy of seed plants*. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Eslyn, W. E., Kirk, T. K. y Effland, M. J. (1975).** Changes in the chemical composition of wood caused by six soft-rot fungi. *Phytopathology* 65, 473-476.
- Espejo, E. y Agosin, E. (1991).** Production and degradation of oxalic acid by brown rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1980-1986.
- 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.
- Faison, B. D. y Kirk, T. K. (1985).** Factors involved in the regulation of a ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 251-154.
- Faix, O., Mozuch, M. D. y Kirk, T. K. (1985).** Degradation of gymnosperm (guaiacyl) vs. angiosperm (syringyl/guaiacyl) lignins by *Phanerochaete chrysosporium*. *Holzforschung* 39, 203-208.
- Farrell, B. L. (1987).** Industrial applications of lignin-transforming enzymes. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 321, 549-553.
- Farrell, R. L., Murtagh, K. E., Tien, M., Mozuch, M. D. y Kirk, T. K. (1989).** Physical and enzymatic properties of lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microb. Technol.* 11, 322-328.
- Fenn, P. y Kirk, T. K. (1981).** Relationship of nitrogen to the onset and suppression of lignolytic activity and secondary metabolism in *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* 130, 59-65.
- Fernandez, N., Patiño, B. y Vazquez, C. (1993).** Pectin degrading enzymes secreted by six isolates of *Fusarium oxysporum*. *Mycol. Res.* 97, 461-466.

- Fernando, T. y Aust, S. D. (1994).** Biodegradation of toxic chemicals by white rot fungi. En: *Biological degradation and bioremediation of toxic chemicals*. pp. 386-402. G. R. Chaudhry (ed.). Chapman and Hall, London.
- Findlay, W. P. K. (1967).** *Timber pests and diseases*. Pergamon series of monographs on furniture and timber. Pergamon Press, London.
- Fluornoy, D. S., Paul, J. A., Kirk, T. K. y Highley, T. L. (1993).** Changes in the size and volume of pores in sweetgum wood during simultaneous rot by *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Holzforschung* 47, 297-301.
- Fogarty, W. M. y Kelly, C. T. (1983).** Pectic enzymes. En: *Microbial enzymes and biotechnology*. pp. 131-182. W. M. Fogarty (ed.). Applied Science Publishers, London.
- Fonseca, M. J. V. y Said, S. (1995).** Sequential production of pectinases by *Penicillium frequentans*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 11, 174-177.
- Forney, L. J., Reddy, C. A. y Pankratz, H. A. (1982).** Ultrastructural localization of hydrogen peroxide production in ligninolytic cells of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 732-736.
- Fraissinet-Tachet, L. y Fevre, M. (1996).** Regulation by galacturonic acid of pectinolytic enzyme production by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Curr. Microbiol.* 33, 49-53.
- Freer, S. N. y Greene, R. V. (1990).** Transport of glucose and cellobiose by *Candida wickerhamii* and *Clavispora lusitaniae*. *J. Biol. Chem.* 265, 12864-12868.
- Fritscher, C., Messner, R. y Kubicek, C. P. (1990).** Cellobiose metabolism and cellobiohydrolase I biosynthesis by *Trichoderma reesei*. *Exp. Mycol.* 14, 405-415.
- Gaikwad, J. S. y Maheshwari, R. (1994).** Localization and release of β -glucosidase in the thermophilic and cellulolytic fungus, *Sporotrichum thermophile*. *Exp. Mycol.* 18, 300-310.
- Gallagher, M. L. y Evans, C. S. (1990).** Immunogold cytochemical labelling of β -glucosidase in the white-rot fungus *Coriolus versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32, 588-593.
- Galliano, H., Gas, G. y Boudet, A. M. (1991).** Lignin degradation by *Rigidoporus lignosus* involves synergistic action of two oxidizing enzymes-Mn peroxidase and laccase. *Enzyme Microb. Technol.* 13, 478-482.
- Gamerith, G. R., Groicher, R., Zeilinger, S., Herzog, P. y Kubicek, C. P. (1992).** Cellulase-poor xylanases produced by *Trichoderma reesei* RUT C-30 on hemicellulose substrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38, 315-322.
- García Sola, E. (1974).** Acción de hongos xilófagos sobre 8 maderas del bosque chaqueño. Resistencia natural y después de lavadas. Departamento de Física-química y geociencias, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Nordeste (Resistencia, Argentina), 1-11.
- Garg, S. K. y Neelakanian, S. (1981).** Effect of cultural factors on cellulase activity and protein production by *Aspergillus terreus*. *Biotechnol. Bioeng.* 23, 1654-1659.
- Gilbertson, R. L. (1980).** Wood-rotting fungi in North America. *Mycologia* 72, 1-49.

- Gilkes, N. R., Henrissat, B., Kilburn, D. G., Miller, R. C. y Warren, A. J. (1991).** Domains in microbial β -1,4-glycanases: sequence, conservation, function and enzyme families. *Microbiol. Rev.* 55, 303-315.
- Gillespie, A. M. y Coughlan, M. P. (1989).** The pectin-degrading system of *Penicillium capsulatum*: characterization of an extracellular polygalacturonase from solid-state cultures. *Biochem. Soc. Trans.* 17, 384-386.
- Glenn, J. K. y Gold, M. H. (1985).** Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading Basidiomycetes *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* 242, 329-341.
- 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.
- Gold, M. H. y Alic, M. (1993).** Molecular biology of the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiol. Rev.* 57, 605-622.
- Golovleva, L. A., Maltseva, O. V., Myasoedova, N. M. y Leontievsky, A. A. (1986).** *Panus tigrinus*-144 degrading lignin. En: *Proc. 3rd Internat. Conf. on biotechnology in the pulp and paper industry*. pp. 28-30. STFi/SPCI, Stockholm.
- Gomori, G. (1955).** Preparations of buffers for use in enzyme studies. *Methods Enzymol.* 1, 138-146.
- Gonzalez-Candelas, L. y Kolattukudy, P. E. (1992).** Isolation and analysis of a novel inducible pectate lyase gene from the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (*Nectria haematococca*, mating population VI). *J. Bacteriol.* 174, 6343-6349.
- Gram, K. y Jorgensen, E. (1953).** An easy, rapid, and efficient method of counterstaining plant tissues and hyphae in wood sections by means of fast green or light green and safranin. *Friesia* 4, 262-266.
- Green, R. V. y Gould, J. M. (1984).** Fatty acyl-coenzyme A oxidase activity and H_2O_2 production in *Phanerochaete chrysosporium* mycelia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 118, 437-443.
- Green III, F., Clausen, C. A., Larsen, M. J. y Highley, T. L. (1992).** Immunoscanning electron microscopic localization of extracellular wood-degrading enzymes within the fibrillar sheath of the brown-rot fungus *Postia placenta*. *Can. J. Microbiol.* 38, 898-904.
- Guillen, F., Reyes, F., Rodriguez, J. y Vazquez, C. (1987).** Induction of an extracellular cellulase system during autolysis of *Alternaria alternata*. *Trans. Br. mycol. Soc.* 89, 35-39.
- Guillen, F., Martínez, A. F. y Martínez, M. T. (1990).** Production of hydrogen peroxide by aryl-alcohol oxidase from ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32, 465-469.
- Gum, E. K. y Brown, R. D. (1977).** Comparison of four purified extracellular 1,4- β -D-glucan cellobiohydrolase enzymes from *Trichoderma viride*. *Biochim. Biophys. Acta* 492, 225-231.
- Haars, A. y Hüttermann, A. (1983).** Laccase induction in the white rot fungus *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. (*Fomes annosum* Fr. Cooke). *Arch. Microbiol.* 134, 309-315.

- Habu, N., Igarashi, K., Samejima, M., Pettersson, B. y Eriksson, K.-E. (1997).** Enhanced production of cellobiose dehydrogenase in cultures of *Phanerochaete chrysosporium* supplemented with bovine calf serum. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 26, 97-102.
- Haemmerli, S. D., Leisola, M. S. A. y Fiechter, A. (1986).** Polymerisation of lignin by ligninases from *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 35, 33-36.
- Halliwell, G. y Lovelady, J. J. (1981).** Utilization of carboxymethylcellulose and enzyme synthesis by *Trichoderma koningii*. *J. Gen. Microbiol.* 126, 211-217.
- Haltrich, D., Preiss, M. y Steiner, W. (1993).** Optimization of a culture medium for increased xylanase production by a wild strain of *Schizophyllum commune*. *Enzyme Microb. Technol.* 15, 854-860.
- Hammel, K. E. (1989).** Organopollutant degradation by ligninolytic fungi. *Enzyme Microb. Technol.* 11, 776-777.
- Hammel, K. E. y Moen, M. A. (1991).** Depolymerization of a synthetic lignin in vitro by lignin peroxidase. *Enzyme Microb. Technol.* 13, 15-18.
- Hammel, K. E., Tien, M., Kalyanaraman, B. y Kirk, T. K. (1985).** Mechanism of oxidative C-C cleavage of a lignin model dimer by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase: stoichiometry and involvement of free radicals. *J. Biol. Chem.* 260, 8348-8353.
- Hammel, K. E., Jensen, K. A. J., Mozuch, M. D., Landucc, L. L., Tien, M. y Pease, E. A. (1993).** Ligninolysis by a purified lignin peroxidase. *J. Biol. Chem.* 268, 12274-12281.
- Hammel, K. E., Mozuch, M. D., Jensen, K. A. y Kersten, P. J. (1994).** H₂O₂ recycling during oxidation of the arylglycerol β-aryl ether lignin structure by lignin peroxidase and glyoxal oxidase. *Biochemistry* 33, 13349-13354.
- Hartig, R. (1878).** Die Zersetzungserscheinungen des Holzes der Nadelholzbaume und der Eiche. En: Forslicher, botanischer und chemischer Richtung. Springer, Berlin.
- Harvey, P. J., Schoemaker, H. E. y Palmer, M. J. (1986).** Veratryl alcohol as a mediator and the role of radical cations in lignin biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* 243, 165-168.
- Hatakka, A. (1985).** Degradation of veratric acid and other lignin-related aromatic compounds by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Arch. Microbiol.* 141, 22-28.
- Hatakka, A. (1994).** Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 13, 125-135.
- Hatakka, A. y Uusi-Rauva, A. (1983).** Degradation of ¹⁴C-labelled poplar wood lignin by selected white-rot fungi. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17, 235-242.
- Hatakka, A., Lundell, T., Mohammadi, O. y Tervila-Wilo, A. L. M. (1989).** Activities of lignin-degrading enzymes of the white-rot fungus *Phlebia radiata*: lignin model compound studies. En: *Proc. 4th Internat. Conf. on biotechnology in the pulp and paper industry.* pp. 108-109. Raleigh, North Carolina.
- Henrissat, B., Driguez, H., Viet, C. y Schülein, M. (1985).** Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose. *BioTechnol.* 3, 722-726.

- Highley, T. L. (1975).** Properties of cellulases of two brown-rot fungi and two white-rot fungi. *Wood and Fiber* 6, 275-281.
- Highley, T. L. (1977).** Requirements for cellulose degradation by a brown rot fungus. *Mater. Org.* 12, 25-36.
- Highley, T. L. (1978).** Degradation of cellulose by culture filtrates of *Poria placenta*. *Mater. Org.* 12, 161-174.
- Highley, T. L. (1982).** Influence of type and amount of lignin on decay by *Coriolus versicolor*. *Can. J. For. Res.* 12, 435-438.
- Highley, T. L. e Ilman, B. L. (1991).** Progress in understanding how brown-rot fungi degrade cellulose. *Biodeterior. Abstr.* 5, 231-244.
- Higuchi, T. (1985).** Biosynthesis of lignin. En: *Biosynthesis and biodegradation of wood components*. pp. 141-161. T. Higuchi (ed.). Academic Press, Florida.
- Higuchi, T. (1989).** Mechanisms of lignin degradation by lignin peroxidase and laccase of white-rot fungi. En: *Plant cell wall polymers*, vol.309, pp. 482-502. N. G. Lewis y M. G. Paice (eds.). American Chemical Society, Washington.
- Higuchi, T. (1990).** Lignin biochemistry biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci. Technol.* 24, 23-63.
- Hofrichter, M. y Fritsche, W. (1997).** Depolymerization of low-rank coal by extracellular fungal enzyme systems. III. In vitro depolymerization of coal humic acids by a crude preparation of manganese peroxidase of the white-rot fungus *Nematoloma frowardii* b19. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 576-571.
- Holzbaur, E. L. F., Andrawis, A. y Tien, M. (1988).** Structure and regulation of a lignin peroxidase gene from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155, 626-633.
- Hrmova, M., Biely, P. y Vrsanka, M. (1986).** Specificity of cellulase and β -xylanase induction in *Trichoderma reesei* QM 9414. *Arch. Microbiol.* 144, 307-311.
- Hrmova, M., Biely, P. y Vrsanka, M. (1989).** Cellulose and xylan degrading enzymes of *Aspergillus terreus* and *Aspergillus niger*. *Enzyme Microb. Technol.* 11, 610-616.
- Hrmova, M., Petrakova, E. y Biely, P. (1991).** Induction of cellulose and xylan-degrading enzyme systems in *Aspergillus terreus* by homo and heterodisaccharides composed of glucose and xylose. *J. Gen. Microbiol.* 137, 541-547.
- Huang, L., Hseu, T.-H. y Wey, T. T. (1991).** Purification and characterization of an endoxylanase from *Trichoderma koningii* G-39. *Biochem J.* 278, 329-333.
- Hugouvieux, V., Centis, S., Lafitte, C. y Esquerre-Tugaye, M. T. (1997).** Induction by α -L-arabinose and α -L-rhamnose of endopolygalacturonase gene expression in *Colletotrichum lindemuthianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2287-2292.
- Hulne, M. A. y Stranks, D. W. (1970).** Induction and the regulation of production of cellulase by fungi. *Nature* 226, 469-470.

- Hulme, M. A. y Stranks, D. W. (1971).** Regulation of cellulase production by *Myrothecium verrucaria* grown on non cellulosic substrates. *J. Gen. Microbiol.* 69, 145-155.
- Hung, B. R., Lara, L., Paltron, M. A., Ugarova, N. N., Bechstedt, W. y Clappes, S. (1988).** Tween 80 and proteose peptone effect on cellulase production. *Acta Biotechnol.* 8, 461-464.
- Illman, B. L. y Highley, T. L. (1989).** Decomposition of wood by brown-rot fungi. En: *Biodeterioration research II.* pp. 465-484. C. E. O'Rear y G. C. Llewellyn (eds.). Plenum Press, New York.
- Ilmén, M., Saloheimo, A., Onnela, M. L. y Penttilä, M. E. (1997).** Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1298-1306.
- Jackson, M. A. y Talburt, D. E. (1988).** Mechanism for β -glucosidase release into cellulose grown *Trichoderma reesei* culture supernatants. *Exp. Mycol.* 12, 203-216.
- Jafelice, L. R. S., Wiseman, A. y Goldfarb, P. (1990).** Exocellular and intracellular β -glucosidase produced in ligninolytic culture of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Soc. Trans.* 18, 644-645.
- Janshekar, H. y Fiechter, A. (1988).** Cultivation of *Phanerochaete chrysosporium* and production of lignin peroxidases in submerged stirred tank reactors. *J. Biotechnol.* 8, 97-112.
- Jeffries, T. W., Choi, S. y Kirk, T. K. (1981).** Nutritional regulation of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 42, 290-296.
- Jensen, K. A. J., Bao, W. B., Kawai, S., Srebotnik, E. y Hammel, K. E. (1996).** Manganese-dependent cleavage of nonphenolic lignin structures by *Ceriporiopsis subvermispota* in the absence of lignin peroxidase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3679-3686.
- Job, D. J. y Wright, J. E. (1986).** Experimental wood-rot of *Salix humboldtiana* blocks by species of *Hymenochaete* (Aphyllphorales). *Mater. Org.* 21, 301-310.
- Job, D. J. y Rajchenberg, M. (1988).** Experimental wood-rot of *Salix humboldtiana* blocks by species of *Phellinus* Qué. (Aphyllphorales). *Mater. Org.* 23, 21-29.
- Johansen, D. A. (1940).** *Plant microtechnique*. Mc Graw Hill, New York.
- Johansson, M. (1988).** Pectic enzyme activity of spruce (S) and pine (P) strains of *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 33, 333-349.
- John, M. y Schmidt, J. (1988).** Xylanases and β -xilosidase of *Trichoderma lignorum*. *Methods Enzymol.* 160, 663-671.
- Joseleau, J.-P. y Ruel, K. (1994).** Wood polysaccharides and their degradation by fungi. En: *Host wall alterations by parasitic fungi.* pp. 45-65. O. Petrini y G. B. Ouellette (eds.). APS Press, Minnesota.
- Jung, H.-J. G., Valdez, F. R., Abad, A. R., Blanchette, R. A. y Hatfield, R. D. (1992).** Effect of white rot Basidiomycetes on chemical composition and in vitro digestibility of oat straw and alfalfa stems. *J. Anim. Sci.* 70, 1928-1935.

- Kaal, E. E. J., de Jong, E. y Field, J. A. (1993).** Stimulation of ligninolytic peroxidase activity by nitrogen nutrients in the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS 55. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 4031-4036.
- Kawamori, M., Morikawa, Y. y Takasawa, S. (1986).** Induction and production of cellulases by L-sorbose in *Trichoderma reesei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24, 449-453.
- Kelley, R. L. y Reddy, C. A. (1986).** Identification of glucose oxidase activity as a primary source of hydrogen peroxide production in ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* 414, 248-253.
- Kelley, R. L. y Reddy, C. A. (1988).** Glucose oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods Enzymol.* 161B, 307-316.
- Kerem, Z. y Hadar, Y. (1993).** Effect of manganese on lignin degradation by *Pleurotus ostreatus* during solid-state fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 4115-4120.
- Kersten, P. J. (1990).** Glyoxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: its characterization and activation by lignin peroxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2936-2940.
- Kersten, P. J. y Kirk, T. K. (1987).** Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase in extracellular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.* 169.
- Kersten, P. J., Tien, M., Kalyanaraman, B. y Kirk, T. K. (1985).** The ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* generates cation radicals from methoxybenzenes. *J. Biol. Chem.* 260, 2609-2612.
- Kerzezs, L. (1955).** Pectic enzymes. *Methods Enzymol.* 1, 158-166.
- Khandke, K. M., Vithayathil, P. J. y Murthy, S. K. (1989).** Purification of xylanase, β -glucosidase, endocellulase and exocellulase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 274, 491-500.
- Kirk, T. K. (1983).** Degradation and conversion of lignocelluloses. En: *The filamentous fungi*, vol.4, pp. 266-295. J. E. Smith, D. R. Berry y P. Kristiansen (eds.). London.
- Kirk, T. K. (1985).** The discovery and promise of lignin-degrading enzymes. En: *New horizons for biotechnological utilization of the forest resource*. pp. 27-42: Marcus Wallenberg Found. Symp. Proc. N° 2.
- Kirk, T. K. (1988).** Biochemistry of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. En: *Biochemistry and genetics of cellulose degradation*. pp. 315-332. J.-P. Aubert, P. Beguin y J. Millet (eds.). Academic Press, London.
- Kirk, T. K. y Yang, H. H. (1979).** Partial delignification of unbleached Kraft pulp with ligninolytic fungi. *Biotechnol. Lett.* 1, 347-352.
- Kirk, T. K. y Farrell, R. L. (1987).** Enzymatic combustion: The microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* 41, 465-505.
- Kirk, T. K., Chang, H.-M. y Lorenz, L. F. (1975).** Topochemistry of the fungal degradation of lignin in birch wood as related to the distribution of guaiacyl and syringyl lignins. *Wood Sci. Technol.* 9, 81-86.

- Kirk, T. K., Schultz, E., Connors, W., Lorenz, L. y Zeikus, J. (1978).** Influence of culture parameters of lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* 117, 277-285.
- Kirk, T. K., Croan, A., Tien, M., Murtagh, K. E. y Farrell, R. L. (1986).** Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. *Enzyme Microb. Technol.* 8, 27-32.
- Kirk, T. K., Ibach, R. E., Mozuch, M. D., Conner, A. H. y Highley, T. L. (1991).** Characteristics of cotton cellulose depolymerized by a brown-rot fungus, by acid, or by chemical oxidants. *Holzforschung* 45, 239-244.
- Kitpreechavanich, V., Mitsunori, H. y Nagai, S. (1986).** Purification and characterization of extracellular β -xylosidase and β -glucosidase from *Aspergillus niger*. *Agric. Biol. Chem.* 50, 1703-1711.
- Kleman-Leyer, K., Agosin, E., Conner, A. H. y Kirk, T. K. (1992).** Changes in molecular size distribution of cellulose during attack by white rot and brown rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1266-1270.
- Kysliková, E. y Volfová, O. (1981).** Cell growth and cellulase production in *Trichoderma viride* on microcrystalline cellulose. *Folia Microbiol.* 26, 303-308.
- Knowles, J. K. C., Teeri, T. T., Lehtovaara, P., Penttila, M. y Saloheimo, M. (1988).** The use of gene technology to investigate fungal cellulolytic enzymes. En: *Biochemistry and genetics of cellulose degradation*. pp. 153-169. J. P. Aubert, P. Beguin y J. Millet (eds.). Academic Press, London.
- Koduri, R. S. y Tien, M. (1994).** Kinetic analysis of lignin peroxidase-explanation for the mediation phenomen by veratryl alcohol. *Biochemistry* 33, 4225-4230.
- Koenigs, J. W. (1975).** Hydrogen peroxide and iron: A microbial cellulolytic system. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 5, 151-159.
- Kondo, R., Imori, T., Imanura, H. y Nishida, T. (1990).** Polymerization of DHP and depolymerization of DHP-glucoside by lignin oxidizing enzymes. *Bio/Technology* 13, 181-188.
- Kondo, R., Kurashiki, K. y Sakai, K. (1994).** In vitro bleaching of hardwood Kraft pulp by extracellular enzymes excreted from white rot fungi in a cultivation system using a membrane filter. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 921-926.
- Kremer, S. M. y Wood, P. M. (1992a).** Evidence that cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* is primarily an Fe(III) reductase. *Eur. J. Biochem.* 205, 133-138.
- Kremer, S. M. y Wood, P. M. (1992b).** Production of Fenton's reagent by cellobiose oxidase from cellulolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Eur. J. Biochem.* 208, 807-814.
- Kubicek, C. P., Messner, R., Gruber, F., Mach, R. L. y Kubicek-Pranz, E. M. (1993a).** The *Trichoderma* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. *Enzyme Microb. Technol.* 15, 90-99.
- Kubicek, C. P., Messner, R., Gruber, F., Mandels, M. y Kubicek-Pranz, E. M. (1993b).** Triggering of cellulase biosynthesis by cellulose in *Trichoderma reesei*. *J. Biol. Chem.* 268, 19364-19368.

- Kurek, B., Monties, B. y Odier, E. (1990).** Influence of the physical state of lignin on its degradability by the lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microb. Technol.* 12, 771-777.
- Kurek, B. y Kersten, P. J. (1995).** Physiological regulation of glyoxal oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* by peroxidase systems. *Enzyme Microb. Technol.* 17, 751-756.
- Lackner, R., Srebotnik, E. y Messner, K. (1991).** Oxidative degradation of high molecular chlorolignin by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178, 1092-1098.
- Lamar, R. T., Glaser, J. A. y Kirk, T. K. (1992).** White-rot fungi in the treatment of hazardous chemicals and wastes. En: *Frontiers of industrial mycology*. pp. 127-143. G. F. Leatham (ed.). Chapman and Hall, New York, London.
- Lang, E., Nerud, F., Novotná, E., Zadrazil, F. y Martens, R. (1996).** Production of ligninolytic exoenzymes and ¹⁴C-pyrene mineralization by *Pleurotus* sp. in lignocellulose substrate. *Folia Microbiol.* 41, 489-493.
- Leatham, G. F. y Kirk, T. K. (1983).** Regulation of ligninolytic activity by nutrient nitrogen in white-rot Basidiomycetes. *FEMS Microbiol. Lett.* 16, 65-67.
- Leisola, M. S. A., Kozulic, B., Meusdoerffer, F. y Fiechter, A. (1987).** Homology among multiple extracellular peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* 262, 419-424.
- Leone, G. y van den Heuvel, J. (1987).** Regulation by carbohydrates of the sequential in vitro production of pectic enzymes by *Botrytis cinerea*. *Can. J. Bot.* 65, 2133-2141.
- Leonowicz, A., Trojanowski, J. y Orlicz, B. (1978).** Induction of laccase in Basidiomycetes. Apparent activity of the inducible and constitutive forms of the enzyme with phenolic substrates. *Acta Biochim. Polon.* 25, 369-378.
- Lestan, D., Lestan, M. y Perdih. (1994).** Physiological aspects of biosynthesis of lignin peroxidases by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 606-612.
- Levi, M. P., Merrill, W. y Cowling, E. B. (1968).** Role of nitrogen in wood deterioration. VI. Mycelial fractions and model nitrogen compounds as substrates for growth of *Polyporus versicolor* and other wood destroying and wood inhabiting fungi. *Phytopathology* 58, 626-634.
- Levin, L. N., Nadal, M. S., Forchiassin, F. y Galvagno, M. A. (1992).** Estudios nutricionales en *Trametes trogii* (Aphylliphorales, Basidiomycetes). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 28, 19-25.
- Liese, W. (1970).** Ultrastructural aspects of woody tissue disintegration. *Annu. Rev. Phytopathol.* 8, 231-257.
- Lilly, V. G. y Barnett, H. L. (1951).** *Physiology of the fungi*. McGraw Hill, New York.
- Lima, C. E. y Mercuri, O. A. (1984).** Ensayos de nutrición en *Ascobolus furfuraceus*. Fuentes de nitrógeno. *Rev. Arg. Microbiol.* 16, 177-186.
- Lin, E. y Wilson, D. B. (1987).** Regulation of β -1,4-endoglucanase synthesis in *Thermonospora fusca*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1352-1357.

- Lisker, N., Katan, J. y Henis, Y. (1975).** Sequential production of polygalacturonase, cellulase and pectin lyase by *Rhizoctonia solani*. *Can. J. Microbiol.* 21, 1298-1304.
- Loborzewski, J. (1990).** The characteristics and functions of the peroxidases from *Trametes versicolor* in lignin biotransformation. *J. Biotechnol.* 13, 111-117.
- Loborzewski, J. y Paszczynski, A. (1985).** Lignocellulose biotransformation with immobilized cellulase, D-glucose oxidase and fungal peroxidase. *Enzyme Microb. Technol.* 7, 564-566.
- Long, K. y Knapp, J. S. (1991).** The effect of Junlon PW110 and Tween 80 on the production of cellulolytic enzymes by *Coprinus cinereus*. *Mycol. Res.* 95, 1077-1081.
- Lopez, E. y Deschamps, J. (1978).** Estudio comparativo de la patologia de maderas de árboles cultivados en la provincia de Buenos Aires. *Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, La Plata, Argentina. Informes.* 26, 7-33.
- Lundell, T., Leonowicz, A., Rogalsky, J. y Hatakka, A. (1990).** Formation and action of lignin-modifying enzymes in cultures of *Phlebia radiata* supplemented with veratric acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2623-2629.
- Magnelli, P., Ramos, A. y Forchiassini, F. (1996).** Factors influencing cellulase production by *Saccobolus saccoboloides*. *Mycologia* 88, 249-255.
- Mahn, M. G., Bucheli, P., Cervone, F., Doares, S. H., O'Neill, R. A., Darvill, A. y Albersheim, P. (1989).** The role of cell wall constituents in plant-pathogen interactions. En: *Plant-microbe interactions*. pp. 131-181. E. Nester y T. Kosuge (eds.). Mc Graw Hill, New York.
- Maijala, P., Raudaskoski, M. y Viikari, L. (1995).** Hemicellulolytic enzymes in P- and S-strains of *Heterobasidion annosum*. *Microbiology* 141, 743-750.
- Mandels, M. (1975).** Microbial sources of cellulase. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 5, 81-105.
- Mandels, M. y Reese, E. T. (1960).** Induction of cellulase in fungi by cellobiose. *J. Bacteriol.* 114, 1-7.
- Mandels, M., Parrish, F. W. y Reese, E. T. (1962).** Sophorose as an inducer of cellulase in *Trichoderma viride*. *J. Bacteriol.* 83, 400-408.
- Manning, K. y Wood, D. A. (1983).** Production and regulation of extracellular endocellulase by *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Microbiol.* 129, 1839-1847.
- Markham, P. y Bazin, M. J. (1991).** Decomposition of cellulose by fungi. En: *Handbook of applied mycology*, vol. 1, pp. 379-424. D. K. Arora, B. Rai, K. G. Mujkerki y G. R. Knudsen (eds.). M. Dekker Inc., New York.
- Martel, M. B., Letoublon, R. y Fevre, M. (1996).** Purification of endo polygalacturonases from *Sclerotinia sclerotiorum*: multiplicity of the complex enzyme system. *Curr. Microbiol.* 33, 243-248.
- Martinez, A. T., Camarero, S., Guillen, F., Gutiérrez, A., Muñoz, C., Varela, E., Martínez, M. J., Barrasa, J. M., Ruel, K. y Pelayo, J. M. (1994a).** 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.

- Martinez, M. J., Reyes, F. y Lahoz, R. (1982).** Cell wall plant polysaccharide-degrading enzymes in autolysis of *Botrytis cinerea*. *Trans. Br. mycol. Soc.* 78, 395-403.
- Martinez, M. J., Vazquez, C., Lahoz, R. y Reyes, F. (1986).** Role of uronic acids present in phytopathogenic fungi as inducers of polygalacturonases during autolysis. *Mycopathologia* 93, 33-37.
- Martinez, M. J., Martinez, R. y Reyes, F. (1988).** Effect of pectin on pectinases in autolysis of *Botrytis cinerea*. *Mycopathologia* 102, 37-43.
- Martinez, M. J., Alconada, M. T., Guillen, F., Vazquez, C. y Reyes, F. (1991).** Pectic activities from *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*: purification and characterization of an exopolygalacturonase. *FEMS Microbiol. Lett.* 81, 145-150.
- Martinez, M. J., Muñoz, C., Guillén, F. y Martínez, A. T. (1994b).** Studies on homoveratric acid transformation by the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41, 500-504.
- Martinez, M. J., Ruiz-Dueñas, F. J., Guillén, F. y Martínez, A. T. (1996).** Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eringyii*. *Eur. J. Biochem.* 237, 424-432.
- Masaphy, S. y Levanon, D. (1992).** The effect of lignocellulose on lignocellulolytic activity of *Pleurotus pulmonarius* in submerged culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36, 828-832.
- Meier, H. (1955).** Decomposition of the cell wall by wood-destroying fungi and the submicroscopic structure of tracheids of spruce and wood fibers of birch (translation N° 92: Department of the Secretary of State of Canada, February 1956) *Holz. Roh-Werkst.* 13, 323-338.
- Menon, K., Rao, K. K. y Pushalkar, S. (1994).** Production of β -glucosidase by *Penicillium rubrum* O. Stoll. *Indian J. Exp. Biol.* 32, 706-709.
- Mercuri, O. A. (1987a).** Degradación biológica de celulosa por *Ascobolus furfuraceus*. Tesis Doctoral. Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Mercuri, O. A. (1987b).** Macromorphological patterns of cellulolytic fungi growing in vitro. *Nova Hedwigia* 44, 465-472.
- Mercuri, O. A. (1996).** Efecto de las condiciones de cultivo sobre la degradación de celulosa cristalina por *Ascobolus furfuraceus*. *PHYSIS Secc. C*, 52 (122-123), 1-6.
- Messner, K. y Srebotnik, E. (1994).** Biopulping: An overview of developments in an environmentally safe paper-making technology. *FEMS Microbiol. Rev.* 13.
- Messner, R., Hagspiel, K. y Kubicek, C. P. (1990).** Isolation of a β -glucosidase binding and activating polysaccharide from cell walls of *Trichoderma reesei*. *Arch. Microbiol.* 154, 150-155.
- Mischak, H., Hofer, F., Messner, R., Weissinger, E. y Hayn, M. (1989).** Monoclonal antibodies against different domains of cellobiohydrolase I and II from *Trichoderma reesei*. *Biochim. Biophys. Acta* 990, 1-7.
- Moloney, A. P., Considine, P. J. y Coughlan, M. P. (1983).** Cellulose hydrolysis by the cellulases produced by *Talaromyces emersonii* when grown on different inducing substrates. *Biotechnol. Bioeng.* 25, 1169-1173.

- Mukhopadhyay, S. N. y Malik, R. K. (1980).** Increased production of cellulase of *Trichoderma* sp. by pH cycling and temperature profiling. *Biotechnol. Bioeng.* 19, 337-348.
- Muñoz, C., Guillén, F., Martínez, A. T. y Martínez, M. J. (1997).** Induction and characterization of laccase in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Curr. Microbiol.* 34, 1-5.
- Nakayama, M., Tomita, Y., Suzuki, H. y Nisizawa, K. (1976).** Partial proteolysis of some cellulase components from *Trichoderma viride* and the substrate specificity of the modified products. *J. Biochem.* 79, 955-966.
- Nelson, N. (1944).** A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biochem.* 153, 375-380.
- Nerud, F., Zoučková, Z. y Misurcová, Z. (1991).** Ligninolytic properties of different white-rot fungi. *Biotechnol. Lett.* 13, 657-660.
- Nicholas, D. J. (1965).** Utilization of inorganic nitrogen compounds and aminoacids by fungi. En: *The fungi*, vol.1, cap. 13. G. C. Ainsworth y A. S. Sussman (eds.). Academic Press, New York.
- Nicole, M., Chamberland, H., Geiger, J. P., Lecours, N., Valéro, J., Río, B. y Ouellette, G. B. (1992).** Immunocytochemical localization of laccase in wood decayed by *Rigidoporus lignosus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1727-1739.
- Nilsson, T. (1973).** Studies on wood degradation and cellulolytic activity of microfungi. *Studia Forestalia Suecica* 104, 1-40.
- Nilsson, T. (1974).** Comparative study in the cellulolytic activity of white-rot and brown-rot fungi. *Mater. Org.* 9, 173-179.
- Nilsson, T. (1988).** Defining fungal decay types--final proposal. *Intl. Res. Grp. Wood Pres. Doc.* No. IRG/WP/ 1355, 1-3.
- Nilsson, T. y Henningsson, B. (1978).** *Phialophora* species occurring in preservative treated wood in ground contact. *Mater. Org.* 13, 297-313.
- Nilsson, T., Daniel, G., Kirk, T. K. y Obst, J. R. (1989).** Chemistry and microscopy of wood decay by some higher Ascomycetes. *Holzforschung* 43, 11-18.
- Nishida, A. y Eriksson, K. E. (1987).** Formation, purification and partial characterization of methanol oxidase, a H₂O₂-producing enzyme in *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 9, 325-338.
- Nisizawa, T., Suzuki, H., Nakayama, M. y Nisizawa, K. (1971).** Inductive formation of cellulase by sophorose in *Trichoderma viride*. *J. Biochem.* 70, 375-385.
- Nisizawa, T., Suzuki, H. y Nisizawa, K. (1972).** Catabolite repression of cellulase formation in *Trichoderma viride*. *J. Biochem.* 71, 999-1007.
- Nobles, M. K. (1965).** Identification of culture of wood-inhabiting Hymenomycetes. *Can. J. Bot.* 43, 1097-1139.
- Novotny, C., Vyas, B. R. M., Erbanová, P., Kubátová, A. y Sasek, V. (1997).** Removal of PCBs by various white rot fungi in liquid cultures. *Folia Microbiol.* 42, 136-140.

- O'Neill, M., Albersheim, P. y Darvill, A. (1990).** The pectic polysaccharides of primary cell walls. En: *Methods in plant biochemistry*. pp. 415-442. P. M. Dey (ed.). New York: Academic Press.
- Obst, J. R. (1982).** Guaiacyl and syringyl lignin composition in hardwood cell components. *Holzforschung* 36, 143-152.
- Obst, J. R., Highley, T. L. y Miller, R. B. (1994).** Influence of lignin type on the decay of woody angiosperms by *Trametes versicolor*. En: *Biodeterioration research, vol. 4: Proceedings of the 4th meeting of the Pan American Biodeterioration Society*, pp. 357-374. G. C. Llewellyn, W. V. Dashek y C. E. O'Rear (eds.). Plenum Press, New York.
- Oguntimein, G. B. y Moo-Young, M. (1991).** Production and properties of β -glucosidase by *Neurospora sitophila*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 7, 4-11.
- Okeke, B. C. y Obi, S. K. C. (1993).** Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by an *Arthrographis* sp. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 9, 345-349.
- Olutiola, P. O. (1982).** Extracellular polygalacturonase enzyme complex from *Penicillium citrinum* Thom associated with internal mouldiness of cocoa (*Theobroma cacao*) beans. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 17, 239-247.
- Olutiola, P. O. y Akintunde, O. A. (1979).** Pectin lyase and pectin methylesterase production by *Penicillium citrinum*. *Trans. Br. mycol. Soc.* 72, 49-55.
- Orth, A. B., Royse, D. J. y Tien, M. (1993).** Ubiquity of lignin-degrading peroxidases among various wood-degrading fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 4017-4023.
- Osagie, I. J. y Obuekwe, C. O. (1991).** Extracellular hydrolytic enzyme production by pathogenic strains of *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaedis*. *Mycol. Res.* 95, 116-122.
- 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.
- Otjen, L., Blanchette, R. A., Effland, M. y Leatham, G. (1987).** Assessment of 30 white rot Basidiomycetes for selective lignin degradation. *Holzforschung* 41, 343-349.
- Paice, M. G., Reid, I. D., Bourbonnais, R., Archibald, F. S. y Jurasek, L. (1993).** Manganese peroxidase, produced by *Trametes versicolor* during pulp bleaching, demethylates and delignifies Kraft pulp. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 260-265.
- Pardo, A. G. (1995).** Estudio fisiológico sobre la producción del sistema celulolítico de *Nectria catalinensis* in vitro. Tesis Doctoral. Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Pardo, A. G. (1996).** Effect of surfactants on cellulase production by *Nectria catalinensis*. *Curr. Microbiol.* 33, 275-278.
- Pardo, A. G. y Forchiassin, F. (1993).** Aspectos nutricionales de *Nectria catalinensis* (Fungi, Ascomycetes). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 29, 233-239.
- Pardo, A. G. y Forchiassin, F. (1994).** Inducción-represión de la actividad celulolítica en *Nectria catalinensis* (Ascomycotina). *Bol. Soc. Argent. Bot.* 30, 43-49.

- Pardo, A. G. y Forchiassin, F. (1998).** Influence of different cultural conditions on cellulase production by *Nectria catalinensis*. *Rev. Arg. Microbiol.* 30, 20-29.
- Parini, C., Fortina, M. G. y Manachini, P. L. (1988).** Properties of two pectin lyases produced by *Aureobasium pullulans* LV 10. *J. Appl. Bacteriol.* 65, 477-481.
- Paszczynski, A., Huynh, V.-B. y Crawford, R. L. (1985).** Enzymatic activities of an extracellular manganese dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 29, 37-41.
- Paszczynski, A., Crawford, R. L. y Blanchette, R. A. (1988).** Delignification of wood chips and pulps by using natural and synthetic porphyrins: models of fungal decay. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 62-68.
- Pateman, J. A. y Kinghorn, J. R. (1976).** Nitrogen metabolism. En: *The filamentous fungi*, vol.2, pp. 159-237. J. E. Smith y D. R. Berry (eds.). Wiley, New York.
- Patil, S. S. y Dimond, A. E. (1968).** Repression of polygalacturonase synthesis in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by sugars and its effects on symptoms reduction in affected tomato plants. *Phytopathology* 58, 676-686.
- Peláez, F., Martínez, M. J. y Martínez, A. T. (1995).** Screening of 68 species of Basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. *Mycol. Res.* 1, 37-42.
- Peltonen, S., Kayalainen, R. y Niku-Paavola, M. L. (1994).** Purification and characterization of a xylanase from *Bipolaris sorokiniana*. *Mycol. Res.* 98, 67-73.
- Peretto, R., Bettini, V. y Bonfante, P. (1993).** Evidence of two polygalacturonases produced by a mycorrhizal ericoid fungus during its saprophytic growth. *FEMS Microbiol. Lett.* 114, 85-92.
- Perez Artes, E. y Tena, M. (1990).** Purification and characterization of pectic enzymes from two races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* differing in virulence to chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 37, 107-124.
- Perez-Leblic, M. L., Reyes, F., Martínez, M. J. y Lahoz, R. (1982).** Cell wall degradation in the autolysis of filamentous fungi. *Mycopathologia* 80, 147-155.
- Perley, A. F. y Page, O. T. (1971).** Differential induction of pectolytic enzymes of *Fusarium roseum* (Lk) emend. Snyder and Hansen. *Can. J. Microbiol.* 17, 415-420.
- Perie, F. H. y Gold, M. H. (1991).** Manganese regulation of manganese peroxide expression and lignin degradation by the white-rot fungus *Dichomitus squalens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2240-2245.
- Pitt, D. (1988).** Pectin lyase from *Phoma medicaginis* var. *pinodella*. *Methods Enzymol.* 161B, 350-354.
- Planes, E., Bassi, M., Bensignor, J. y Burachik, M. (1986).** Pulpado biológico de maderas de sauce. *ATIPCA* 25, 44-46. Trabajo presentado en: *21 Congreso técnico sobre celulosa y papel*. Buenos Aires.
- Planes, E., Fontana, E., Guinzburg, M. y Repetti, R. (1990).** Pulpado bioquímico: ahorro de energía mediante pretratamiento biológico de chips. En: *26 Congreso técnico sobre celulosa y papel*. pp. 1-10. Buenos Aires.

- Polizeli, M. L. T. M., J.A., J. y Terenzi, H. F. (1991).** Pectinase production by *Neurospora crassa*: purification and biochemical characterization of extracellular polygalacturonase activity. *J. Gen. Microbiol.* 137, 1815-1823.
- Puls, J. y Poutanem, K. (1989).** Mechanisms of enzymatic hydrolysis of hemicelluloses (xylans) and procedures for determination of the enzyme activities involved. En: *Enzyme systems for lignocellulose degradation*. pp. 151-157. M. P. Coughlan (ed.). Elsevier Appl. Science, London.
- Puls, J. y Schuseil, J. (1993).** Chemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. En: *Hemicellulose and hemicellulases*. pp. 1-28. M. P. Coughlan y G. P. Hazlewood (eds.). Portland Press, London.
- Pushalkar, S., Rao, K. K. y Menon, K. (1995).** Production of β -glucosidase by *Aspergillus terreus*. *Curr. Microbiol.* 30, 255-258.
- Ramasamy, K., Kelley, R. L. y Reddy, C. A. (1985).** Lack of lignin degradation by glucose oxidase-negative mutants of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 131, 436-441.
- Rayner, A. D. y Boddy, L. (1988).** *Fungal decomposition of wood. Its biology and ecology*. Wiley, New York.
- Reese, E. T. (1976).** History of the cellulase program at the U.S. Army Natick Development Center. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 6, 9-20.
- Reese, E. T. (1977).** En: *Recent advances in phytochemistry*. pp. 311-367. F. A. Loewus y V. C. Runkles (eds.). Plenum Publishing Corporation, New York.
- Reese, E. T. (1980).** Inactivation of cellulase by shaking and its prevention by surfactants. *J. Appl. Biochem.* 2, 36-39.
- Reese, E. T. y Manguire, A. (1969).** Surfactants as stimulants of enzyme production by microorganisms. *Appl. Microbiol.* 17, 242-245.
- Reese, E. T., Lola, J. E. y Parrish, F. W. (1969).** Modified substrates and modified products as inducers of carbohydrases. *J. Bacteriol.* 100, 1151-1154.
- Reid, I. D. (1983a).** Effect of nitrogen supplements on degradation of aspen wood lignin and carbohydrate components by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 830-837.
- Reid, I. D. (1983b).** Effect of nitrogen sources on cellulose and synthetic lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 838-842.
- Reid, I. D. (1989).** Solid state fermentations for biological delignification. *Enzyme Microb. Technol.* 11, 786-803.
- Reid, I. D. (1995).** Biodegradation of lignin. *Can. J. Bot.* 73 (Suppl. 1), S1011-S1018.
- Reid, I. D. y Seifert, K. A. (1982).** Effect of an atmosphere of oxygen on growth, respiration and lignin degradation by white rot fungi. *Can. J. Bot.* 60, 252-260.
- Reid, I. D. y Deschamps, A. M. (1991).** Nutritional regulation of synthetic lignin (DHP) degradation by the selective white-rot fungus *Phlebia (Merulius) tremellosa*: effects of glucose and other cosubstrates. *Can. J. Bot.* 69, 147-155.

- Reid, I. D. y Paice, M. G. (1994).** Biological bleaching of Kraft pulps by white-rot fungi and their enzymes. *FEMS Microbiol. Rev.* 13, 369-376.
- Reyes, F., Lahoz, R. y Val Moreno, A. (1981).** Synthesis of 1,3- β -glucanase and β -N-acetylglucosaminidase during autolysis of *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* 126, 347-353.
- Reyes, F., Martínez, M. J. y Vazquez, C. (1988).** Maceration and protoplast production from tomato tissues with the enzymic complex from autolyzed of *Alternaria alternata*. *Microbiológica* 11, 63-68.
- Rho, D., Desrochers, M., Jurasek, L., Driguez, H. y Defaye, J. (1982).** Induction of cellulase in *Schizophyllum commune*: thiocellobiose as a new inducer. *J. Bacteriol.* 149.
- Riou, C., Freyssinet, G. y Fevre, M. (1992).** Purification and characterization of extracellular pectinolytic enzymes produced by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 578-583.
- Robbins, W. J. (1937).** The assimilation by plants of various forms of nitrogen. *Am. J. Bot.* 24, 243-250.
- Rogalski, J. y Leonowicz, A. (1992).** *Phlebia radiata* laccase forms induced by veratric acid and xylydine in relation to lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase. *Acta Biotechnol.* 12, 213-221.
- Rothschild, N., Hadar, Y. y Dosoretz, C. (1995).** Ligninolytic system formation by *Phanerochaete chrysosporium* in air. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1833-1838.
- Rouau, X. y Odier, E. (1986).** Production of extracellular enzyme by the white rot fungus *Dichomitus squaleus* in cellulose containing liquid culture. *Enzyme Microb. Technol.* 8, 22-26.
- Roy, B. P. y Archibald, F. (1993).** Effects of Kraft pulp and lignin on *Trametes versicolor* carbon metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1855-1863.
- Roy, B. P., Paice, M. G., Archibald, F. S., Misra, S. K. y Misiak, L. E. (1994).** Creation of metal-complexing agents, reduction of manganese dioxide, and promotion of manganese peroxidase-mediated Mn (III) production by cellobiose: quinone oxidoreductase from *Trametes versicolor*. *J. Biol. Chem.* 269, 19745-19750.
- Roy-Arcand, L. y Archibald, F. S. (1991).** Direct dechlorination of chlorophenolic compounds by laccases from *Trametes (Coriolus) versicolor*. *Enzyme Microb. Technol.* 13, 194-203.
- Royer, C. y Nakas, J. P. (1989).** Generation of extracellular xylanase activity by *Trichoderma longibrachiatum*. *Enzyme Microb. Technol.* 11, 405-410.
- Royer, C. y Nakas, J. P. (1990).** Interrelationship of xylanase induction and cellulase induction of *Trichoderma longibrachiatum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2535-2539.
- Ruel, K. y Joseleau, J.-P. (1991).** Involvement of an extracellular glucan sheath during degradation of *Populus* wood by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 374-384.
- Ruel, K., Ambert, K. y Joseleau, J.-P. (1994).** Influence of the enzyme equipment of white-rot fungi on the patterns of wood degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 13, 241-254.
- Rüttimann, C., Salas, L. y Vicuña, R. (1992a).** Studies on the ligninolytic system of the white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispora*. En: *Biotechnology in pulp and paper industry. Proc. 5th*

Internat. Conf. on biotechnology in the pulp and paper industry, Kyoto. pp. 243-248. M. Kuwahara y M. Shimada (eds.). Uni Publishers Co. Ltd., Tokyo.

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

Ryu, D. D. Y. y Mandels, M. (1980). Cellulases: biosynthesis and applications. *Enzyme Microb. Technol.* 2, 91-102.

Ryvarden, L. y Gilbertson, R. L. (1993). *European Polypores. Part 1.* Gronlands Grafiske A/S, Oslo.

Ryvarden, L. y Gilbertson, R. L. (1994). *European Polypores. Part 2.* Gronlands Grafiske A/S, Oslo.

Sabharwal, H. S., Akhtar, M., Blanchette, R. A. y Young, R. A. (1995). Refiner mechanical and biomechanical pulping of jute. *Holzforschung* 49, 537-544.

Sachtlehner, A., Nidetsky, B., Kulbe, K. D. y Haltrich, D. (1998). Induction of mannanase, xylanase and endoglucanase activities in *Sclerotium rolfsii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 594-600.

Saddler, J. N., Hogan, C. M. y Louis-Seize, G. (1985). A comparison between the cellulase systems of *Trichoderma harzianum* and *T. reesei* C30. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22, 139-145.

Said, S., Fonseca, M. J. V. y Siessere, V. (1991). Pectinase production by *Penicillium frequentans*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 7, 607-608.

Saka, S. y Goring, D. A. I. (1988). Distribution of lignin in white birch as determined by bromination with TEM-EDXA. *Holzforschung* 42, 149-153.

Sakai, T., Sakamoto, T., Hallaert, J. y Vandamme, E. J. (1993). Pectin, pectinase and protopectinase. Production, properties and applications. *Adv. Appl. Microbiol.* 39, 213-294.

Salas, C., Lobos, S., Larraín, J., Salas, L., Cullen, D. y Vicuña, R. (1995). Properties of laccase isoenzymes produced by the Basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 21, 323-333.

Sandhu, D. K. y Kalra, M. K. (1985). Effect of cultural conditions on production of cellulases in *Trichoderma longibrachiatum*. *Trans. Br. mycol. Soc.* 84, 251-258.

Santos, T., Villanueva, J. R. y Nombela, C. (1977). Production and catabolite repression of *Penicillium italicum* glucanases. *J. Bacteriol.* 129, 52-58.

Sarkanen, K. V. y Ludwig, C. H. (1971). *Lignins: occurrence, formation, structure and reactions.* Wiley-Interscience, New York.

Sass, J. E. (1966). *Botanical microtechnique.* Iowa State Univ. Press, Ames.

Savory, J. G. (1954). Breakdown of timber by Ascomycetes and Fungi Imperfecti. *Ann. Appl. Biol.* 41, 336-347.

Schäfer, A., Bieg, S., Huwig, A., Kohring, G.-W. y Giffhorn, F. (1996). Purification by immunoaffinity chromatography, characterization, and structural analysis of a thermostable

- pyranose oxidase from the white rot fungus *Phlebiopsis gigantea*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2586-2592.
- Schmidhalter, D. R. y Canevascini, G. (1993a).** Purification and characterization of two exo-cellobiohydrolases from the brown-rot fungus *Coniophora puteana* (Schum ex Fr.) Karst. *Arch. Biochem. Biophys.* 300, 551-558.
- Schmidhalter, D. R. y Canevascini, G. (1993b).** Isolation and characterization of the cellobiose dehydrogenase from the brown-rot fungus *Coniophora puteana* (Schum ex Fr.) Karst. *Arch. Biochem. Biophys.* 300, 559-563.
- Seeta, R., Deshpande, V. y Rao, M. (1989).** Role of β -xylosidase in hemicellulose hydrolysis by xylanase from *Penicillium funiculosum*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 11, 128-132.
- Sengupta, S., Ghosh, A. K. y Sengupta, S. (1991).** Purification and characterization of a β -glucosidase (cellobiase) from a mushroom *Termitomyces clypeatus*. *Biochim. Biophys. Acta* 176, 215-220.
- Senior, D. J., Mayers, P. R. y Saddler, J. N. (1989).** Xylanase production by *Trichoderma harzianum* ES8. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32, 137-142.
- Sharma, N., Balla, T. C. y Blatt, A. K. (1991).** Partial purification and characterization of extracellular cellulase from a strain of *Trichoderma viride* isolated from forest soil. *Folia Microbiol.* 36, 353-356.
- Sheir-Neis, G. y Montecourt, B. S. (1984).** Characterization of the secreted cellulases of *Trichoderma reesei* wild type and mutants during controlled fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20, 46-53.
- Sherwood, R. T. (1966).** Pectin lyase and polygalacturonase production by *Rhizoctonia solani* and other fungi. *Phytopathology* 56, 279-285.
- Shewale, J. G. y Sadana, J. C. (1978).** Cellulase and β -glucosidase production by a Basidiomycete species. *Can. J. Microbiol.* 24, 1204-1216.
- Siessere, V., Fonseca, M. J. V. y Said, S. (1992).** Extracellular polygalacturonase from *Penicillium frequentans*: separation and regulatory aspects. *J. Gen. Microbiol.* 138, 1801-1805.
- Sivori, A. S. (1991).** Estudio de la producción del sistema degradador de celulosa en la familia Ascobolaceae. Seminario de Licenciatura. Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Sivori, A. S., Mercuri, O. A. y Forchiassin, F. (1996).** Cinética de producción de xilanasas y celulasas por *Ascobolus gamundii* (Fungi, Ascomycotina). *Rev. Arg. Microbiol.* 28, 9-15.
- Sjöström, E. (1993).** *Wood chemistry. Fundamentals and applications.* 2nd ed. Academic Press, New York, London.
- Solis-Pereyra, S., Favela-Torres, E., Viniestra-Gonzalez, G. y Gutierrez-Rojas, M. (1993).** Effect of different carbon sources on the synthesis of pectinases by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39, 36-41.
- Somogyi, M. (1952).** Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195, 19-23.

- Soni, G. L. y Bathia, I. S. (1979).** Studies on the extracellular cellulase (Cx) from *Fusarium oxysporum*. *Indian J. Biochem. Biophys.* 16, 223-226.
- Spegazzini, C. (1925).** La piptostelechia del álamo blanco. *Physis* 8, 1-11.
- Sprey, B. y Lambert, C. (1983).** Tritation curves of cellulases from *Trichoderma reesei*: demonstration of a cellulase-xylanase- β -glucosidase-containing complex. *FEMS Microbiol. Lett.* 18, 217-222.
- Srebotnik, E., Messner, K. y Foisner, R. (1988).** Penetrability of white rot-degraded pine wood by the lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2608-2614.
- Srebotnik, E. y Messner, K. (1990).** Enzymatic attack of wood is limited by the inaccessibility of the substrate. En: *Biotechnology in pulp and paper manufacture. Applications and fundamental investigations.* pp. 111-119. T. K. Kirk y H.-m. Chang (eds.). Butterworth-Heinemann, Boston.
- Srebotnik, E. y Messner, K. (1994).** A simple method that uses differential staining and light microscopy to assess the selectivity of wood delignification by white rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1383-1386.
- Srinivasan, C., D'Souza, T. M., Boominathan, K. y Reddy, C. A. (1995).** Demonstration of laccase in the white rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 4274-4277.
- Stahlberg, J., Johansson, G. y Pettersson, G. (1988).** A binding-site-deficient, catalytically active, core protein of endoglucanase III from the culture filtrate of *Trichoderma reesei*. *Eur. J. Biochem.* 173, 179-183.
- Sternberg, D. (1976).** Production of cellulase by *Trichoderma*. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 6, 35-53.
- Sternberg, D. y Mandels, G. R. (1979).** Induction of cellulolytic enzymes in *Trichoderma reesei* by sophorose. *J. Bacteriol.* 139, 761-769.
- Sternberg, D. y Mandels, M. (1982).** β -glucosidase induction and repression in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*. *Exp. Mycol.* 6, 115-124.
- Stewart, J. C. y Parry, J. B. (1981).** Factors influencing the production of cellulase by *Aspergillus fumigatus* (Fresenius). *J. Gen. Microbiol.* 125, 33-39.
- Stratilova, E., Markovic, O., Strovina, D., Rexova-Benkova, L. y Jornvall, H. (1993).** *Aspergillus* sp. polygalacturonase: multiplicity, divergence and structural patterns linking fungal, bacterial and plant polygalacturonases. *J. Prot. Chem.* 12, 15-22.
- Sutherland, J. B. (1986).** Regulation of cellulolytic activity in the white rot fungus *Ischnoderma resinorum*. *Mycologia* 78, 52-55.
- Szklarz, G. y Leonowicz, A. (1986).** Cooperation between fungal laccase and glucose oxidase in the degradation of lignin derivatives. *Phytochemistry* 25, 2537-2539.
- Tagawa, K. y Kaji, A. (1988).** Polygalacturonase from *Corticium rolfsii*. *Methods Enzymol.* 161B, 361-365.

- Taj Aldeen, S. J. y Alkenany, K. I. (1993).** Properties of the cellulolytic system from *Aspergillus niveus*. *Mycol. Res.* 97, 15-22.
- Takao, S. (1965).** Organic acid production by Basidiomycetes. *Appl. Microbiol.* 13, 732-737.
- Tan, L. U. L., Wong, K. K. Y., Yu, E. K. C. y Saddler, J. N. (1985).** Purification and characterization of two D-xylanases from *Trichoderma harzianum*. *Enzyme Microb. Technol.* 7, 425-430.
- Tapia, J. y Vicuña, R. (1995).** Synthetic lignin mineralization by *Ceriporiopsis subvermispora* is inhibited by an increase in the pH of the cultures resulting from fungal growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2476-2481.
- Thomson, J. A. (1993).** Molecular biology of xylan degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 104, 65-82.
- Thurston, C. F. (1994).** The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140, 19-26.
- Tien, M. (1987).** Properties of the ligninase from *Phanerochaete chrysosporium* and their possible applications. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 15, 141-168.
- Tien, M. y Kirk, T. K. (1983).** Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Science* 221, 661-663.
- Tien, M. y Kirk, T. K. (1984).** Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 2280-2284.
- Tomme, P., Van Tilbeurgh, H., Pettersson, G., Van Damme, J., Vanderkerckhove, J., Knowles, J. K. C., Teeri, T. T. y Claeysens, M. (1988).** Studies of the cellulolytic system of *Trichoderma reesei* QM 9414. *Eur. J. Biochem.* 170, 575-581.
- Tomme, P., Warren, R. A. J. y Gilkes, N. R. (1995).** Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv. Microbiol. Physiol.* 37, 1-81.
- Tonon, F. y Odier, E. (1988).** Influence of veratryl alcohol and hydrogen peroxide on ligninase activity and ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 466-472.
- Torakazu, T., Hirokasu, K., Atsubiko, S. y Toshio, E. (1975).** Inhibition of accumulation of polygalacturonase forming activity during catabolic repression in *Aspergillus niger*. *J. Ferment. Technol.* 53, 409-412.
- Tuor, U., Wariishi, H., Schoemaker, H. E. y Gold, M. H. (1992).** Oxidation of phenolic arylglycerol β -aryl ether lignin model compounds by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*: oxidative cleavage of an α -carbonyl model compound. *Biochemistry* 31, 4986-4995.
- Tuor, U., Winterhalter, K. y Fiechter, A. (1995).** Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. *J. Biotechnol.* 41, 1-17.
- Tweddell, R. J., Marshall, J. y Jabaji-Hare, S. H. (1996).** Endo-1,4- β -glucanase production by *Stachybotrys elegans*, a mycoparasite of *Rhizoctonia solani*. *Mycologia* 88, 410-415.

- Ujhe, M., Roy, C. y Yaguchi, M. (1991). Low molecular weight xylanase from *Trichoderma viride*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1860-1862.
- Urzúa, U., Kersten, P. J. y Vicuña, R. (1998). Manganese peroxidase-dependent oxidation of glyoxylic and oxalic acids synthesized by *Ceriporiopsis subvermispora* produces extracellular hydrogen peroxide. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 68-73.
- Valli, K., Brock, H. B. J., Hoshi, D. K. y Gold, M. H. (1992). Degradation of 2,4-dinitrotoluene by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 221-228.
- Vance, C. P., Kirk, T. K. y Sherwood, R. T. (1980). Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 18, 259-288.
- Vares, T. (1996). Ligninolytic enzymes and lignin-degrading activity of taxonomically different white-rot fungi. PhD Thesis. Department of Applied Chemistry and Microbiology, Division of Microbiology. University of Helsinki, Finland.
- Vares, T., Lundell, T. K. y Hatakka, A. I. (1992). Novel heme-containing enzyme possibly involved in lignin degradation by white-rot fungus *Junghuhnia separabilima*. *FEMS Microbiol. Lett.* 99, 53-58.
- Vares, T., Niemenmaa, O. y Hatakka, A. I. (1994). Secretion of ligninolytic enzymes and mineralization of ¹⁴C-ring-labelled synthetic lignin by three *Phlebia tremellosus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 569-575.
- Vares, T., Kalsi, M. y Hatakka, A. I. (1995). Lignin peroxidases, manganese peroxidases, and other ligninolytic enzymes produced by *Phlebia radiata* during solid-state fermentation of white straw. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3515-3520.
- Vares, T. y Hatakka, A. (1997). Lignin-degrading activity and ligninolytic enzymes of different white-rot fungi: effects of manganese and malonate. *Can. J. Bot.* 75, 61-71.
- Vazquez, C., Martinez, M. J., Lahoz, R. y Reyes, F. (1985). Inducción por pectina de distintas actividades pécticas del hongo *Alternaria alternata* durante su autólisis. *Microbiol. Españ.* 38, 53-59.
- Volc, J., Denisova, N. P., Nerud, F. y Musilek, V. (1985). Glucose-2-oxidase activity in mycelial cultures of Basidiomycetes. *Folia Microbiol.* 30, 141-147.
- Volc, J. y Eriksson, K. E. (1988). Pyranose 2-oxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods Enzymol.* 161B, 316-322.
- Voragen, A. G. J. y Pilnik, W. (1989). Pectin degrading enzymes in fruit and vegetable processing. En: *Biocatalysis in agricultural biotechnology*. pp. 93-115. J. R. Whitaker y P. E. Sonnet (eds.). American Chemical Society, Washington.
- Vyas, B. R. M., Volc, J. y Sasek, V. (1994). Ligninolytic enzymes of selected white rot fungi cultivated on wheat straw. *Folia Microbiol.* 39, 235-240.
- Waksman, G., Keon, J. P. R. y Turner, G. (1991). Purification and characterization of two endopolygalacturonases from *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biochim. Biophys. Acta* 1073, 43-48.
- Waldner, R., Leisola, M. S. A. y Fiechter, A. (1988). Comparison of ligninolytic activities of selected white rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29, 400-407.

- Wang, D. I. C., Avgerinos, G. C., Biocic, I., Wang, S. D. y Fang, H. Y. (1983).** Ethanol from cellulosic biomass. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 300, 323-333.
- Wariishi, H. y Gold, M. H. (1989).** Lignin peroxidase compound III- formation, inactivation, and conversion to the native enzyme. *FEBS Lett.* 195, 242-246.
- Wariishi, H., Valli, K. y Gold, M. H. (1989).** Oxidative cleavage of a phenolic diarylpropane lignin model dimer by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry* 28, 6017-6023.
- Wariishi, H. y Gold, M. H. (1990).** Lignin peroxidase compound III. Mechanism of formation and decomposition. *J. Biol. Chem.* 265, 2070-2077.
- Wariishi, H., Sheng, D. y Gold, M. H. (1994).** Oxidation of ferrocyclochrome c by lignin peroxidase. *Biochemistry* 33, 5545-5552.
- Wariishi, H., Valli, K. y Gold, M. H. (1991).** In vitro depolymerization of lignin by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176, 269-275.
- Warzywoda, W., Ferre, V. y Pourquie, J. (1983).** Development of a culture medium for large-scale production of cellulolytic enzymes by *Trichoderma reesei*. *Biotechnol. Bioeng.* 29, 3005-3011.
- Westermarck, U. y Eriksson, K.-E. (1974).** Cellobiose: quinone oxidoreductase, a new wood-degrading enzyme from white-rot fungi. *Acta Chem. Scan. Ser. B* 28, 209-214.
- Wey, T. T., Hsew, T. H. y Huang, L. (1994).** Molecular cloning and sequence analysis of the cellobiohydrolase I gen from *Trichoderma koningii* G-39. *Curr. Microbiol.* 28, 31-39.
- Whitaker, D. R. (1971).** Cellulases. En: *The enzymes*, vol.1, cap. 9. P. D. Boyer (ed.). Academic Press, New York.
- White, A. R. (1983).** Visualization of cellulases and cellulose. En: *Cellulose and other natural polymer systems. Biogenesis, structure and degradation*. R. M. Brown (ed.): Plenum Press, New York.
- Wilcox, W. W. (1968).** Changes of wood microstructure through progressive stages of decay. *US For. Serv. Res. Pap.* FPL-70, 46-60.
- Wilcox, W. W. (1993).** Comparative morphology of early stages of brown-rot wood decay. *IAWA J.* 14, 127-138.
- Wong, K. K. Y. (1988).** Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiol. Rev.* 52, 305-317.
- Wood, T. M. y McCrae, S. I. (1972).** The purification and properties of the CI component of *Trichoderma koningii* cellulase. *Biochem. J.* 128, 1183-1192.
- Wood, T. M. y García Campayo, V. (1990).** Enzymology of cellulose degradation. *Biodegradation* 1, 147-161.
- Woodward, J. (1991).** Synergism in cellulase systems. *Bioresource Technol.* 36, 67-75.
- Worrall, J. J., Anagnost, S. E. y Zabel, R. A. (1997).** Comparison of wood decay among diverse lignicolous fungi. *Mycologia* 89, 199-219.

- Wright, J. E., Deschamps, J. R. y Rovetta, G. (1973).** Basidiomycetes xilófilos de la región mesopotámica. I Poliporos trametoides. *Rev. Invest. Agrop. INTA. Serie 5* 10, 117-174.
- Ximenes, E. A., Felix, C. R. y Ulhoa, C. J. (1996).** Production of cellulases by *Aspergillus fumigatus* and characterization of one β -glucosidase. *Curr. Microbiol.* 32, 19-123.
- Yaguee, E., Wood, D. A. y Thurston, C. F. (1994).** Regulation of transcription of the cellulase gene in *Agaricus bisporus*. *Mol. Microbiol.* 12, 41-47.
- Yazdy, T., Woodward, J. R. y Radford, A. (1990).** The cellulase complex of *Neurospora crassa*: activity, stability and release. *J. Gen. Microbiol.* 136, 1313-1319.
- Yoshida, N., Fukushima, T., Saito, H., Shimosaka, M. y Okasaki, M. (1989).** Cellulose and xylan degrading enzymes of the plant pathogenic fungus, *Fusarium oxysporum* SUF 850. *Agric. Biol. Chem.* 53, 1829-1836.
- Zabel, R. A. y Morrel, J. J. (1992).** *Wood microbiology. Decay and its prevention.* Academic Press, San Diego, California:
- Zarra, I. y Revilla, G. (1993).** En: *Fisiología y bioquímica vegetal.* J. Azcon-Bieto y M. Talon (eds.). McGraw-Hill-Interamericana de España.
- Zhao, J. y Janse, B. J. H. (1996).** Comparison of H_2O_2 -producing enzymes in selected white rot fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 139, 215-221.



Las siguientes publicaciones se han realizado con parte de los resultados de esta Tesis:

-Levin, L. y F. Forchiassin. 1995. Influencia de las fuentes carbonadas y nitrogenadas sobre la actividad celulolítica de *Trametes trogii*.
Revista Argentina de Microbiología 27: 11-20.

-Levin, L. y F. Forchiassin. 1997. Efecto de las condiciones de cultivo sobre la producción de celulasas por *Trametes trogii*.
Revista Argentina de Microbiología 29: 1-9.

-Levin, L. y M. A. Castro. 1998. Anatomical study of the decay caused by the white-rot fungus *Trametes trogii* (Aphyllophorales) in wood of *Salix* and *Populus*.
IAWA Journal 19 (2): 169-180.

-Levin, L. y F. Forchiassin. 1998. Influence of growth conditions on the production of xylanolytic enzymes by *Trametes trogii*.
World Journal of Microbiology and Biotechnology 14 (3): 443-446.

-Levin, L. y F. Forchiassin. 1998. Culture conditions for the production of pectinolytic enzymes by the white-rot fungus *Trametes trogii* on a laboratory scale.
Acta Biotechnologica 18 (2): 157-166.