

Tesis de Posgrado

Enzimas ligninolíticas en *Fomes sclerodermeus*

Papinutti, Víctor Leandro

2003

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:

Papinutti, Víctor Leandro. (2003). Enzimas ligninolíticas en *Fomes sclerodermeus*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3584_Papinutti.pdf

Cita tipo Chicago:

Papinutti, Víctor Leandro. "Enzimas ligninolíticas en *Fomes sclerodermeus*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3584_Papinutti.pdf

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

Enzimas Ligninolíticas en
Fomes sclerodermeus

Autor: Víctor Leandro Papinutti
Dirección: Flavia Forchiassin

Tesis para optar por el título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires.

2003

Tesis Doctoral: Enzimas ligninolíticas en *Fomes sclerodermeus*. Autor: V. Leandro Papinutti. Dirección: Flavia Forchiassin. Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Universidad de Buenos Aires. Mayo 2003.

Resumen

Los hongos causantes de pudrición blanca son los únicos organismos capaces de depolimerizar la lignina y degradarla hasta su completa mineralización. Estos hongos poseen al menos tres enzimas implicadas en este proceso: lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y lacasa. De un relevamiento de 13 cepas locales de hongos causantes de pudrición blanca, *Fomes sclerodermeus* resultó ser el mayor productor de las actividades MnP y lacasa así como también el más eficiente para degradar el colorante polimérico poly-R. En ninguno de los organismos evaluados se detectó actividad LiP.

Se optimizaron las condiciones para la producción de lacasa y MnP por *F. sclerodermeus* en medio sintético. El diseño experimental factorial incompleto de Doehlert se eligió para evaluar el efecto de $MnSO_4$, $CuSO_4$ y asparagina. Entre los compuestos aromáticos ensayados como inductores en medio GA, la vainillina y el ácido ferúlico fueron los que lograron el mayor aumento en la producción de lacasa y MnP. Por otro lado en medio YPG, los compuestos aromáticos tuvieron un efecto nulo sobre ambas actividades. En este medio el mejor inductor resultó el Cu para lacasa y Mn para MnP.

En fermentación en estado sólido con salvado de trigo o soja como único sustrato, *F. sclerodermeus* produjo altas actividades lacasa y MnP. Compuestos aromáticos, $MnSO_4$ o $CuSO_4$ no incrementaron la producción de ninguna de las actividades.

En medio basado en celulosa cristalina como única fuente de carbono las actividades celulolíticas fueron algo inhibidas cuando se agrega $CuSO_4$ o $MnSO_4$. Se detectó actividad MnP solamente en los medios conteniendo $MnSO_4$ como inductor, mientras que la actividad lacasa se expresó de manera constitutiva en todos los medios siendo varias veces mayor cuando se utilizó cobre como inductor.

Madera de álamo atacada durante 6 meses por *F. sclerodermeus* registró una pérdida de peso del 51%. El contenido residual de celulosa y lignina determinado por hidrólisis diferencial fue del 58 y 56% respectivamente. Por otro lado los hidrosolubles aumentaron hasta tres veces debido a los productos de degradación. Cortes a mano alzada revelaron degradación de radios parenquimáticos y adelgazamiento de paredes. En medio basado en aserrín sólo se detectó actividad en álamo mientras que en cedro ambas actividades fueron nulas.

Las enzimas lacasa y MnP producidas en medio YPG, fueron purificadas hasta homogeneidad electroforética y caracterizadas bioquímicamente. Se encontraron dos isoenzimas de lacasa (Lac I y Lac II) y dos de MnP (MnP I y MnP II). En ambos casos hubo leves diferencias en sus puntos isoeléctricos.

La actividad lacasa producida en salvado de trigo reveló tres bandas en PAGE con patrones de inactivación térmica diferentes. Entre los estabilizadores probados el CuSO_4 1,25 mM fue el que rindió los mejores resultados, la combinación de CuSO_4 y glicerol 0,2% incrementó aún más la estabilidad de la enzima.

La actividad lacasa producida en medio definido optimizado para dicha actividad fue utilizada para llevar a cabo ensayos de decoloración y detoxificación del fungicida verde de malaquita. Como biocontrol se utilizó a *P. chrysosporium* el cual mostró alta sensibilidad al fungicida, mientras que el mismo tóxico degradado por los sobrenadantes mostró una toxicidad nula para el crecimiento del este hongo. La presencia de 1-HBT aceleró la detoxificación. Otros hongos de pudrición blanca mostraron igual respuesta que *P. chrysosporium* hacia la detoxificación del verde de malaquita.

Lignin modifying enzymes in *Fomes sclerodermeus*, Doctoral thesis. Author: V. Leandro Papinutti. Director: Flavia Forchiassin. Department of Biodiversity and Experimental Biology, Buenos Aires University. May 2003.

Summary

White rot fungi are the only organisms capable to mineralize the lignin to CO₂. These fungi possess at least three enzymes implicated in the process: lignin peroxidase, manganese dependent peroxidase and laccase. The screening of 13 strains of white-rot fungi showed that *F. sclerodermeus* was the more efficient ligninase producer fungus and the decolorization of the polymeric dye poly R was fast. Lip activity was not detected in any of the media tested.

Optimal media conditions for laccase and MnP production in synthetic liquid media were found. The Doehlert uniform factorial experimental design was applied to study the effect of MnSO₄, CuSO₄ and asparagine. Among the aromatic compounds evaluated in GA medium, vanillin and ferulic acid were the more efficient laccase and MnP inducers. On the other hand, in semidefined medium (YPG) aromatic compounds had no effect on any activity. Under these conditions only copper and Mn increased laccase and MnP activities, respectively.

Solid state fermentation on wheat or soy bran, high laccase and MnP were produced. Neither aromatic compounds, MnSO₄ nor CuSO₄ increased none of the activities.

The effect on known ligninolytic inducers was studied on a crystalline cellulose (CC) based medium. Cellulolytic activities decreased 3-fold when CuSO₄ or MnSO₄ were added to the medium. MnP activity was only detected in the media containing MnSO₄ as inducer, while the laccase activity was constitutively expressed under all the conditions tested, and it was increased to a major extent when copper was added to the medium.

Wood blocks of poplar incubated during six months with *F. sclerodermeus* registered dry weight losses of 51%. Differential hydrolysis of the wood blocks revealed that the remaining content of cellulose and lignin were 58 y 56%, respectively. On the other hand, the hydrosolubles increased 3-fold, due to the degradation products. Observation of the wood showed the degradation of parenchyma rays and thinning of the cell walls. Growing on sawdust medium, enzyme activities were produced only with poplar, whereas on cedar laccase and MnP were inhibited.

Laccase and MnP produced in YPG medium by *F. sclerodermeus* were purified to electrophoretic homogeneity and characterized biochemically. Two isoenzymes of laccase (Lac I y Lac II) and two MnP (MnP I y MnP II) were found. Isoforms of both systems showed slight differences in their isoelectric points.

Laccase activity produced on wheat bran based medium revealed three bands in PAGE with differential patterns of inactivation. Among the compounds tested, the CuSO_4 1,25 mM was the best stabilizer. The combination of both CuSO_4 and glycerol 0,2% further increased the stability of the enzyme.

Laccase activity produced in the optimized conditions was used in assays of decoloration and detoxification of the fungicide malachite green. *P. chrysosporium* was used as biotest, this fungus showed a high sensitivity to the fungicide, while degradation by *F. sclerodermeus* laccase rendered a not toxic compound. The presence of I-HBT accelerated the detoxification. The detoxification response of other white-rot fungi was similar to that observed for *P. chrysosporium*.

—ÍNDICE—

— INTRODUCCIÓN —

1.1. Lignocelulósicos	1
1.1.1. Celulosa	1
1.1.2. Hemicelulosas	2
1.1.3. Lignina	3
1.2. Hongos xilófilos	6
1.2.1. Enzimas extracelulares: secreción	7
1.2.2. Celulasas	8
<i>Endoglucanasas.</i>	8
<i>Exocelulasas</i>	8
<i>β-glucosidasas</i>	8
1.2.3. Xilanasas	11
<i>endo β-1,4 xilanasa</i>	11
<i>β-D 1,4 xilosidasa</i>	12
1.2.4. Ligninasas	14
<i>Lignina peroxidasa (LiP)</i>	15
<i>Manganeso peroxidasa (MnP).</i>	19
<i>Lacasa.</i>	23

— OBJETIVOS —

2. Objetivos	30
---------------------	-----------

— MATERIALES Y MÉTODOS —

3.1. Organismos	31
3.2. Medios de cultivo	31
3.2.1. Malta	31
3.2.2. Glucosa-asparagina (GA)	31
3.2.3. Celulosa cristalina (CC)	32
3.2.4. Kirk (K)	32
3.2.5. YPG	32
3.2.6. Aserrín de álamo o cedro	32
3.2.7. Salvado de trigo o soja	32
3.3. Condiciones de cultivo	32
3.4. Inóculos	33
3.5. Procesamiento de los cultivos	33
3.6. Inductores	33

3.7. Determinaciones analíticas	34
3.7.1. Proteínas extracelulares	34
3.7.2. Azúcares reductores	34
3.7.3. Quitina	34
3.8. Actividades enzimáticas	34
3.8.1. Lacasa	35
3.8.2. MnP	35
3.8.3. LiP	35
3.8.4. β -glucosidasa	35
3.8.5. β -1,4 endoglucanasa	36
3.9. Optimización de las condiciones de cultivo para la producción de lacasa y MnP	36
3.10. Purificación de lacasa y MnP	37
3.11. Estabilidad	39
3.12. Detoxificación y decoloración del verde de malaquita	40
Fuente de enzima	40
Ensayos de decoloración y detoxificación	41
3.13. Degradación de madera de álamo	41
3.13.1. Cultivos y pérdida de peso seco de la madera	41
3.13.2. Cuantificación de celulosa y lignina	42
3.13.3. Cortes anatómicos	42

—— RESULTADOS Y DISCUSIÓN ——

4.1. Relevamiento de cepas de hongos de pudrición blanca para la producción de ligninasas	43
4.2. Condiciones de cultivo	47
4.2.1. Optimización de la producción de MnP y lacasa en medio sintético	47

4.2.1.1. Ecuación polinómica de segundo orden	49
4.2.1.2. MnP	51
4.2.1.3. Lacasa	52
4.2.1.4. Validación del modelo	52
4.2.2. Producción de lacasa y MnP utilizando salvado de trigo	54
4.2.2.1. Pérdida de peso, proteínas solubles, azúcares reductores, pH y contenido de quitina	54
4.2.2.2. Actividades lacasa y MnP	55
4.2.3. Efecto de inductores sobre la producción de lacasa y MnP en medios YPG y GA	59
4.2.4. Actividades ligninolíticas y celulolíticas en medios con celulosa cristalina como única fuente de carbono	64
4.3. Degradación de madera de álamo	69
4.3.1. Aspectos macroscópicos	69
4.3.2. Pérdida de los componentes	70
4.3.3. Aspectos anatómicos	71
4.3.4. Actividades enzimáticas	71
4.4. Purificación y caracterización de las enzimas lacasa y MnP	73
4.4.1. Proceso de purificación	73
4.4.2. Caracterización de isoenzimas	76
4.5. Evaluación de la estabilidad de la lacasa, la enzima mayoritaria producida por <i>F. sclerodermeus</i>	81
4.5.1. Efecto del pH y la temperatura sobre la estabilidad enzimática	81
4.5.2. Patrón de inactivación de las isoenzimas	82
4.5.3. Efecto de diferentes aditivos sobre la estabilidad enzimática	83
4.6. Detoxificación del fungicida verde de malaquita por sobrenadantes de cultivo con alta actividad lacasa	87
CONCLUSIONES	92
REFERENCIAS	96
ANEXO	
Abreviaturas utilizadas	113

— I N T R O D U C C I Ó N —

1.1. Lignocelulósicos

Los vegetales y sus residuos son una importante fuente para el crecimiento de los hongos. Son muy abundantes en la naturaleza, sobre todo los polímeros de este origen que no pueden ser degradados por la mayoría de los organismos. Los principales son el almidón (sustancia de reserva de los vegetales) y los constituyentes de las paredes celulares, llamados en conjunto materiales lignocelulósicos, compuestos por pectina, celulosa, hemicelulosa y lignina. En la madera las paredes celulares están altamente lignificadas y el contenido de pectina ya es muy escaso o nulo.

1.1.1. Celulosa

La celulosa es el biopolímero más abundante sobre la corteza terrestre. Si bien es imposible hacer un cálculo exacto de la cantidad de celulosa presente en este momento en la biosfera, cada año cerca de 28 millones de toneladas de celulosa son sintetizadas por las plantas. Esta cifra corresponde a alrededor del 6% del CO₂ atmosférico fijado tanto por plantas terrestres como marinas.

La tasa anual de producción de celulosa representa solo un 0,02 % del total de celulosa estimado en 1.400 billones de toneladas.

La celulosa es un homopolímero lineal. Está constituido por monómeros de glucosa unidos por enlaces β -1,4 y no presenta cadenas laterales.

La longitud del polímero es altamente variable, dependiendo del organismo a partir del cual se ha extraído, así como de su edad y estado metabólico (Markham y Bazin 1991).

Cada monómero de glucosa presenta una rotación de 180° respecto de los residuos contiguos. La fibrilla se estabiliza por la presencia de puentes de hidrógeno intramoleculares como se ve en la **figura I**.

La ausencia de cadenas laterales y la estabilización por puentes de hidrógeno entre cadenas paralelas permite la formación de agregados moleculares conocidos como microfibrillas (Zarra y Revilla 1993).

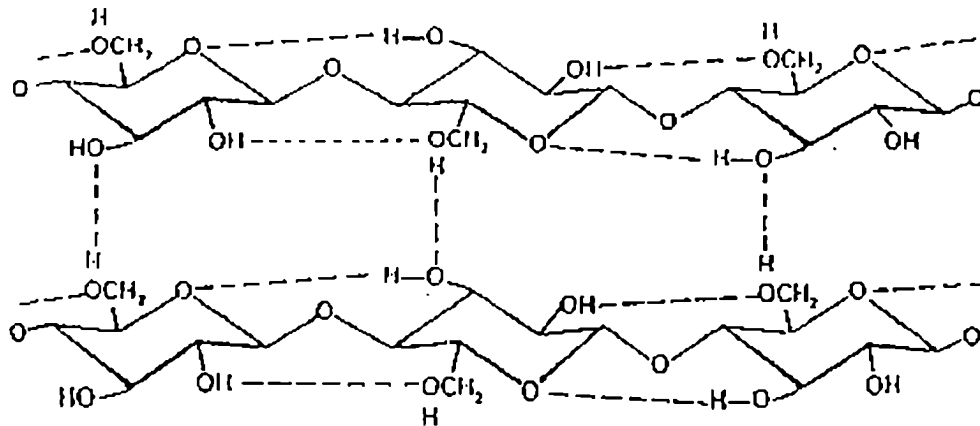


Figura I: molécula de celulosa mostrando las uniones β -1,4 entre unidades de glucosa y los puentes de hidrógeno inter e intramoleculares.

Se consideran dos tipos de celulosa para fines experimentales:

- 1) celulosa nativa o cristalina. Caracterizada por un alto grado de cristalinidad y polimerización y por lo tanto insoluble, p.e: avicel, fibras de algodón, papel de filtro, etc.
- 2) celulosa modificada. Es una celulosa amorfa, caracterizada por un bajo grado de ordenamiento y polimerización que resulta soluble en agua, p.e: carboximetilcelulosa.

1.1.2. Hemicelulosas

Las hemicelulosas son polímeros de diversas hexosas y pentosas, principalmente D-xilosa, L-arabinosa, D-manosa, D-glucosa, D-galactosa y ácido D-glucurónico. Estos polisacáridos forman parte de la pared vegetal en forma amorfa y por lo tanto constituyen la porción más fácilmente degradable de la pared vegetal (Sjöström 1993).

Las hemicelulosas se sintetizan como heteropolímeros. Poseen una columna vertebral formada por una cadena plana corta (grado de polimerización 100 – 200) de azúcares unidos por enlaces β -1,4; de la que pueden salir ramificaciones muy cortas, muchas veces de un solo azúcar de longitud. Se nombran según los azúcares residuales mayoritarios.

Los xilanos son las principales hemicelulosas de las maderas de angiospermas (Joseleau y Ruel 1994).

Consisten de una cadena principal de unidades β -D xilopiranosidos con uniones β -1,4 (**figura II**). Dependiendo de su origen, esta cadena puede tener diferentes sustituyentes y cadenas laterales. Se consideran tres familias principales de xilanos (Puls y Schuseil 1993):

- 1) de maderas de angiospermas. Acetil-4-*O*-metilglucuronoxilano, con un grado de polimerización de 200.
- 2) de maderas de coníferas. Arabino-4-*O*-metilglucuronoxilano, con un grado de polimerización de 120.
- 3) De pastos. Arabino-4-*O*-metilglucuronoxilano, con un grado de polimerización de 70.

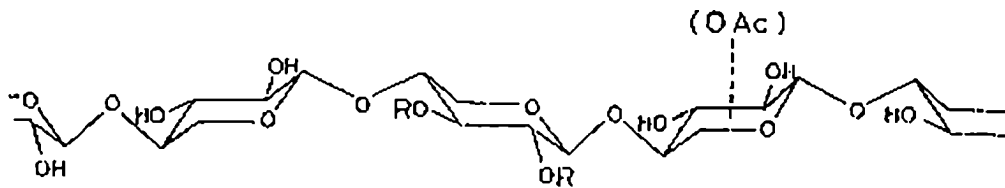


Figura II: Conformación de la molécula de xilano.

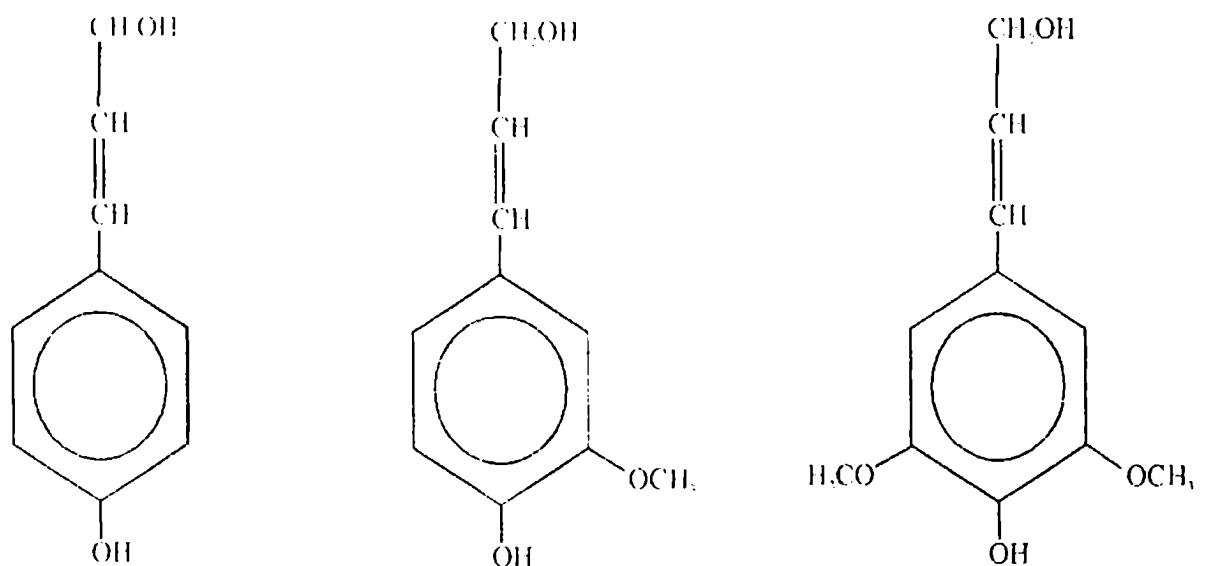
Las hemicelulosas cubren y unen a las microfibrillas de celulosa en una matriz común. Su bajo grado de polimerización incrementa la solubilidad de las hemicelulosas y su posición expuesta en las superficies de las microfibrillas, explican porqué son los primeros componentes de la pared vegetal que es atacada por los microorganismos, junto con las pectinas (Zabel y Morrel 1992).

1.1.3. Lignina

La lignina es el polímero aromático más abundante de la naturaleza. Es un compuesto insoluble en agua y amorfo. Está formada por polimerización al azar de unidades radicales de alcohol sinapílico, *p*-cumarílico y coniferílico (**Figura III**) las cuales son el resultado de deshidrogenaciones mediadas por peroxidación. Esta polimerización resulta en una estructura fenilpropanoide muy heterogénea donde los precursores se unen por diferentes tipos de ligaduras C-C y aril éter (C-O-C) (Sarkanen y Hergert 1971). En coníferas, la lignina está compuesta mayormente por coniferil alcohol,

mientras que en angiospermas hay iguales cantidades de coniferil y sinapil alcohol. La primer reacción en el proceso de polimerización de los monómeros es una oxidación que da una semiquinona, luego estos radicales libres reaccionan unos con otros para formar enlaces covalentes entre C-O o C-C. La ligadura más común es la del tipo éter entre 4-OH y C β de la cadena lateral dando un enlace β -O-4, este tipo de unión forma aproximadamente el 50% de los enlaces (Figura IV). En la figura V se observa la pared secundaria de una célula vegetal y la relación entre lignina, celulosa y hemicelulosa.

Esta asociación entre las microfibrillas de celulosa y la molécula amorfa de lignina resulta en un material muy rígido e impermeable al agua. La célula adquiere así una gran resistencia mecánica contra el ataque por microorganismos.



alcohol *p*-cumarílico

alcohol coniferílico

alcohol sinapílico

Figura III: Monómeros precursores de la molécula de lignina. La acción de lacasas y peroxidasas generan radicales libres en estos monómeros los cuales así activados se van polimerizando al azar y formando los más diversos tipos de uniones.

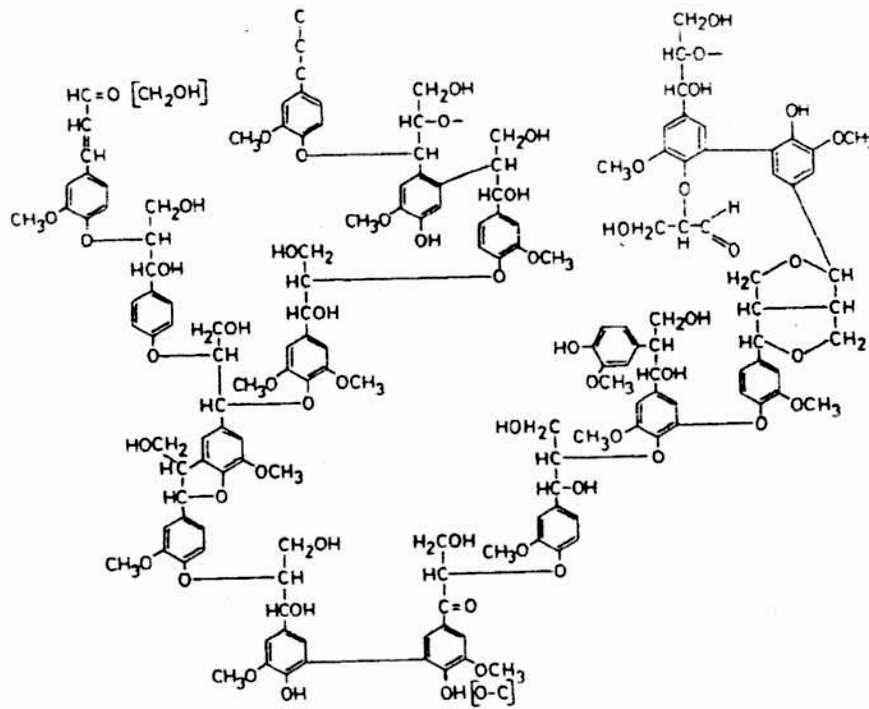


Figura IV: Fórmula esquemática ilustrando los tipos de uniones mayoritarias (β -O-4; C-C) que componen la molécula de lignina (Kirk y Cullen 1998).

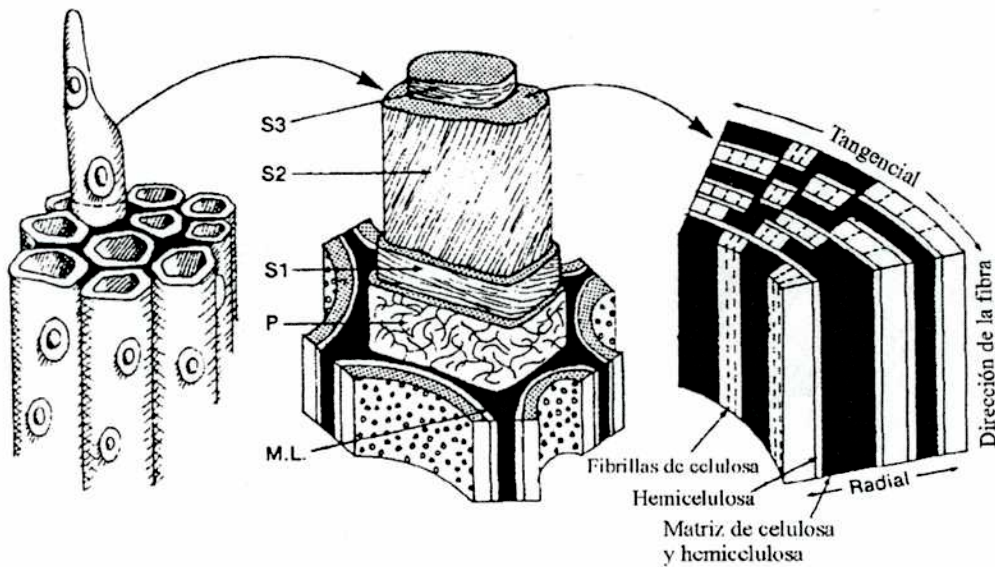


Figura V: Esquema ilustrando la morfología de traqueidas, paredes secundarias y la relación entre lignina, celulosa y hemicelulosa en la pared secundaria de una traqueida. El diámetro celular es de aprox. 25 μ m. S1-S3, pared secundaria; P, pared primaria; M.L., laminilla media (Kirk y Cullen 1998)

1.2. Hongos xilófilos

Aunque existen muchos microorganismos involucrados en la descomposición de la madera, los hongos son sin duda los que predominan. Dado que la madera está compuesta, como vimos anteriormente, por varios tipos de moléculas muy complejas, los hongos deben poseer sistemas enzimáticos y de regulación también complejos para degradar todos estos polímeros. El color y la textura que presenta la madera atacada por hongos se usó para categorizar los distintos tipos de pudriciones. Los tres mayores grupos de pudrición causada por hongos son: blanda, castaña y blanca. Los hongos causantes de pudrición blanda son en su mayoría Ascomycetes que en condiciones de muy alta humedad provocan este tipo de pudrición. La madera atacada presenta una estructura muy blanda y además las pérdidas de peso son muy significativas. Los hongos causantes de pudrición blanda involucran varios géneros: *Chaetomium*, *Cephalosporium*, *Allecheria*, *Graphium*, *Monodictys*, *Paecilomyces*, *Papulospora* y *Thielavia*. El ataque provocado por los hongos de pudrición castaña da como resultado una muy baja disminución en el contenido de lignina pero esta lignina residual resulta muy modificada. Estos basidiomycetes están muy relacionados taxonómicamente con aquellos causantes de pudrición blanca, y algunos géneros (p.e. *Poria*, *Polyporus*, *Lentimus*) incluyen especies que pueden ser agrupadas en uno u otro tipo de pudrición. En la madera la laminilla media y la pared primaria de las células son muy resistentes al ataque dado su alto contenido de lignina. La degradación está casi completamente concentrada a las capas S1 y S2 de la pared secundaria, las cuales están poco lignificadas. Como resultado de este proceso las maderas con este tipo de descomposición presentan un color castaño.

Los hongos causantes de pudrición blanca tienen la capacidad de degradar todos los componentes de la madera. Este grupo de hongos son los únicos que degradan la lignina a tasas altas llevándola a CO₂ (Kirk y Farrell 1987). Las tasas a las cuales la celulosa, hemicelulosa y lignina son degradadas depende del hongo y de las condiciones ambientales. Algunas especies son particularmente efectivas en degradar la lignina hasta su completa conversión. El ejemplo más relevante sin duda es el de “palo podrido”, en este sistema *Ganoderma applanatum* es capaz de degradar la lignina hasta que ésta llega a constituir solamente el 0,4% del peso total de la madera (Dill y Kraepelin 1986).

1.2.1. Enzimas extracelulares: secreción

El sistema de secreción enzimática en los hongos filamentosos presenta modificaciones con respecto al sistema estudiado en células eucarióticas dado que existe una direccionalidad en el crecimiento y en el transporte de nutrientes hacia el ápice hifal. Esta es el área activa de secreción enzimática. No se descarta, que exista una cierta actividad secretora a lo largo del resto del micelio para mantener la actividad metabólica.

Las celulasas fueron mucho más estudiadas que las ligninasas desde el punto de vista de los procesos de síntesis, transporte y secreción. Pero probablemente el proceso que siguen las ligninasas sea similar. De los estudios realizados se ha propuesto que las enzimas extracelulares son sintetizadas en el retículo endoplasmático y que es transferida rápidamente a vesículas que la transportan a otras vesículas en las que sufren las últimas modificaciones post traduccionales antes de ser secretadas al medio de cultivo. Para ser secretadas, las vesículas se funden con la membrana plasmática por un proceso de exocitosis. Una vez en el exterior las enzimas se adsorben rápidamente al sustrato disponible.

Las celulasas son realmente enzimas extracelulares ya que endoglucanasa y exoglucanasa, son secretadas al medio durante la fase de activo crecimiento con una tasa muy alta y son luego recuperables del medio de cultivo.

Las celulasas y ligninasas son glicoproteínas. Este dato es consistente con el concepto de que todas las proteínas de excreción en las células eucariotas son glicoproteínas. La porción glucosídica es añadida a las enzimas en la etapa post traduccional a través de un residuo de glucosamina y esta última modificación parece ser imprescindible para las enzimas de secreción.

Las enzimas del complejo celulolítico y ligninolítico existen en múltiples formas. La síntesis de isoenzimas puede deberse a productos de genes diferentes o a modificaciones postraduccionales. Se pueden sintetizar como consecuencia de estados fisiológicos diferentes (componentes del medio de crecimiento, diferentes pH, etc.) a partir de genes regulados diferencialmente. Es un hecho ya ampliamente observado que en medios de cultivo ligeramente diferentes se sintetizan diferentes formas de una misma enzima, que a pesar de poseer características catalíticas similares difieren notablemente en sus características fisico-químicas. Pero también el producto de un gen puede ser

modificado diferencialmente mediante glicosilaciones o digestiones proteolíticas luego de su secreción.

Si bien los estudios fisiológicos se llevan a cabo utilizando medios sintéticos con sustratos puros, en la naturaleza los hongos se encuentran con una amplia gama de sustratos celulósicos heterogéneos, y serían estos los reguladores de la aparición de las diversas isoenzimas fúngicas. Messner y Kubicek (1991), investigaron esta regulación, correlacionando la aparición de las diferentes formas enzimáticas con los sustratos utilizados.

1.2.2. Celulasas

A pesar del gran número de estudios, el mecanismo de la digestión enzimática de la celulosa cristalina aún no fue resuelto. Son necesarios al menos tres tipos de enzimas las cuales cooperan para la degradación de celulosa:

Endoglucanasas (EC 3.2.1.4.) EG:

Su acción se caracteriza por producir rupturas de los enlaces β -glucosídicos al azar disminuyendo el grado de polimerización de la celulosa. No es capaz de actuar sobre la celulosa cristalina, sino que lo hace sobre la celulosa amorfa, reduciendo así, su viscosidad.

Exocelulasas:

Estas enzimas producen principalmente rupturas secuenciales en la molécula de celulosa a partir de un extremo no reductor liberado. A este tipo actividad se la denominó procesiva. Están representadas por dos tipos de enzimas:

Celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91.) CBH:

liberan unidades de celobiosa a partir del extremo no reductor.

Glucosidrolasas (EC 3.2.1.74.) GH:

liberan unidades de glucosa a partir del extremo no reductor liberado. Generalmente actúan sobre dextrinas.

β -glucosidasas (EC 3.2.1.21.) BG:

Clivan los dímeros de celobiosa a los monómeros de glucosa. También pueden actuar sobre pequeños celooligosacáridos.

Existen actividades complementarias entre los tres tipos de enzimas y se piensa que son los responsables del efecto de sinergismo en la degradación, esto significa que la actividad de dos o varias enzimas es mucho mayor que la actividad individual por separado. Varios tipos de sinergismo fueron descritos, el más fácil de entender es aquel que se da entre las actividades exo y endoglucanasa (Nidetzky et al. 1994). Otro tipo de sinergismo más difícil de explicar es el que se da entre dos CBH (Barr et al 1996). Boisset y col. (2000) estudiaron el sinergismo entre Cel7A (CBHI) y Cel6A (CBHII), de *Humicola insolens* y observaron que la Cel6A posee actividad exo y endo y la describen como una enzima endo procesiva, y además Cel7A actúa a partir de los extremos reductores del polímero, por lo tanto proponen que este sinergismo entre las dos enzimas puede deberse a su doble actividad.

Los hongos de pudrición castaña, a diferencia de los de pudrición blanca, no son capaces de producir celobiohidrolasas, si bien sintetizan endoglucanasas y β -glucosidasas. Se sugiere que llevan a cabo la hidrólisis de la celulosa utilizando la endoglucanasa que producen asociada a factores no proteicos como H_2O_2 y Fe^{2+} (Uemura et al. 1993, Wood y García Campayo 1990).

Además de los tres tipos de enzimas mencionadas anteriormente, existen otras enzimas que también participan en la degradación de celulosa en ciertos casos. Los hongos de pudrición blanca sintetizan una enzima oxidativa, la celobiosa oxidasa (EC1.1.99.18). Se trata de una enzima flavin dependiente, con estructura similar al citocromo b, que posee un dominio de unión a la celulosa. Utiliza como aceptor electrónico el O_2 y produce H_2O_2 . Esta enzima puede actuar también con otros aceptores electrónicos como el citocromo c, diclorofenol-indofenol, Mn^{3+} y benzoquinonas (Bao et al. 1993a). Posiblemente esta enzima actúe oxidando el extremo reductor creado al romperse el enlace β -glucosídico tras la acción de la endoglucanasa. De esta manera se aseguraría que dicho enlace no se vuelva a formar.

La celobiosa quinona oxidorreductasa, una enzima flavin dependiente, que utiliza quinonas y radicales fenoxi como aceptores electrónicos es producida por todos los hongos de pudrición blanca conocidos. Se la considera un importante nexo entre los procesos de hidrólisis de celulosa y lignina (Eriksson et al. 1993). Roy y col. (1994) proponen un modelo que interrelaciona ambos procesos de hidrólisis en *Trametes versicolor*.

Las enzimas oxidativas dependientes de O₂ podrían estar involucradas también en la degradación de celulosa por *Polyporus adustus*, *Myrothecium verrucaria* y *Trichoderma reesei*, ya que la degradación de algodón por los sistemas enzimáticos de estos organismos se ve reducida un 50% cuando la atmósfera normal es reemplazada por N₂. Se han detectado ácidos glucónico y celobiónico en los sobrenadantes de cultivo de *T. reesei*. En contraste con estos resultados, se sabe que la capacidad para degradar celulosa por parte de *Fusarium solani*, *Penicillium funiculosum*, *Trichoderma koningii* y *Talaromyces emersonii* no es dependiente de la presencia de O₂. Sin embargo, es posible que posean una celobiosa deshidrogenasa similar a la de *Monilia* sp. que no utiliza O₂ ni quinonas como aceptores electrónicos (Coughlan y Ljungdahl 1988). De todos los hongos filamentosos estudiados, *T. reesei* ha sido el más utilizado en las investigaciones y también el elegido con fines de producción industrial de enzimas (Markham y Bazin 1991). La β-glucosidasa de *P. chrysosporium* fue expresada en la levadura metanoltrófica *Pichia pastoris* de este modo se logró multiplicar 38 veces la expresión de la proteína, haciendo más fácil su purificación y los estudios moleculares (Kawai et al. 2003)

Estructura molecular

En *T. reesei* se clonaron y secuenciaron dos celobiohidrolasas, cuatro endoglucanasas y una β-glucosidasa. Los estudios sobre la arquitectura de las celulasas fúngicas coinciden en que la estructura básica consiste en casi todos los casos en dos dominios. Un dominio núcleo ó catalítico, poco conservado y un dominio cola que sirve para unir la enzima al sustrato, muy conservado. Estas dos regiones están unidas entre sí por una región bisagra. Esta región es flexible y rica en prolina, treonina y serina.

Se ha visto que existen ciertos bloques muy conservados en las cuatro enzimas estudiadas. El bloque A (dominio de unión al sustrato) es el más conservado, presentando un 70% de homología entre las enzimas.

El dominio de unión al sustrato es N-terminal para las CBH II, y EG II pero es C-terminal para las CBH I, EG I y EG V. A pesar de que ambas enzimas son capaces de adherirse a la celulosa cristalina, lo hacen con diferentes especificidades y se postula que esta diferencia está relacionada con la acción sinérgica entre estas enzimas. Este dominio resulta de suma importancia al analizar su función en relación directa a la celulólisis. Es de esperar que una mejor adhesión al sustrato traería aparejada una mayor eficiencia del sitio activo. Puede tener también un papel fundamental al causar el

desplazamiento de la fibras de celulosa en las regiones cristalinas, permitiendo así la actividad enzimática en estas regiones de difícil acceso.

La región bisagra que conecta ambos dominios se encuentra altamente glicosilada, se supone que su función es prevenir el ataque proteolítico o bien, asegurara una distancia mínima entre los dos dominios principales. Esta región permite la unión al sustrato por el dominio de adhesión y deslizarse lateralmente llevando al dominio catalítico hacia nuevos sitios de corte (Srisodsuk et al. 1993).

El modo de acción de las enzimas está determinado exclusivamente por su dominio catalítico. Se vio que una enzima heteróloga con el núcleo de CBH I y cola de EG I presenta actividad exoglucanasa (Srisodsuk et al. 1997).

Así, un cambio de unos pocos aminoácidos en el dominio catalítico, conlleva a cambios drásticos en el modo de acción de la enzima. Esto explica las diferentes estrategias de ataque entre la CBH I y la EG I.

La estructura terciaria del dominio catalítico de la CBH I tiene forma de túnel que la hace eficiente para atacar la molécula desde los extremos. Sin embargo, con algunos aminoácidos cambiados, la EG I, posee un sitio activo más abierto conteniendo múltiples sitios secundarios, permitiendo rupturas de enlaces al azar dentro de la molécula.

1.2.3. Xilanasas

Las hemicelulasas se producen tempranamente en los procesos de pudrición y muchas veces están asociadas a la degradación de lignina. Las hemicelulosas degradadas proveerían de energía a los hongos ya que la lignina sola aparentemente no sirve como sustrato para el crecimiento (Kirk y Farrell 1987).

Dada la complejidad estructural del xilano, según la composición de la cadena principal, se requieren varias enzimas para lograr su modificación y completa degradación.

Para despolimerizar el xilano, se requieren las siguientes enzimas:

endo β -1,4 xilanasas (EC 3.2.1.8):

Esta enzima produce rupturas al azar entre unidades de xilosa, clivando los enlaces β -1,4. Produce una disminución drástica del grado de polimerización.

β-D 1,4 xilosidasa (EC 3.2.1.37):

Se trata de una exo enzima que ataca los dímeros de xilobiosa y xilooligosacáridos resultantes.

Las cadenas laterales son clivadas por una amplia variedad de enzimas, dependiendo de la naturaleza del xilano en cuestión. Entre ellas se pueden encontrar las siguientes enzimas:

1,4-β-D-glucosidasa

α-L-arabinosidasa

α-D-glucuronidasa

α-D-galactosidasa

Regulación

Las xilanasas, al igual que las celulasas son enzimas inducibles por sustrato y reprimibles por producto.

Dado que el xilano no es capaz de ingresar a las células, se postula que el real inductor, sería una molécula de bajo peso molecular, xilobiosa o xilotriosas. Estas serían el producto de la hidrólisis parcial del xilano que se llevaría a cabo por una muy pequeña cantidad de enzimas constitutivas, siempre presentes. También se ha logrado inducir el sistema xilanolítico en ausencia de xilano con variantes sintéticas de aril β-D-xilósidos y metil β-D-xilósidos (Bajpai 1997).

También se ha registrado la favorable inducción de celulasas en presencia de xilano como sustrato. Esto se observó en *Sclerotium rolfii* (Sachlehner et al. 1998). Al crecer en medios con xilano como fuente de carbono, varias especies son capaces de producir xilanasas específicas sin producir celulasas. Otras, como *Saccobolus saccoboloides* sintetiza tanto xilanasas como celulasas en este medio de cultivo (Magnelli 1998). La síntesis de xilanasas en presencia de celulosa podría deberse a la existencia de un sistema regulatorio común para ambas enzimas. En *Aspergillus oryzae* el activador transcripcional AoXlnR, media la expresión de genes de enzimas xilanolíticas y celulolíticas al producirse la inducción con xilano (Marui et al. 2002). Lo mismo ocurre en *A. niger* a través del factor XlnR (Gielkens et al. 1999).

Mecanismo de acción

Las enzimas que degradan las hemicelulosas son primariamente hidrolíticas y el patrón de ataque es análogo al de la degradación de celulosa por las celulasas. Sin embargo las exoenzimas están ausentes, debido probablemente al bajo grado de polimerización del sustrato (<200).

Dado que las hemicelulosas son heteropolímeros constituidos por diferentes azúcares, cadenas laterales y grupos sustituyentes, los procesos enzimáticos involucrados en su degradación son complicados para dilucidar (Zabel y Morrel 1992).

Las xilanasas son el grupo de enzimas más estudiadas entre las hemicelulasas ya que el xilano es el componente hemicelulolítico más abundante.

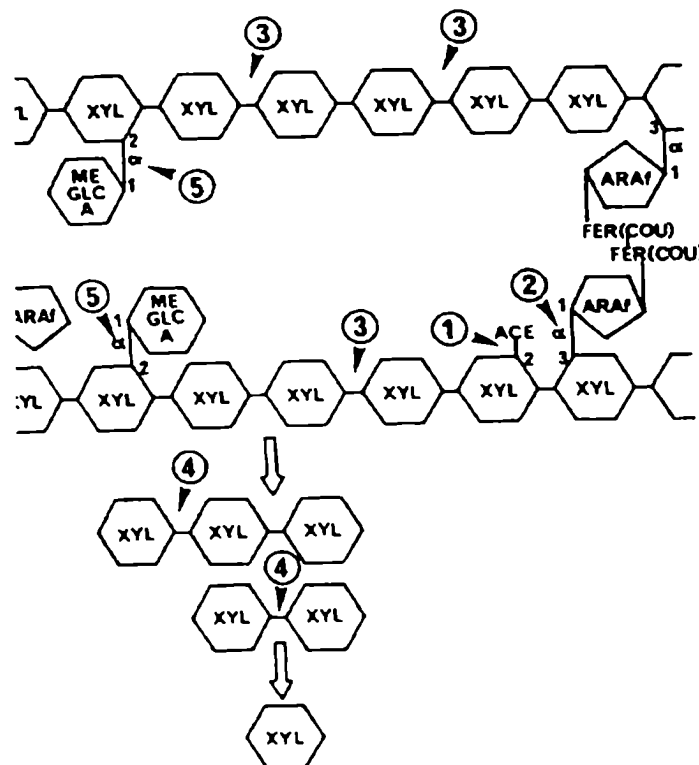


Figura VI: Enzimas involucradas en la degradación del xilano.

ACE: ácido acético, ARAf: arabinofuranosa, COU: ácido cumárico, FER: ácido ferúlico, MEGLCA: ácido metil glucurónico 4-O-metilglucurónico, XYL: xilosa. 1: acetilxilano esterasa, 2: α -arabinofuranosidasa, 3: endoxilanasas, 4: β -xilosidasa, 5: α -glucuronidasa.

La primer enzima en atacar el sustrato es la β -1,4-endoxilanasas. Esta produce rupturas del enlace glicosídico al azar dentro de la cadena principal del xilano, causando una disminución en el grado de polimerización (**Figura VI**). Producto de esta acción se liberan al medio xilooligosacáridos, xilobiosa y xilosa. La β -xilosidasa, una exoenzima

ejerce su acción luego, usando como sustrato los xilooligosacáridos y la xilobiosa y actuando a partir de los extremos no reductores de estas moléculas previamente liberadas por la endo xilanasa. Así, se obtiene como producto la xilosa.

Sin embargo un sistema xilanolítico completo requiere también de las enzimas que actúan sobre sus ramificaciones (Joseleau y Ruel 1994, Zabel y Morrel 1992).

1.2.4. Ligninasas

En 1983 se publicaron dos trabajos (Glenn et al. 1983, Tien y Kirk 1983) donde se mostró la purificación y caracterización de una enzima peroxidasa a partir de sobrenadantes de cultivo de *Phanerochaete chrysosporium*. Esta enzima fue capaz de oxidar compuestos no fenólicos aromáticos los cuales constituyen el 80% en la conformación de la lignina, por lo tanto se le atribuyó una importancia primordial en las primeras etapas del proceso ligninolítico, en los trabajos se refieren a esta enzima como “lignin peroxidase” (LiP). En 1985 se publica un trabajo (Glenn y Gold 1985) con la caracterización bioquímica de otra enzima capaz de oxidar compuestos fenólicos. Si bien era muy similar a la LiP en cuanto se trataba de una peroxidasa con un grupo hemo como cofactor, esta nueva proteína poseía la particularidad de depender del dicatión Mn^{2+} para mostrar actividad y completar su ciclo catalítico. Se la denominó “manganese-dependent peroxidase” (MnP). Una tercer enzima implicada en el proceso es la lacasa. Esta enzima oxida preferentemente compuestos fenólicos y es la más ampliamente distribuida entre los hongos de pudrición blanca, aunque es interesante destacar que *P. chrysosporium* no posee actividad lacasa salvo en condiciones especiales de cultivo y, en ese caso, las actividades alcanzadas son muy bajas comparadas con aquellas observadas en la mayoría de este tipo de hongos. Recientemente se purificó y se caracterizó a nivel molecular y bioquímico, un cuarto tipo de enzima (Camarero et al. 1999) bastante particular dado que posee características de LiP y de MnP, es una peroxidasa hasta el momento solamente encontrada en *Pleurotus eryngii* (Camarero et al. 1999) y *Bjerkandera adusta* (Mester y Field 1998). En términos catalíticos esta proteína muestra actividad para sustratos típicos de LiP y MnP y en cuanto a su estructura molecular, tiene una zona de unión a manganeso tal cual la MnP y otra zona de unión a sustratos como el veratril alcohol, esto pone de manifiesto las relaciones evolutivas entre estas tres peroxidases.

La producción de estas enzimas puede ser asociada a situaciones de estrés. Entre los compuestos estresantes están los metales pesados. Un interesante trabajo es el de Baldrian (2003) donde revé el efecto de los metales pesados sobre la fisiología del crecimiento y la producción enzimática. Altas concentraciones de cobre disparan la producción de lacasa y en algunos casos de MnP (Levin et al. 2002). En *Stereum hirsutum* la producción de lacasa es promovida por cromo y en menor medida por hierro y zinc (Mouso com. personal), en *Pleurotus ostreatus* el cadmio, un metal pesado, incrementa la actividad lacasa en cultivos líquidos (Baldrian y Gabriel 2002). El promotor de lacasa contiene sitios de unión a metales (Palmieri et al. 2000), como ocurre con la inducción de metalotioneinas, proteínas ligadoras de metales, que se inducen en condiciones de estrés por metales pesados. En condiciones de estrés oxidativo con altas presiones parciales de O₂ en *P. chrysosporium* se induce la síntesis de LiP (Zacchi et al. 2000a), también se induce con bajas concentraciones de N y carbono, y el hecho de que típicamente las produzca en fase estacionaria la cual es una situación de estrés. Diversos compuestos aromáticos tóxicos también promueven la síntesis enzimática. Una posible función sería la de detoxificar, dado que los compuestos aromáticos son polimerizados por acción de estas enzimas (Aktas y Tanyolac 2003, Iwahara et al. 2000, Ruttimann-Johnson y Lamar 1996, Ward et al. 2001). El agregado del bromuro de etidio un conocido compuesto tóxico cancerígeno condujo a una hiperproducción de lacasa en *Cyathus bulleri* (Dhawan et al. 2003).

1.2.4.1. Lignina peroxidasa LiP (E.C:1.11.1.14)

Phanerochaete chrysosporium produce lignin peroxidases (LiPs), una familia de proteínas glicosiladas con un grupo hemo como cofactor, y es la enzima mayoritaria de su sistema ligninolítico. Se encontraron hasta 15 isoenzimas dependiendo del medio de cultivo que se utilice para producirlas. Dos buenos trabajos de revisión que nos introducen en el tema de las ligninasas de *P. chrysosporium* son el de Reddy (Reddy y D'Souza 1994) y el de Gold (Gold y Alic 1993). Las experiencias en fisiología de degradación de lignina se hacen importantes en número en la década del '70 y el científico más productivo sin duda fue Kirk, quien trabajó con una cepa de *P. chrysosporium* y lignina sintética marcada con ¹⁴C como sustrato. Dado que las condiciones de cultivo de esta cepa que afectan la degradación de lignina y que sus

enzimas habían sido purificadas, diferentes grupos de trabajo se volcaron a profundizar en el estudio de las ligninasas de este hongo.

Caracterización bioquímica y estructura molecular

Las enzimas son codificadas por un grupo de al menos 10 genes los cuales podrían haber surgido por duplicación (Stewart y Cullen 1999). La proteína se sintetiza como una preproenzima, con 21 aminoácidos a modo de señal y 7 u 8 como propéptido (Gold y Alic 1993). La estructura cristalina de la LiP de *P. chrysosporium* mostró que posee 4 puentes disulfuro y un sitio de glicosilación ubicado en un residuo Asp superficial (Du et al. 1992). Además de su grupo hemo posee 2 átomos de calcio como grupo prostético los cuales junto con la glicosilación, juegan un papel importante en la estabilidad (George et al. 1999, Nie et al. 1999). El peso molecular de estas enzimas está entre 38.000 y 43.000 (Reddy y D'Souza 1994). Son proteínas globulares formadas por 11 ó 12 hélices α , en una cavidad central de la proteína se ubica el grupo hemo.

Regulación

La producción de LiP está fuertemente regulada a nivel de su transcripción por nitrógeno (Li et al. 1994), altas concentraciones de este nutriente inhiben su producción, también está regulada por carbono pero se trata de regulaciones independientes (Van der Woude et al. 1993). El oxígeno también influye fuertemente en la regulación, es una práctica común ventilar con oxígeno puro a los cultivos para obtener una buena producción de LiP, este proceso de inducción fue estudiado utilizando microscopía electrónica de transmisión observándose que el micelio tratado con atmósfera de oxígeno y activo productor de LiP mostraba una desorganización a nivel de su ultraestructura celular (Zacchi et al. 2000a), también cultivos con celulosa cristalina como fuente de carbono y bajo una atmósfera de aire presentaban una morfología igual a la anterior y además eran productoras de LiP (Zacchi et al. 2000b). La utilización de celulosa como fuente de carbono hace que la tasa de obtención de carbono utilizable sea muy lenta y debido a este hecho desarrollan un estado hiperoxidante por una deficiente homeostasis de oxígeno, por lo tanto la condición de estrés oxidativo es el verdadero inductor de esta actividad en lugar del oxígeno por sí mismo. Hay hongos en los cuales se detectaron genes de LiP pero no pudo lograrse medir esta actividad en sobrenadantes, es probable que tengan un mecanismo aún desconocido de regulación o quizá produzcan

una proteína inactiva (Rajakumar et al. 1996). La actividad peroxidasa depende de la presencia extracelular de H_2O_2 , el cual es suministrado por enzimas tales como la glioxal oxidasa y la glucosa-2-oxidasa o por sistemas no enzimáticos como por ejemplo las reacciones via Fenton.

Mecanismo de acción

Si bien para *P. chrysosporium* la presencia de LiP es importante para llevar a cabo el proceso de ligninólisis dado que sólo se alcanza el 16% de este proceso en mutantes carentes de LiP (Boominathan et al. 1990), en la mayoría de los hongos de pudrición blanca no existe la enzima LiP (Hatakka 1994, Peláez et al. 1995, Tekere et al. 2001a, Tekere et al. 2001b) sin embargo poseen igual capacidad degradativa que *P. chrysosporium*. La purificación y caracterización de esta enzima se llevó a cabo en otros hongos por ejemplo: en *T. versicolor* (Johansson et al. 1993, Johansson y Nyman 1993), *Bjerkandera* BOS55 (ten Have et al. 1998), *Flavodon flavus* (Raghukumar et al. 1999). La LiP actúa mediante un típico ciclo catalítico (**Figura VII**). La enzima es oxidada por H_2O_2 y pasa a un intermediario deficiente en 2 electrones al cual se llamó Compuesto I, éste retorna a su estado primario o nativo por medio de dos oxidaciones cada una de ellas pone en juego un electrón. Luego de la primera oxidación, cuando la enzima es deficiente en un electrón se la llamó Compuesto II. La principal característica de la LiP, y por la cual se la consideró la enzima más importante, es su capacidad de oxidar sustratos no fenólicos. Estas enzimas son oxidantes muy poderosos y se vió que también pueden oxidar éteres aromáticos, aromáticos policíclicos (Kersten et al. 1990) compuestos fenólicos (Reddy y Gold 2000) y manganeso (Khindaria et al. 1995). Si bien existe una amplia especificidad de sustratos, el sitio catalítico de esta enzima es único (Timofeevski et al. 2000). Su principal sustrato es el veratril alcohol (VA) el cual es oxidado pasando a VA^{\cdot} este compuesto así oxidado funciona oxidando otros sustratos, es decir que actúa como mediador, sin embargo también se vió que existe una interacción directa de la enzima con la molécula de lignina (Johjima et al. 1999). Por lo tanto existen dos procesos catalíticos en los cuales interviene el VA, (i) cuando el sustrato a oxidar es del tipo no fenólico entonces el VA reduce al Compuesto II el cual tiene un bajo potencial redox y por lo tanto sería incapaz de oxidar un sustrato no fenólico, de esta manera la enzima pasa a su estado nativo completando su ciclo (Koduri y Tien 1994) (ii) cuando los sustratos son del tipo fenólico o de potencial redox bajo

entonces el radical catiónico del VA ($VA^{\cdot+}$) actúa como mediador redox (Harvey y Palmer 1990, Paszczynski y Crawford 1991)

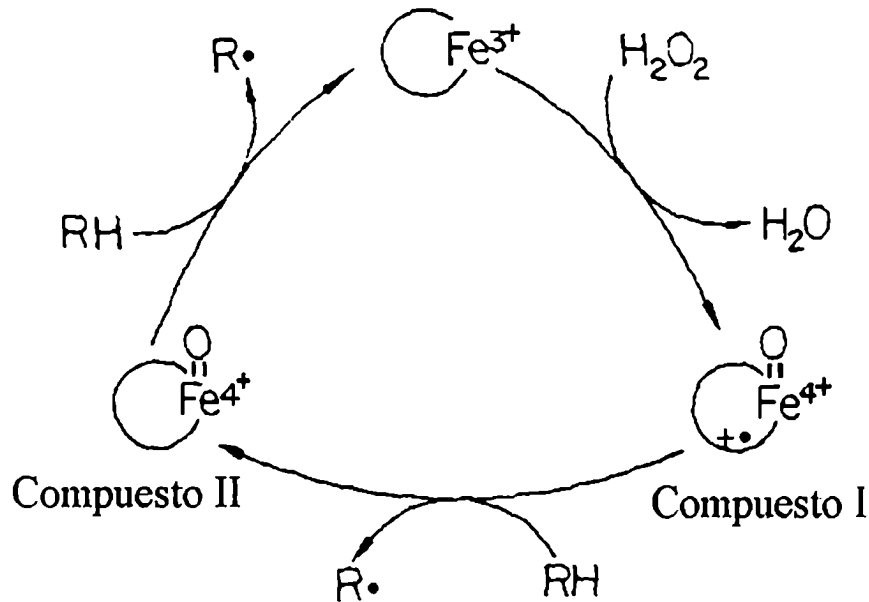


Figura VII: Ciclo catalítico de la LiP ilustrando varios estados de reducción del grupo hemo. La enzima nativa reacciona con H_2O_2 para producir un intermediario oxidado de dos electrones, compuesto I, el cual luego oxida al sustrato lignina (RH) o VA para dar un estado intermediario oxidado de un electrón, compuesto II, y un radical del sustrato. El compuesto II luego retorna a su estado nativo mediante una oxidación de una segunda molécula de sustrato (Gold et al. 1989).

Producción y aplicación

Más que la aplicación de la enzima pura o extractos crudos en procesos biotecnológicos, es mucho más usual el empleo de cultivos completos para estudiar los procesos de degradación con vistas a sus probables aplicaciones (Hodgson et al. 2000, Kunz et al. 2001, Mielgo et al. 2001, Van y Agathos 2002). Esto probablemente se deba a que la producción es muy baja y no se encontraron compuestos que puedan incrementarla de manera significativa. Por otro lado los inductores que se usan (oxígeno, celulosa cristalina) tienen un costo demasiado elevado para poder emplearlos a gran escala.

1.2.4.2. Manganese Peroxidasa MnP (E.C:1.11.1.13)

Caracterización bioquímica y estructura molecular

La MnP es muy similar a la LiP, la principal diferencia es que depende de Mn^{2+} para completar su ciclo catalítico. El parecido entre estas dos proteínas se manifiesta cuando una simple mutación puede adicionar un lugar con actividad VA oxidasa (Timofeevski et al. 1999) del mismo modo una MnP puede ser construida a partir de una citocromo c peroxidasa (Yeung et al. 1997). Además las secuencias alrededor y próximas al sitio activo son conservadas entre LiP, MnP, citocromo c y las peroxidases de plantas (Gold y Alic 1993). La enzima es sintetizada con una secuencia señal (Gold y Alic 1993). El residuo Arg177 cumple un papel importante en el eficiente pegado de Mn^{2+} (Gelpke et al. 2000, Sollewijn et al. 1999), mientras que residuos Cys forman 5 puentes disulfuro que le dan termoestabilidad a la proteína (Reading y Aust 2000), recordemos que en la LiP sólo se formaban 4 puentes. También, al igual que la LiP posee dos iones calcio y un hemo como grupo prostético todo esto aporta para la funcionalidad y la estructura tridimensional de la proteína. Se vio que existe una relación sinérgica compleja entre la estructura secundaria, terciaria y el pegado de los iones calcio, el grupo hemo y los puentes disulfuro en relación a la estabilidad de la enzima hacia agentes oxidantes y reductores (Banci et al. 2003). El lugar de pegado del Mn^{2+} comprende los residuos Asp179, Glu35 y Glu39 (Kusters-van Someren et al. 1995, Sundaramoorthy et al. 1994) mientras que Asp242 y Phe190 tienen influencia directa sobre el ambiente electrónico de la zona de pegado (Whitwam et al. 1999). Los genes codificantes fueron identificados y caracterizados en varios hongos p.e. *P. chrysosporium* (Mayfield et al. 1994), *Dichomitus squalens* (Li et al. 1999) y *Ceriporiopsis subvermispora* (Tello et al. 2000). La estructura cristalina de esta enzima también es muy similar a la LiP, posee dos iones calcio estructurales. El sitio activo consiste en un residuo ligando His unido a un residuo Asp por medio de un puente de H. El sitio de unión a H_2O_2 consiste en los residuos His y Asp idéntico al de la LiP y la citocromo c peroxidasa de levaduras (Sundaramoorthy et al. 1994).

Regulación

Al igual que la LiP, la MnP es regulada por N a nivel transcripcional (Pribnow et al. 1989, Van der Woude et al. 1993), además en *P. chrysosporium* la MnP es regulada a

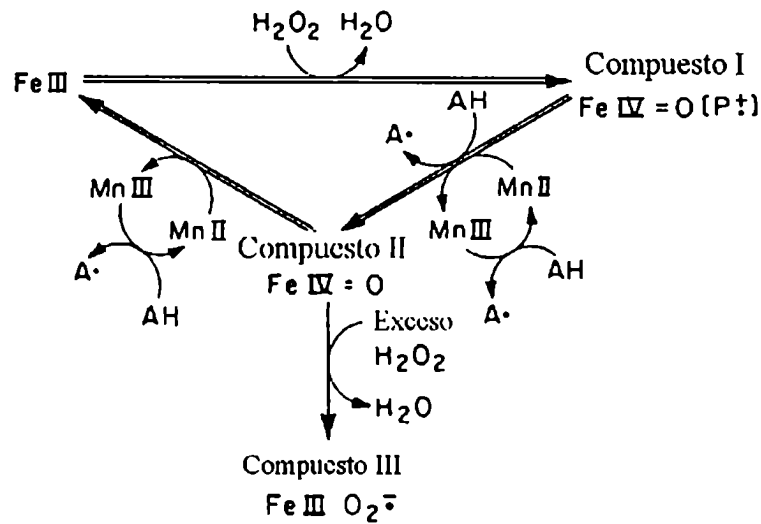
igual nivel por Mn^{2+} , H_2O_2 , etanol, 2,4 diclorofenol, O_2 y shock térmico (Godfrey et al. 1990, Li et al. 1995). Los genes que codifican para MnP pueden ser regulados diferencialmente en un mismo organismo algunos de estos genes poseen zonas de respuesta a metales (Johansson et al. 2002, Scheel et al. 2000) probablemente esta regulación diferencial se deba a que además de variantes alélicas de un mismo gen pueden existir genes independientes (Li et al. 1999). La producción de MnP también puede ser inducida por compuestos aromáticos como VA o Gu, esto se observó en *P. chrysosporium*, *Irpex flavus*, *Polyporus sanguineus*, y *Coriolus versicolor* (Gill y Arora 2003). Hasta el momento uno de los inductores más potentes para la MnP es el Mn^{2+} , el cual es ampliamente utilizado para optimizar la producción de esta enzima y es agregado al medio de cultivo como $MnSO_4$ (Fu et al. 1997, Mester y Field 1997, Ziegenhagen y Hofrichter 2000). Al manganeso se le puede asignar un triple rol: (i) un cofactor esencial para la actividad de la proteína, el Mn^{2+} es oxidado a Mn^{3+} el cual luego oxida los sustratos (Glenn et al. 1986); (ii) regula la expresión de la MnP por medio de la activación del gen *mnp* (Brown et al. 1990) y (iii) posee un efecto inhibitorio sobre la producción de VA el cual está altamente correlacionado con los títulos de LiP dado que este metabolito protege a la enzima de la oxidación por exceso de H_2O_2 (Mester et al. 1995). En *Pleurotus pulmonarius* se observó que la enzima es muy inestable a concentraciones de 200 μM de H_2O_2 (Böckle et al. 1999).

Mecanismo de acción

La **figura VIII** ilustra el ciclo catalítico de la MnP. Dado que posee un mecanismo similar al que encontramos en la LiP de *P. chrysosporium*, a los intermediarios también se los llamó Compuesto I (CI) y Compuesto II (CII). El CI puede oxidar Mn^{2+} o compuestos fenólicos pero el CII sólo puede oxidar Mn^{2+} . Ambas peroxidasas (LiP y MnP) necesitan H_2O_2 como aceptor de electrones para pasar al estado de CI, y se vió que la mayor cantidad de H_2O_2 proviene de la oxidación de ácido glioxílico (Urzúa et al. 1998a). El exceso de H_2O_2 provoca la formación del Compuesto III, cuando la enzima alcanza este estado se inactiva de manera irreversible y se libera un anión superóxido; lo mismo ocurre con la LiP. Mn^{2+} actúa como donador de un electrón para esta porfirina intermediaria del CI y es oxidado a Mn^{3+} y el CI pasa a CII. La oxidación del CII procede de forma similar y otro Mn^{3+} es formado a partir de Mn^{2+} y se genera así la enzima nativa. El CI puede ser reducido también por ferrocianida y fenólicos pero el CII

sólo puede ser reducido por Mn^{2+} , es decir que este catión es absolutamente necesario para que la enzima vuelva a su estado nativo o de reposo. Para su oxidación, el Mn^{2+} llega hasta un propionato del hemo y sus tres residuos ácidos que lo rodean, luego un electrón es transferido desde el Mn^{2+} hasta el grupo hemo a través del brazo del propionato. Una vez que el Mn^{2+} es oxidado a Mn^{3+} , este último es acomplejado con ácidos orgánicos, principalmente oxalato, producidos por el hongo (Urzúa et al. 1998b, Pérez y Jeffries 1993). La formación de este complejo hace mucho más estable al Mn^{3+} el cual puede difundir hasta alcanzar sus sustratos (Pérez y Jeffries 1993). La termoestabilidad es incrementada en presencia de Mn^{2+} o Cd^{2+} , ambos iones tienen una constante de pegado a la MnP muy similar, lo que sugiere un segundo sitio de pegado del Mn^{2+} (Youngs et al. 2000). En un principio sólo se había visto la oxidación de compuestos fenólicos (Banci et al. 1999, Urzúa et al. 1998b) los cuales, debido a que poseen un potencial redox más bajo que los compuestos no fenólicos, son más fácilmente oxidables que éstos; sin embargo la oxidación de compuestos no fenólicos por la MnP también fue observada (Kapich et al. 1999, Wariishi et al. 1989), y uno de los mecanismos utilizado es mediante la peroxidación de ácidos grasos insaturados (Bao et al. 1994), también se observó que es capaz de clivar la unión β -diaril propano en un modelo no fenólico de lignina (Reddy et al. 2003). En *Lentinula edodes* se observó que la reactividad de fenólicos y no fenólicos con la MnP era muy diferente siendo los fenólicos mucho más reactivos que los no fenólicos (Crestini et al. 2000). El mecanismo mediado por la peroxidación de lípidos no sólo fue observado en la oxidación de compuestos no fenólicos sino también se vio en la oxidación de compuestos fenólicos (Kapich et al. 1999). Es interesante destacar que los hongos causantes de pudrición castaña carecen de actividad celobiosa deshidrogenasa esta enzima pasa compuestos no fenólicos a fenólicos haciendo que éstos sean mucho más fácilmente degradables por la MnP (Hilden et al. 2000).

Figura VIII (página siguiente): Ciclo catalítico de la MnP de *Phanerochaete chrysosporium* (Gold et al. 1989). El ciclo es similar al de la LiP sólo que depende de Mn^{2+} para completarlo. El compuesto I puede oxidar Mn II o sustratos, en la mayoría de los casos, fenólicos; el compuesto II solamente puede oxidar Mn II, por este motivo resulta dependiente de Mn II para completar su ciclo catalítico. Excesos de H_2O_2 lleva al compuesto II hasta un estado inactivo denominado compuesto III (lo mismo ocurre con la LiP).



Producción y aplicación

A diferencia de la LiP, la MnP es muy común en hongos de pudrición blanca (Hofrichter 2002). El potencial degradativo de la MnP hace que esta enzima sea interesante para usar en procesos biotecnológicos, como por ejemplo en el pulpado y blanqueado de pasta de papel. Con la MnP de *P. sordida* se vió que hubo cambios sustanciales incluyendo un aumento en el blanqueado en la lignina del salvado de trigo y pulpa de madera a las cuales se intentó blanquear (Kondo et al. 1994). Lo mismo ocurrió con la MnP de *Trametes versicolor* donde la extracción de lignina por el método tradicional (con álcali) luego del tratamiento fue mucho más fácil (Reid y Paice 1998). Para aumentar la capacidad que tiene la MnP para el blanqueo de pulpa de papel se probó con compuestos cuya función sería la de mediadores, entre éstos los más eficaces resultaron ser los ácidos grasos insaturados (Bermek et al. 2002).

Para producir MnP se comenzaron a emplear medios de cultivo sólido a base de sustratos lignocelulósicos, la ventaja de estos medios es que se trata de sustratos baratos y que no deben adicionarse con inductores dado que los aromáticos solubles que existen en estos sustratos son suficientes para lograr una buena producción (Hofrichter et al. 1999, Mata y Savoie 1998, Vyas et al. 1994). Otra técnica que dio muy buen resultado es la que se basa en la inmovilización del micelio utilizando celulosa y polipropileno como soporte, la ventaja es que el micelio puede ser reutilizado para cumplir varios ciclos de producción (Ziegenhagen y Hofrichter 2000), el uso de organismos hipersecretores de esta actividad también son interesantes para la producción a gran escala (Herpoel et al. 1999).

También se están llevando a cabo investigaciones sobre la expresión heteróloga de esta enzima en organismos modelo para estas prácticas como lo son *Aspergillus oryzae* (Stewart et al. 1996) y *Escherichia coli* pero aún no ha sido producida a gran escala utilizando esta técnica (Whitwam et al. 1995), también se probó la expresión de una MnP termoestable proveniente de *Dichomitus squalens* en *P. chrysosporium* pero la proteína producida por *D. squalens* resultó ser más estable, es decir que las modificaciones postraduccionales afectan la termoestabilidad de estas enzimas (Li et al. 2001).

Entre los compuestos xenobióticos que fueron probados para su degradación por la MnP están los clorofenoles, en este caso la MnP proveniente de *Lentinula edodes*, fue inmovilizada por una unión covalente de su grupo carboxílico y el complejo Mn^{3+} con su quelante fueron utilizados para degradar los clorofenoles (Grabski et al. 1996, Grabski et al. 1998), los procesos más eficientes de degradación se dan con cultivos completos, una de las razones es que hay una constante producción enzimática que contrarresta la inactivación. Dado que los compuestos a degradar son fungicidas o inhiben el crecimiento fúngico, es necesario encontrar la forma de preadaptar al organismo a estos compuestos (Leontievsky et al. 2002) por otro lado la MnP de *P. chrysosporium* degradó hasta el 82% del 2 amino 4,6 dinitrotolueno (Van Aken et al. 2000), esta enzima también fue utilizada para degradar ácidos húmicos con lo cual podría tener aplicaciones en el mejoramiento de los suelos (Ziegenhagen y Hofrichter 1998), un químico bastante tóxico como lo es el bisphenol A fue degradado completamente por la MnP de *P. ostreatus* (Hirano et al. 2000) y por último, aunque existen muchos ejemplos más, la utilización de esta enzima para el proceso de blanqueado de la pulpa de papel está siendo intensivamente estudiada debido a que sería una forma mucho más barata y no contaminante para fabricar papel (Sasaki et al. 2001) además los efluentes provenientes de la fabricación clásica de papel pueden ser blanqueados y degradados con esta enzima (Bergbauer y Eggert 1994).

1.2.4.3. Lacasa (E.C:1.10.3.2)

Caracterización bioquímica y estructura molecular

La purificación de laccasas fue llevada a cabo en varias especies: *Marasmius quercophilus* (Dedeyan et al. 2000), *Trametes versicolor* (Bertrand et al. 2002a) *Pycnoporus cinnabarinus* (Antorini et al. 2002) *Trametes multicolor* (Leitner et al.

2002), *Lentinula edodes* (Nagai et al. 2002), *Ganoderma lucidum* (Ko et al. 2001), *Pleurotus florida* (Das et al. 2001). Todas estas lacasas purificadas de diferentes especies mostraron ser similares en sus características fisicoquímicas. En *Coprinus cinereus* estas enzimas revelaron poseer 4 iones cobre en su estructura (Ducros et al. 2001) el Ascomycete *Melanocarpus albomyces* mostró ser similar (Hakulinen et al. 2002). Estos átomos de cobre están clasificados en tres tipos (I, II, III) con distintas propiedades espectrofotométricas y paramagnéticas (Reinhammar y Malmstrom 1981). El Cobre I confiere un color gris azulado a la proteína, de ahí que este tipo de enzimas se conozca con el nombre de oxidasas azules. Tiene una alta absorbancia en la región del visible (605 nm) y un coeficiente de extinción superior a $3000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. El cobre tipo II se caracteriza por no presentar absorbancia detectable en la región del visible y por tener una alta afinidad por aniones como F^- , N_3^- , y CN^- los cuales actúan como inhibidores de la enzima. Por último el cobre tipo III es un complejo binario formado por un par de iones Cu^{2+} - Cu^{2+} con un máximo de absorción a 330 nm, que desaparece cuando se reduce el centro activo de la enzima (Yaropolov et al. 1994). Estos iones cobre también cumplen un papel importante en la termoestabilidad de la enzima, el vaciamiento de la enzima hace que la apoenzima sea muy termosensible (Ragusa et al. 2002). El sitio de pegado de estos iones cobre es muy conservado y por lo tanto puede ser utilizado por ej. para hacer estudios de diversidad genética funcional (Lyons et al. 2003). En cuanto a su sitio activo, la lacasa mayoritaria de *T. versicolor* posee un sitio de pegado a 2,5 xilidina y este sitio es hidrofóbico y amplio como para permitir que se acomoden sustratos aromáticos de diferentes tamaños (Bertrand et al. 2002b) cabe esperar que la mayoría de las lacasas sean similares dado que todas poseen una gran amplitud de sustratos, además el estudio de lacasas muy diferentes en su composición aminoacídica, propiedades fisicoquímicas y contenido de carbohidratos mostraron igual orden de preferencia en sus sustratos por lo tanto la interacción entre la enzima y el sustrato sería igual en todas las lacasas fúngicas (Smirnov et al. 2001, D'Souza et al. 1999).

Regulación

La producción de actividad lacasa puede ser regulada por una gran cantidad de compuestos nutrientes. Existe una gran variedad de compuestos aromáticos que dependiendo del hongo pueden aumentar la actividad lacasa en cultivo. El ácido tánico

ostreatus (Suguimoto et al. 2001). La formación de los cordones micelianos por *Armilaria melea* está relacionada también con la actividad lacasa (Rehman y Thurston 1992). Otro de los procesos en los cuales está implicada esta actividad es la patogenicidad, el patógeno de raíz, *Heterobasidion annosum* depende de su actividad lacasa para su virulencia (Johansson et al. 1999), en *Cryptococcus neoformans*, la patogenicidad hacia humanos también depende de la actividad lacasa del hongo (Liu et al. 1999, Mylonakis et al. 2002), la inhibición de la lacasa de *Botrytis cinerea* previene la infección de las cucurbitáceas por este hongo (Viterbo et al. 1993). Está implicada también en los efectos antagonistas entre *Trichoderma* y *Lentinula edodes*, las actividades de *Trichoderma* aumentan en el momento del ataque a *L. edodes* mientras que las actividades de este último se inhiben (Hatvani et al. 2002), algo muy similar ocurre en el sistema *Rhizoctonia solani* y su patógeno *Pseudomonas fluorescens* (Crowe y Olsson 2001) probablemente los patógenos dependan de su actividad lacasa para su virulencia debido a que pueden detoxificar casi cualquier compuesto que sea liberado por el hospedador como mecanismo de defensa. La cantidad de sustancias tóxicas que pueden detoxificar es muy vasta y están descritas en el trabajo de revisión de Pointing (2001). Por otro lado también está involucrada en los mecanismos de defensa de las plantas hacia organismos patógenos (Li et al. 2002). Otro proceso relacionado con la lacasa es el de melanización, la pigmentación de los conidios de *Trichoderma harzianum* y *T. atroviride* se correlaciona con esta actividad (Holker et al. 2002) lo mismo ocurre con las endosporas de algunas bacterias (Castro-Sowinski et al. 2002). Por último, esta enzima está implicada en los procesos de ligninólisis dado que puede oxidar las uniones entre las unidades que componen la molécula de lignina. Además esta enzima resultó ser esencial para la degradación de este polímero por *Pycnoporus cinnabarinus* el cual no produce actividades MnP ni LiP (Eggert et al. 1997).

Mecanismo de acción

La lacasa es una oxidasa que a diferencia de la mayoría de estas enzimas, reduce el O₂ y produce H₂O en lugar de H₂O₂. Basicamente cualquier sustrato con características similares al *p*-difenol puede ser oxidado por las lacasas. Además, al menos algunas de las lacasas fúngicas pueden oxidar monofenoles tales como el cresol y ácido ascórbico. Debido a esta amplitud de sustratos algunos son compartidos con las peroxidasas (Mayer y Staples 2002, Scherer y Fisher 1998). El paso inicial del ciclo catalítico de la

lacasa en presencia de oxígeno, implica la transferencia de un electrón desde el dador electrónico (AH) al cobre I. En el siguiente paso se transfieren dos electrones de un sustrato al complejo binario cobre III y dos protones del medio. Estos dos electrones son aceptados por uno de los dos átomos de oxígeno (O_2^{-2}) que junto con el otro electrón transferido en el paso anterior por el cobre I origina una molécula de agua, dejando otro átomo de oxígeno como un radical hidroxilo disociado ($O\cdot$). Un cuarto electrón de un sustrato es transferido al cobre II. Este electrón y otros dos protones del medio son transferidos al radical hidroxilo disociado para formar otra molécula de agua y recuperar la enzima en su configuración nativa.

La enzima lacasa fue mucho más estudiada que las dos peroxidasas anteriores (LiP y MnP), esto se debe a que la mayoría de los hongos de pudrición blanca poseen esta actividad, es muy fácilmente inducible y además su rango de sustratos que en un principio eran del tipo fenólico fue extendido a los del tipo no fenólico mediante el uso de compuestos aromáticos que actúan como cooxidantes como el 1-hidroxibenzotriazol (1-HBT), 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazoline-6-sulfonato) (ABTS), N-hidroxifalimida o 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-iloxi (D'Acunzo et al. 2002, Bourbonnais et al. 1997, Soares et al. 2001a), los mecanismos de reacción en presencia de estos compuestos están comenzando a ser dilucidados (Kawai et al. 2002). Los cooxidantes también son llamados mediadores pero el hecho de que sólo sean activos en presencia de la enzima hace que sea más correcto denominarlos cooxidantes (Bourbonnais et al. 1997). Los cooxidantes son por lo general moléculas chicas que actúan como dadores de electrones una vez oxidado por la enzima, el sistema enzima/cooxidante difunde y oxida cualquier sustrato que debido problemas estéricos no puede llegar al sitio activo. También se vio que la lacasa tiene actividad sobre ácidos grasos y resinosos provenientes de madera (Karlsson et al. 2001) o sobre otros ácidos grasos insaturados como la linoleína sin que necesariamente exista una reacción mediada por cooxidantes (Zhang et al. 2002).

Producción y aplicación

Actualmente varios grupos están llevando a cabo estudios para incrementar la producción de esta enzima mediante el uso de los más variados medios de cultivo. La producción en fermentaciones sólidas se preparan con sustratos lignocelulósicos, y esta es la manera más barata de producir estas enzimas. Debido a que se trata de una enzima muy común entre los hongos de pudrición blanca, no requiere H_2O_2 para su

funcionamiento y además es de muy fácil inducción ésta es la enzima ligninolítica más promisoría para aplicaciones biotecnológicas a nivel industrial. Investigaciones sobre la producción de esta enzima mediante variaciones en la composición del medio de cultivo (Fenice et al. 2003, Galhaup et al. 2002a, Hofrichter et al. 1999, Kahraman y Gurdal 2002, Lorenzo et al. 2002, Marques De Souza et al. 2002) o el empleo de sistemas con más de un hongo se están llevando a cabo (Verma y Madamwar 2002). Hongos crecidos en un medio natural lignocelulósico al cual le agregaron HAPs y cooxidantes como 1-HBT y ABTS con el objetivo de acelerar los procesos de degradación del tóxico dieron buenos resultados (Pickard et al. 1999). También se prueban varias especies de algún género que produzca altos títulos de esta enzima, por ej. *Phlebia* spp (Arora y Rampal 2002). Así como en las peroxidasas, con esta enzima se está probando su expresión heteróloga bajo el control de promotores fuertes y constitutivos para lograr los títulos más altos posibles. La lacasa de *Pleurotus eryngii* fue expresada en *Pichia pastoris* obteniéndose altos títulos de actividad (Soden et al. 2002) o la de *Pycnoporus cinnabarinus* en *Aspergillus nidulans* (Record et al. 2002), *Saccharomyces cerevisiae* también se usó como organismo de expresión de lacasas (Bulter et al. 2003). La de *Trametes versicolor* también fue expresada en *Pichia pastoris* y se investigan las condiciones que optimicen la producción de la enzima recombinante, si bien se puede aumentar la producción variando las condiciones de cultivo, la enzima sintetizada es mucho menos estable que la original (Hong et al. 2002) Las aplicaciones de estas enzimas son muchas y varias de ellas están siendo investigadas. Entre estas aplicaciones está el tratamiento en residuos provenientes de la industria de la aceituna y su detoxificación dado que son muy persistentes y de difícil degradación (Casa et al. 2003, Aggelis et al. 2002) estos residuos provienen del proceso de extracción del aceite y son producidos anualmente en grandes cantidades y resultan fitotóxicos. La decoloración y detoxificación de anilinas y otros colorantes los cuales son tóxicos y son vertidos en grandes cantidades al medio (Soares et al. 2001b, Campos et al. 2001, Claus et al. 2002, Keharia y Madamwar 2002, Robinson et al. 2001, Rodríguez et al. 1999, Soares et al. 2001a). También en los procesos de biopulpado para la fabricación de papel (Thiele et al. 2002, Breen y Singleton 1999), los procesos de humificación pueden ser mejorados con el uso de estas actividades así, al igual que la MnP esta enzima tendría aplicaciones para el mejoramiento de suelos (Wang et al. 2002), el tratamiento con lacasa libre o inmovilizada de suelos contaminados con 2,4 diclorofenol logró eliminar hasta el 100%

de este compuesto (Ahn et al. 2002), también puede ser empleada en la industria de la alimentación dado que no es tóxica ni mutagénica (Brinch y Pedersen 2002a, 2002b).

2. Objetivos

- **Seleccionar una cepa con alta capacidad de producción de enzimas lignolíticas.**
- **Establecer las condiciones para la producción de las enzimas lignolíticas. Optimizar dichas condiciones y evaluar el efecto de posibles inductores.**
- **Comprobar la degradación de los componentes de la madera.**
- **Determinar las características cinéticas y de estabilidad de las enzimas.**
- **Determinar la capacidad de degradar y detoxificar compuestos xenobióticos.**

— M A T E R I A L E S Y M É T O D O S —

3.1. Organismos

Todos los hongos utilizados que se listan a continuación pertenecen al cepario de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

Coriolus versicolor f. antarcticus BAFC 266; *Fomes sclerodermeus* BAFC 2752; *Ganoderma applanatum* BAFC 1521; *G. tornatum* BAFC 2505; *Lenzites* sp BAFC 569; *Phanerochaete chrysosporium* BAFC 232 y BAFC 246; *P. velutina* BAFC 770; *Phlebia* sp BAFC 2760; *Phellinus chaquensis* BAFC 176; *P. livescens* BAFC 2297; *Pleurotus lindquistii* BAFC 2102; *Pycnoporus sanguineus* BAFC 98; *Spongipellis fissilis* BAFC 170; *Trametes extenuata* BAFC 270; *T. trogii* BAFC 220 y BAFC 2070.

Luego del primer screening se realizaron experiencias con *Fomes sclerodermeus* BAFC 2752, *Phlebia* sp BAFC 2760 y *Pycnoporus sanguineus* BAFC 98.

Coriolus versicolor f. antarcticus, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus lindquistii*, y *Spongipellis fissilis*, fueron usados como bioindicadores para las experiencias de decoloración y detoxificación del VM.

Todo el resto del trabajo fue realizado con *Fomes sclerodermeus* BAFC 2752

Todos los hongos fueron mantenidos en tubos pico de flauta con agar malta a 4°C.

3.2. Medios de cultivo

Todas las drogas utilizadas fueron de grado analítico y usadas sin previa purificación.

3.2.1. Malta

Extracto de malta, 12 g; glucosa, 10 g; agar 20 g; agua destilada, 1 l.

3.2.2. Glucosa-asparagina (GA)

Glucosa, 10 g; asparagina monohidrato, 4 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 g; KH_2PO_4 , 0,5 g; K_2HPO_4 , 0,6 g; solución de micronutrientes 2 ml; tiamina, 0,1 mg; agua destilada hasta 1 l. Solución de micronutrientes: $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,4 mg; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0,09 mg; H_3BO_3 0,07 mg; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0,02 mg; $FeCl_3$ 1 mg; $ZnCl_2$ 3,5 mg; agua destilada hasta 1 l.

El pH final es 6,4. Las concentraciones basales de cobre y manganeso en este medio fueron de 1,6 μM y 4,5 μM respectivamente.

3.2.3. *Celulosa cristalina (CC)*

En el medio GA la glucosa es reemplazada por 10 g l⁻¹ de celulosa cristalina.

3.2.4. *Kirk (K)*

Glucosa 10 g; tartrato diamónico 0,2 g; acetato de sodio 3,28 g; tiamina 2 mg; H₂KPO₄ 2 g; MgSO₄·7H₂O 0,53 g; CaCl₂ 0,1 g; solución de micronutrientes: 10 ml.

Solución de micronutrientes: CuSO₄ 100 mg; MnSO₄ 500 mg; H₃BO₃ 10 mg; NaMoO₄·2H₂O 10 mg; ZnSO₄·7H₂O 100 mg; CoCl₂ 100 mg; NaCl 1 g; FeSO₄·7H₂O 1 g; AlK(SO₄)₂·12H₂O 10 mg; agua destilada hasta 1 l.

3.2.5. *YPG*

Glucosa, 20 g; peptona, 5 g; extracto de levadura, 20 g, agua destilada hasta 1 l. El pH del medio fue ajustado a 5,5 adicionando HCl

3.2.6. *Aserrín de álamo o cedro*

Aserrín de álamo o de cedro, 10% en agua destilada..

En otros ensayos el agua destilada fue reemplazada por una solución de glucosa al 1% o por medio GA.

3.2.7. *Salvado de trigo o soja*

Salvado de trigo o de soja, 4 g; agua destilada, 16 ml.

El pH del medio luego de autoclavado fue aproximadamente 6.

3.3. **Condiciones de cultivo**

Los cultivos en medio líquido sintético se realizaron en erlenmeyers de 250 ml conteniendo 25 ml de medio. Se inoculó con 2 tacos. Los cultivos en YPG se realizaron en erlenmeyers de 1 litro conteniendo 200 ml de medio con agitación a 180 rpm. Los cultivos con aserrín y el medio sólido salvado de trigo o soja se utilizaron en

erlenmeyers de 100 ml. La inoculación en este caso fue llevada a cabo con 3 cubos de agar.

3.4. Inóculos

Para cultivos estáticos: tacos de agar de 0,25 cm² de superficie, retirados del borde de una colonia de 7 días de crecimiento en medio malta, a 28°C. Para cultivos en agitación: un volumen de 5 ml de un homogenato preparado a partir de cultivos crecidos en agitación durante 4 días en medio YPG, a 28°C.

Incubación: A 28°C en condiciones estáticas o en agitación.

3.5. Procesamiento de los cultivos

Los cultivos en medio líquido fueron cosechados y filtrados con papel Whatman N°1 a presión reducida. El micelio se secó en estufa a 80°C hasta peso constante y se determinó crecimiento por biomasa. Los sobrenadantes fueron utilizados como fuente de enzima.

En los medios CC el micelio fue separado del sobrenadante mediante dos pasos de filtración. El primero fue usando un tamaño de poro de 0,3 mm para separar la CC del micelio luego el segundo paso fue a presión reducida a través de papel Whatman N° 1. El líquido obtenido de la segunda filtración fue utilizado para las determinaciones enzimáticas. El peso seco del micelio fue medido luego de secado a 80°C hasta peso constante.

En el medio salvado de trigo o soja las pérdidas de peso del material (sustrato y hongo) fueron determinados secando cada erlenmeyer a 80°C hasta peso constante. Las muestras secas fueron molidas en mortero y utilizadas para las determinaciones de quitina, celulosa y lignina. El extracto crudo fue obtenido adicionando 100 ml de buffer acetato de sodio 50 mM pH 4,8 al contenido de cada erlenmeyer, luego se agitó con un agitador magnético durante 20 min, seguido de filtración por papel Whatman N°1 y finalmente se centrifugó durante 5 min a 3000 rpm.

3.6. Inductores

A los medios basales GA o YPG se les agregó CuSO₄·5H₂O 0,15 mM o MnSO₄·4H₂O 1 mM como inductores de las actividades lacasa y MnP respectivamente.

Diferentes compuestos aromáticos como los ácidos ferúlico (4-hidroxi-3-metoxicinámico), vainílico (4-hidroxi-3-metoxibenzoico), verátrico (3,4-dimetoxibenzoico), cumárico, siríngico y vainillina, los cuales fueron inductores en otros hongos fueron adicionados al medio a una concentración de 1 mM, para estudiar su efecto en la producción de lacasa y MnP por *F. sclerodermeus* en cultivos estáticos o en agitación.

En los medios sólidos (aserrín, salvados de trigo o soja) fue evaluado el efecto de diferentes aditivos reemplazando el agua destilada por una solución del aditivo a ser estudiado a las siguientes concentraciones finales: 0,15 mM de CuSO₄; 1 mM de MnSO₄; 10 g l⁻¹ de glucosa, micronutrientes (tal cual se describe para el medio GA) y 4 g l⁻¹ de asparagina.

3.7. Determinaciones analíticas

3.7.1. Proteínas extracelulares

Por el método de Bradford (Bradford 1976), usando seroalbúmina bovina (BSA) como patrón en la curva de calibración.

3.7.2. Azúcares reductores

Por el método de Somogyi y Nelson usando glucosa como patrón para la curva de calibración (Somogyi 1945, Nelson 1944).

3.7.3. Quitina

Se midió el contenido de N acetil glucosamina (NAGA) liberado de la quitina luego de la hidrólisis del material con HCl 6 N, a 100 °C, 4 horas (Plassard et al. 1982).

3.8. Actividades enzimáticas

Las actividades ligninolíticas fueron determinadas a 30°C y las celulolíticas a 50°C salvo que se indique otra temperatura.

3.8.1. *Lacasa*

Se usó como sustrato ABTS (2,2'-azino bis (ácido 3-etilbenzotiazoline-6-sulfónico) 0,5 mM en buffer acetato de sodio 0,1 M, pH 3,6. La lectura del producto de reacción se hace a 420 nm ($\epsilon_{420} = 36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Durante el proceso de purificación la actividad lacasa se determinó mediante la oxidación de 2,6-dimetoxifenol (2,6-DMF) a cerulignona ($\epsilon_{469} = 27.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La mezcla de reacción contuvo 0,1 M de tartrato de sodio, pH 5; 10 mM de 2,6-DMF y la cantidad apropiada de enzima en un volumen total de 1 ml.

3.8.2. *Manganeso peroxidasa (MnP)*

Se utilizó como sustrato rojo fenol a una concentración de 0,01% en buffer succinato de sodio 0,1 M, pH 4,5 y H_2O_2 0,2 mM. La reacción se paró agregando 40 μl de NaOH 5 N. La lectura del producto de reacción se hace a 610 nm ($\epsilon_{610} = 22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) dos blancos de reacción fueron restados: sin H_2O_2 y otro sin Mn^{2+} (Glenn y Gold 1985). Durante el proceso de purificación la actividad MnP fue determinada por oxidación del Mn^{2+} al complejo Mn^{3+} -tartrato ($\epsilon_{238} = 6.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La mezcla de reacción contuvo 0,1 M de tartrato de sodio pH 5; 0,1 mM MnSO_4 ; 0,1 mM de H_2O_2 y la cantidad apropiada de enzima en un volumen total de 1 ml.

3.8.3. *Lignina peroxidasa (LiP)*

Fue determinada por oxidación del veratril alcohol a veratril aldehído. La lectura del producto de reacción se mide a 310 nm ($\epsilon_{310} = 9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La mezcla de reacción contuvo 0,1 M de tartrato de sodio (pH 3), 2 mM de veratril alcohol, 0,4 mM H_2O_2 y la cantidad apropiada de enzima en un volumen total de 1 ml.

Las unidades enzimáticas (U) se definen como μmoles de producto formado por min bajo las condiciones del ensayo.

3.8.4. *β -glucosidasa*

La mezcla de reacción contuvo 0,9 ml de *p*-nitrofenil β -D glucopiranosido (0,02% en buffer acetato de sodio 100 mM, pH 4,8) y 0,1 ml de sobrenadante. La reacción se

detuvo agregando 2 ml de buffer Clarks y Lubs (pH 9,8). Se leyó la absorbancia a 445 nm.

3.8.5. β -1,4-endoglucanasa

La mezcla de reacción contuvo 0,4 ml de CMC (0,5% en buffer acetato de sodio 100 mM, pH 4,8) y 0,1 ml de sobrenadante. Se determinaron azúcares reductores por el método de Somogyi-Nelson

Una unidad enzimática fue definida como la cantidad de enzima que cataliza la producción de azúcares reductores equivalentes a 1 μ g de glucosa (endoglucanasa) o 1 μ g de *p*-nitrofenol (β -glucosidasa) por min. Las curvas patrón de glucosa y *p*-nitrofenol se utilizaron como referencia.

3.9. Optimización de las condiciones de cultivo para la producción de lacasa y MnP

El medio basal utilizado fue GA al cual se agregaron cantidades variables de asparagina, CuSO₄ y MnSO₄. El diseño uniforme de Doehlert fue aplicado para estudiar el efecto combinado del Mn²⁺ (adicionado como MnSO₄), Cu²⁺ (adicionado como CuSO₄) y asparagina (N) sobre la producción de lacasa y MnP por *F. sclerodermeus*. Los niveles y los días de muestreo fueron seleccionados de acuerdo a estudios preliminares (Mester y Field 1997, Papinutti y Forchiassin 2000). Los resultados fueron analizados con el programa STATISTICA 5.1 (StatSoft, Inc. 1996). Para estudiar el efecto de tres variables independientes Doehlert propuso un diseño experimental basado en 13 combinaciones de las tres variables en estudio. Los valores regularmente espaciados para cada variable independiente y la combinación entre ellas fueron adoptados y codificados de acuerdo al diseño de Doehlert (1970). Los valores codificados (entre paréntesis) y los valores reales se muestran en la **tabla I**. La actividad específica (sp) fue definida como la razón entre la actividad total volumétrica en el erlenmeyer sobre la biomasa. Las respuestas medidas fueron las actividades MnP sp y lacasa sp (U mg⁻¹ micelio) en los sobrenadantes a los 8 y 12 días de crecimiento. Los valores representan la media de triplicados independientes. El procesamiento de los datos fue realizado directamente sin transformación previa mediante una regresión curvilínea. Los valores

observados fueron ajustados a una ecuación cuadrática completa con 10 coeficientes (Ec I) (Strobel y Sullivan 1999).

$$F = b_0 + b_1 X + b_2 X^2 + b_3 Y + b_4 Y^2 + b_5 Z + b_6 Z^2 + b_7 XY + b_8 XZ + b_9 YZ \quad \text{Ec I}$$

Donde F es la variable respuesta y los b_i son los coeficientes de regresión dados por el modelo. X, Y y Z, son las variables independientes codificadas.

Tabla I Valores codificados (entre paréntesis) y reales adoptados para las variables independientes.

CuSO ₄ (mM)	0 (-1), 0,05 (-0,5), 0,1 (0), 0,15 (0,5), 0,2 (1)
MnSO ₄ (mM)	0,4 (-0,866), 0,5 (-0,577), 0,6 (-0,289), 0,7 (0), 0,8 (0,289), 0,9 (0,577), 1 (0,866)
asparagina monohidrato (g l ⁻¹)	4 (-0.816), 5(0), 6 (0.816)

3.10. Purificación de lacasa y MnP

El crudo enzimático con actividad lacasa fue obtenido de cultivos en YPG líquido suplementados con CuSO₄ crecidos en agitación y cosechados luego de 9 días de inoculados. El crudo enzimático con actividad MnP fue obtenido de cultivos crecidos en condiciones similares salvo que el CuSO₄ fue reemplazado por 1 mM de MnSO₄ y cosechados al 4° día de crecimiento. Los cultivos fueron cosechados, filtrados y concentrados 20 veces por ultrafiltración a 4°C y usando una membrana de 5 kDa de corte.

Los crudos con actividad lacasa y MnP fueron dializados contra fosfato de sodio 10 mM a pH 6 y tartrato de sodio 10 mM a pH 4,5 respectivamente. Los pasos siguientes de purificación se llevaron a cabo a temperatura ambiente en el buffer mencionado anteriormente. Los crudos fueron cromatografiados en una columna de intercambio iónico (Biorad Q-cartridge) a un flujo de 1,5 ml min⁻¹ las proteínas retenidas fueron eluidas con un gradiente lineal desde 0 hasta 250 mM de ClNa en solución en el buffer

correspondiente. Las fracciones con actividad lacasa o MnP fueron juntadas, concentradas, dializadas y muestras de 1 ml fueron cromatografiadas en columna conteniendo gel de filtración (Sephacryl S-200 HR) y equilibrada con el buffer respectivo a un flujo aproximado de $0,5 \text{ ml min}^{-1}$.

Las fracciones con actividad lacasa fueron nuevamente juntadas, concentradas y dializadas contra fosfato de sodio 10 mM a pH 6 y muestras de 1 ml fueron cromatografiadas a una segunda columna de intercambio aniónica (Mono-Q HPLC) pero a alta presión y a un flujo continuo de 1 ml min^{-1} luego se eluyó usando un gradiente lineal de ClNa desde 0 hasta 250 mM en un tiempo de 40 min. Las fracciones provenientes de Sephacryl S-200 con actividad MnP fueron juntadas, concentradas y dializadas contra buffer tartrato de sodio 10 mM a pH 4,5 de este líquido se tomaron muestras de 1 ml y cromatografiadas del mismo modo que la lacasa. Las fracciones con las isoenzimas purificadas de lacasa y MnP fueron juntadas y concentradas usando Filtron Microsep (3 kDa de corte) y guardadas a -20°C .

Las isoenzimas se corrieron en geles SDS-PAGE al 12 %, como marcadores de peso molecular se usó: tripsina (21,5 kDa), anidrasa carbónica (31 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), seroalbúmina bovina (66,2 kDa) y fosforilasa *b* (97,4 kDa) provenientes de Bio-Rad. El contenido de carbohidratos unidos a N de las isoenzimas purificadas fue determinado por masa molecular de las proteínas desglicosiladas usando endo-H (Boehringer Mannheim). El isoelectroenfoque (IEF) se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 5% con un espesor de 1mm y un rango de pH de 2,5 hasta 5 (preparado con anfolitos de LKB-Pharmacia) con 0,5 M de H_3PO_4 y 0,5 M de NaOH en el ánodo y cátodo respectivamente. El gradiente de pH se midió sobre el gel utilizando un electrodo de contacto. Las bandas de proteínas luego de la electroforesis (SDS/PAGE) y IEF fueron reveladas con Coomassie Blue R-250.

El sustrato utilizado para los estudios de especificidad de lacasa fueron 2,6-DMF y ABTS ($\epsilon_{436} = 29.300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). El sustrato empleado para los mismos estudios en la MnP fueron H_2O_2 (en presencia de 0,1 mM de MnSO_4); MnSO_4 (en presencia de 0.1 mM de H_2O_2) y 2,6-DMF (en presencia de 0,1 mM H_2O_2 y 0,1 mM de MnSO_4 (Martínez et al. 1996).

3.11. Estabilidad

Para ambas enzimas se estudió la estabilidad en crudos o con enzima purificada a la temperatura y pH que se muestran en los gráficos. El pH fue regulado usando el buffer citrato fosfato.

La estabilidad de la lacasa fue estudiada a mayor profundidad. El crudo enzimático para este estudio fue obtenido a partir de cultivos en fermentación sólida a base de salvado de trigo tal cual se describe en la sección de medios de cultivo.

Vida media y ajuste a la ecuación biexponencial:

Para los cálculos de vida media t_m , los valores de actividad fueron ajustados a la ecuación biexponencial (Ec2) con tres parámetros como fue propuesto por Aymard y Belarbi (Aymard y Belarbi 2000). El análisis de datos se hizo por regresión lineal directa sin transformación previa.

$$Y = b_1 \exp(-b_2 X) + (1 - b_1) \exp(-b_3 X) \quad (\text{Ec 2})$$

donde Y es la variable respuesta (actividad remanente) expresada como la razón entre la actividad medida al tiempo X y la actividad inicial, b_i son los coeficientes de regresión (parámetros) dados por el modelo, X (tiempo) es la variable independiente. La actividad lacasa fue medida a intervalos de tiempo crecientes hasta alcanzar el 10% o menos de la actividad inicial. La actividad remanente fue expresada como A_t/A_0 , donde A_t es la actividad a tiempo t y A_0 es la actividad inicial.

Efecto de sustancias y patrón de inactivación:

Los ensayos de estabilidad se llevaron a cabo en buffer citrato fosfato 50 mM (pH 2-11). Los tubos de reacción contuvieron 2 U de actividad lacasa en un volumen total de 2 ml y fueron incubados a 30, 40 y 50°C la actividad fue medida periódicamente. Los tubos fueron sellados para impedir concentraciones por evaporación de agua. Fue estudiado el efecto de varios aditivos a 40°C y pH 4,5. Las concentraciones empleadas fueron: veratril alcohol (VA) (0,2; 1; 5 y 10%), glicerol (0,2; 1; 5 y 10%), trealosa (0,05; 0,1; 0,5 y 1%), 1-hidroxibenzotriazol (1-HBT) (0,1; 0,5; 1,25 y 2,5 mM), CuSO_4 (0,05; 0,1; 0,5 y 1,25 mM), manitol (0,05; 0,1; 0,5 y 1%) y glutaraldeído (0,05; 0,25 y

1%). Todas las drogas fueron utilizadas sin purificación previa. Los valores representan el valor medio de triplicados independientes con un error menor al 5%.

El patrón de inactivación de bandas fue determinado mediante una electroforesis en gel PAGE al 12% de la proteína nativa. Luego de diferentes periodos de tratamiento térmico (30, 40 y 50°C) y pH (4, 6, 8 y 10) los extractos enzimáticos fueron concentrados 20 veces. Las calles del gel fueron cargadas con una actividad de 10 mU. Las bandas se revelaron incubando los geles 10 min a 37°C en presencia de 0,5 mM de ABTS como sustrato en buffer acetato de sodio a pH 3,6.

Estudios cinéticos:

Los estudios cinéticos de las isoenzimas se realizaron en espectrofotómetro Shimadzu con cubetas de cuarzo de 1 ml y 1 cm de espesor. Las reacciones fueron iniciadas por adición de la enzima en el caso de las lacasas y H₂O₂ para MnPs. Las tasas iniciales fueron obtenidas de la porción lineal de la curva. El estudio fue llevado a cabo en buffer tatrato de sodio 0,1 M pH 5 para lacasas y MnPs

3.12. Detoxificación y decoloración del verde de malaquita

Se midió el crecimiento de colonias crecidas en cajas conteniendo 20 ml de medio agar malta adicionado con VM o VMD a concentraciones variables.

El crecimiento radial se midió en dos direcciones perpendiculares desde el borde del inóculo hasta el borde de la colonia. Los valores de las figuras son la media de experimentos llevados a cabo por triplicado.

3.12.1. Fuente de enzima

El crudo enzimático fue obtenido de cultivos en GA al que se agregó CuSO₄ 0,15 mM como inductor de actividad lacasa. A los 12 días de crecimiento los cultivos se cosecharon y filtraron, los sobrenadantes fueron utilizados como fuente de enzima para las distintas experiencias. En este medio no fueron detectadas actividades LiP ni MnP. La actividad lacasa de las cajas fue determinada incubando un trozo de 50 mg de medio agarizado retirado de la zona de decoloración. En este caso la actividad fue expresada como U (g de medio agarizado)⁻¹.

3.12.2. Ensayos de decoloración y detoxificación

Las reacciones fueron llevadas a cabo a 30°C. La decoloración del VM fue seguida a 618 nm (Cha et al. 2001) y los valores fueron expresados como la razón de absorbancias A_t/A_0 donde A_t es la absorbancia a tiempo t y A_0 es la absorbancia inicial. La mezcla de reacción para las experiencias de decoloración consistieron en: VM 32 μM y 1-HBT 10; 5; 2,5; 1,25; y 0,16 mM. La reacción fue llevada a cabo en buffer acetato de sodio 50 mM pH 3,5; con el agregado de 1 (con 1-HBT) o 10 (sin 1-HBT) U de lacasa en un volumen total de 3 ml. El cooxidante 1-HBT a la concentración de 5 mM no resultó tóxico para ninguno de los hongos evaluados. En los ensayos de detoxificación, se incubó VM 0,4 mM en buffer acetato de sodio pH 3,5; 5 mM de 1-HBT y 1 U de actividad lacasa en un volumen total de 2 ml. Las absorbancias fueron medidas diluyendo la muestra en el mismo buffer.

Para determinar la toxicidad del verde de malaquita decolorado (VMD), luego de obtener una decoloración de al menos 95% el contenido de los tubos de reacción fue mezclado con 18 ml de medio extracto de malta agarizado. Tubos de reacción conteniendo la misma mezcla pero sin VM fueron los controles. Se inocularon cajas conteniendo medio extracto de malta agarizado y adicionadas con VMD $>36 \mu\text{M}$. El crecimiento radial fue medido diariamente.

3.13. Degradación de madera de álamo

3.13.1. Cultivos y pérdida de peso seco de la madera

Bloques de madera de $4 \times 1 \times 0.5$ cm de álamo esterilizados a 120°C se colocaron sobre medio agar (2%) extracto de malta (1,2%) en tubos pico de flauta inoculados 10 días antes con *F. sclerodermeus*. Se incubaron a 28°C durante 6 meses. Cada 2 meses 10 de los bloques fueron recogidos, después de raspar y descartar el micelio superficial se secaron a 80°C hasta peso constante. Para calcular pérdidas de peso se utilizaron como controles bloques sin inocular, también en la cuantificación de celulosa y lignina y para comparar morfologías de la madera atacada y no atacada.

3.13.2. Cuantificación de celulosa y lignina

Para la cuantificación de celulosa y lignina, se molieron los tacos de madera inoculados y sin inocular, se extrajeron los compuestos hidrosolubles mediante lavados con agua destilada a 90°C, luego se solubilizó la celulosa y hemicelulosa por medio de una hidrólisis con ácido sulfúrico al 72%, permaneciendo la lignina como un resto insoluble (Tappi methods 1983). El contenido de celulosa y hemicelulosa se calculó por diferencia en el peso inicial de la fracción que se hidroliza con el ácido y la fracción insoluble que corresponde a la lignina. Las cantidades de celulosa y hemicelulosa solubilizados en ácido y lignina de los bloques sin inocular se utilizaron como referencia del 100% del contenido para cada polímero. En base a este dato y al de pérdida de peso seco causado por el hongo, se calculó la cantidad remanente de cada polímero.

3.13..3. Cortes anatómicos

Se realizaron cortes a mano alzada de los tacos de madera, que se tiñieron con la técnica de safranina-fast green, para ser observados en microscopio óptico.

— R E S U L T A D O S Y D I S C U S I Ó N —

4.1. Relevamiento de cepas de hongos causantes de pudrición blanca para la producción de ligninasas

Todas las cepas estudiadas en este trabajo están descritas como causantes de pudrición blanca, es decir que son capaces de oxidar y degradar lignina. Esta capacidad fue evaluada usando medios sólidos que viran su color al ser oxidados, así se pudo observar que existe gran heterogeneidad en las respuestas. En primera instancia se descartaron las cepas *P. chaquensis* BAFC 176 y *P. livescens* BAFC 2297 porque su velocidad de crecimiento fue excesivamente lenta.

En la **tabla 1** se muestran los resultados de la evaluación cualitativa de actividades fenol oxidasas en los medios conteniendo G (0,5%), Gu (0,2%) y T (0,5%) (Schomburg y Stephan 1994) y peroxidasas, en los medios poly-R (Gold et al. 1988) y Azure B (Archibald 1992), los valores de degradación asignados a cada hongo son los que corresponden a la escala adoptada por Davidson et al. (1938) agregándose otro valor dado que hubo casos donde a dos o más hongos les correspondía el máximo valor pero podían diferenciarse entre sí. *P. chrysosporium* está descrito como un organismo cuya actividad lacasa no es fácilmente inducible, lo cual se corresponde con su actividad nula en los medios conteniendo G, T y Gu, sin embargo muestra muy buena decoloración de poly-R y Azure B. Si bien se utilizaron tres medios para reacción de fenol oxidasas, se observa que no presentan igual valor de degradación aunque se trate del mismo hongo, hecho que se podría deber a la especificidad o que la degradación sea llevada a cabo por distintas enzimas fenol oxidasas, p.e. *G. tomentosum* presenta halo sólo en el medio con tánico, o *P. velutina* y *Lenzites* sp. los cuales no presentan halo o éste es insignificante en guayacol pero no en los otros dos medios. *Lenzites* sp fue incapaz de oxidar el poly-R, sin embargo posee el valor máximo de degradación en Azure B, por el contrario *T. trogii* BAFC 2070 dio un valor de 6+ en poly-R pero no pudo degradar el Azure B así se le agregue o no Mn^{2+} al medio. Es decir que la capacidad de degradación de un determinado sustrato no sólo depende de su potencial de oxidación sino que es probable que exista también cierta estereoespecificidad, otro ejemplo es *P. chrysosporium* el cual posee actividad LiP y MnP, y por lo tanto puede oxidar sustratos no fenólicos como el poly-R y el Azure B pero no puede hacerlo con los ácidos tánico, gálico y guayacol, que

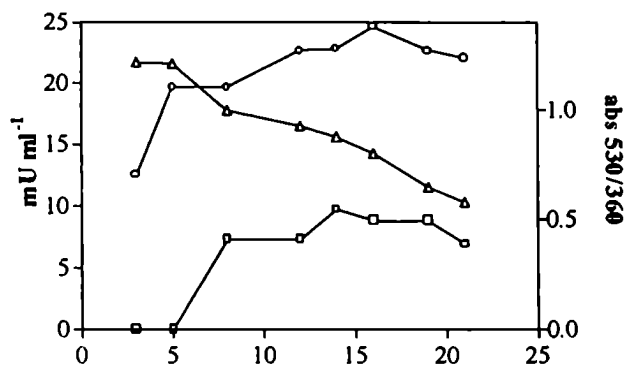
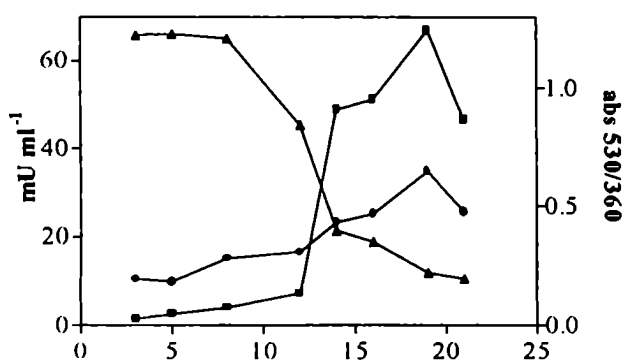
si son fenólicos y por lo tanto más fáciles de oxidar. Es interesante notar que cuando se prueba la degradación de Azure B con el agregado de Mn^{2+} , hay casos en los que se obtienen valores menores que cuando se lo hace sin Mn^{2+} , lo cual podría deberse a la inhibición de las peroxidases manganeso independiente, por el agregado de manganeso (de Jong et al. 1992). De esta experiencia fueron elegidos *P. sanguineus*, *Phlebia* sp., y *F. sclerodermeus* en base a sus altos valores de degradación para todos los medios.

	T	G	Gu	P	A _{s/Mn}	A _{c/Mn}
<i>Py. sanguineus</i> 98	6+	5+	0	6+	5+	6+
<i>P. chrysosporium</i> 246	1+	0	0	6+	6+	6+
<i>P. chrysosporium</i> 232	0	0	0	6+	6+	6+
<i>P. vetulina</i> 770	3+	4+	0	0	3+	0
<i>T. extenuata</i> 270	5+	5+	4+	2+	5+	2+
<i>T. trogii</i> 212	3+	5+	4+	6+	6+	5+
<i>T. trogii</i> 2070	5+	4+	5+	6+	2+	0
<i>G. applanatum</i> 1521	5+	5+	6+	0	0	0
<i>G. tornatum</i> 2505	0	5+	0	0	1+	1+
<i>Lenzites</i> sp 669	5+	4+	1+	0	6+	6+
<i>Phlebia</i> . sp 2760	6+	6+	4+	6+	2+	2+
<i>F. sclerodermeus</i> 2752	5+	5+	6+	6+	5+	5+

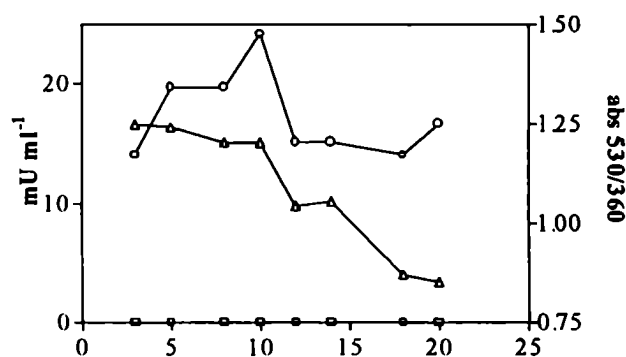
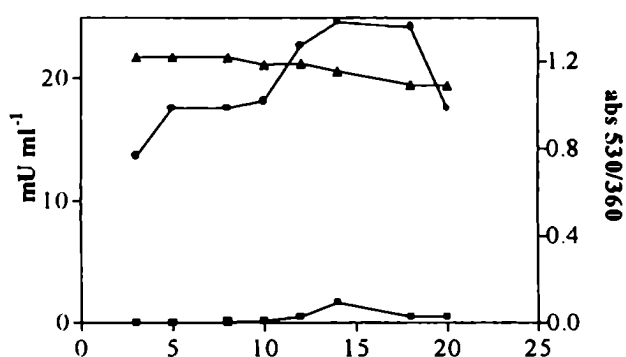
Tabla 1 Cepas de hongos causantes de pudrición blanca crecidos en medio malta conteniendo ácidos tánico (T) gálico (G) guayacol (Gu) poly-R (P) o Azure B con o sin agregado de $MnSO_4$ 1 mM (A_{c/Mn}; A_{s/Mn}, respectivamente). Los valores de los halos de degradación fueron asignados según la escala propuesta por Davidson (1938). El número a la derecha de cada hongo corresponde a su identificación en el cepario BAFC.

En la **figura 1** se observan los valores de degradación de poly-R mediante la relación Abs 530/360 nm en los medios líquidos GA y K para *P. sanguineus*, *F. sclerodermeus* y *Phlebia* sp siendo el valor inicial igual a 1,2 aproximadamente. *P. sanguineus* fue el que decoloró menos dando valores de 1,097 y 0,852 en los medios GA y K respectivamente, luego *Phlebia* sp mostró mayor decoloración en medio GA (0,482) que en medio K (0,811), el que más degradó fue *F. sclerodermeus*, con valores de 0,578 en medio K y 0,196 en medio GA.

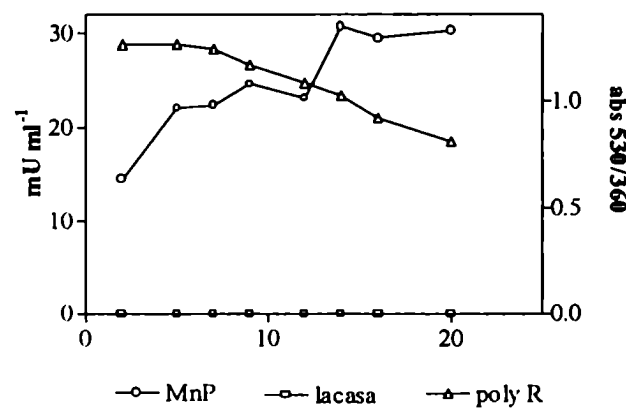
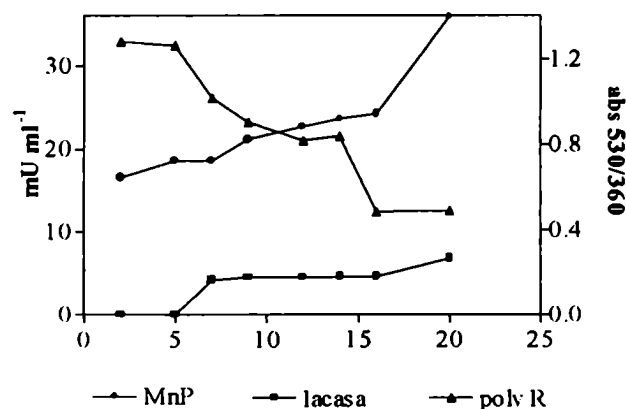
F. sclerodermeus



P. sanguineus



Phlebia sp



—○— MnP —■— lacasa —▲— poly R

—○— MnP —□— lacasa —△— poly R

Figura 1: Actividades lacasa y MnP junto con la decoloración de poly-R para *F. sclerodermeus*, *P. sanguineus* y *Phlebia* sp en los medios GA (símbolos oscuros) y K (símbolos claros) en condiciones estáticas a 28°C. Los puntos representan el valor medio de triplicados, el error fue menor del 5%.

Luego se midieron las actividades MnP, LiP y lacasa en los medios GA y K para *F. sclerodermeus*, *Phlebia* sp y *P. sanguineus* (Figura 1). Las tres cepas muestran su potencial capacidad de producir actividades MnP y lacasa dependiendo de la composición del medio de cultivo líquido, sin embargo no fue detectada actividad LiP en ninguno de los casos. *P. sanguineus* registra los valores más bajos, en medio GA el pico de actividad MnP se dio al día 16 (0,13 U ml⁻¹), la actividad lacasa fue muy baja con un pico al día 14 (8,3 mU ml⁻¹), en el medio K las actividades fueron menores, el pico de MnP se adelanta con respecto al medio GA, dándose al día 10 con un valor de 0,12 U ml⁻¹ también adelantado con respecto al día de mayor peso seco el cual se da al día 20. Para *Phlebia* sp se detectó la máxima actividad MnP al día 20 para ambos medios con valores de 0,18 U ml⁻¹ y 0,15 U ml⁻¹ en los medios GA y K respectivamente no se observa una caída en la actividad al menos hasta el día 20 de medición, la actividad lacasa presenta una curva parecida con un valor máximo de actividad también al día 20, tampoco se registró caída en los días de muestreo, en medio K no se detectó lacasa. Para *F. sclerodermeus*, en medio GA se halló el pico de actividad MnP (0,17 U ml⁻¹) al día 19, el cual coincide con el día de mayor peso seco, a partir del cual decae. La actividad lacasa presenta un pico también al día 19 cuyo valor es de 0,34 U ml⁻¹ y es 40 y 10 veces más alto que el máximo obtenido para *P. sanguineus* y *Phlebia* sp respectivamente en el mismo medio.

En *P. sanguineus*, la decoloración de poly-R no se corresponde con las actividades MnP dado que es más alta en medio GA que en medio K, pero la decoloración de poly-R es mayor en medio GA.

No resulta un hecho raro la carencia de actividad LiP en todas la cepas estudiadas, la medición de LiP en hongos de pudrición blanca entre los cuales estaba *P. chrysosporium* ME-446 (ATCC 34541) al cual se lo hizo crecer en rastrojos de trigo fue nula. Existen otros ejemplos donde el medio de cultivo era algún sustrato natural lignocelulósico y tampoco se halló actividad LiP (Hatakka 1994, Srebotnik et al. 1994). También hay trabajos de relevamientos de varias cepas de hongos de pudrición blanca cultivados en medios sintéticos los cuales tampoco produjeron actividad LiP (Peláez et al. 1995).

Por los resultados obtenidos en esta primera parte del trabajo, resulta evidente que las condiciones óptimas para la producción de la actividad LiP y MnP en *P. chrysosporium* no son las mismas que para otros hongos de pudrición blanca, dado que en medio GA donde la concentración de nitrógeno es alta, hubo por lo general mayores actividades

que en medio K donde el nitrógeno es muy limitante, resultados similares obtuvieron Levin y Forchiassin (2001) en cultivos del hongo ligninolítico *Trametes trogii*. Por otro lado las enzimas que *P. chrysosporium* posee para la degradación de lignina, no tienen que ser obligadamente las mismas que estén presentes en otros hongos también capaces de degradar este polímero (Camarero et al. 1999, Vares et al. 1992).

4.2. Condiciones de cultivo

4.2.1. Optimización de la producción de MnP y lacasa en medio sintético, efecto combinado de nitrógeno, manganeso y cobre.

Una vez elegido *F. sclerodermeus* por su mayor producción enzimática (con alta y baja concentración de nitrógeno) y por su capacidad de decolorar los compuestos aromáticos evaluados, se procedió a experimentar con sus condiciones de cultivo para optimizar la producción de lacasa y MnP. Dado que en trabajos previos con otros hongos se observó que las concentraciones de $MnSO_4$, $CuSO_4$ y N son variables en amplios rangos y debido a que se desconoce cuáles podrían ser las respuestas de *F. sclerodermeus* en cuanto a su crecimiento y producción de enzimas tras el agregado de estos nutrientes, entonces se aplicó un diseño experimental del tipo factorial incompleto con el fin de abarcar un amplio rango de concentraciones. Entre los diseños encontrados en la bibliografía se eligió el diseño factorial uniforme publicado por Doehlert (1970). La elección se debió a que este diseño requiere solamente 13 puntos o condiciones y éstos son de distribución uniforme. Además, las concentraciones de nutrientes se varían al mismo tiempo, luego a partir de estos datos se aproxima a una ecuación de segundo orden. Así es posible no sólo averiguar las condiciones óptimas de cultivo sino que también revela interacciones entre las variables estudiadas. Solamente fueron analizados los datos obtenidos al día 12 de crecimiento dado que aquellos obtenidos al día 8 fueron mucho más bajos para ambas enzimas (**Tabla 2**).

Se vio que las concentraciones de Cu^{2+} , Mn^{2+} y N influenciaron el crecimiento y la producción de actividades MnP y lacasa (específicas y volumétricas). Resultados parecidos fueron encontrados en otros hongos de pudrición blanca, el crecimiento de *Pleurotus sajor-caju* y *Lentinula edodes* fue inhibido en un 100 y 58%, respectivamente cuando se utilizó una concentración de $MnSO_4$ de 0,55 mM (Buswell et al. 1995).

Tabla 2 Actividades volumétricas y específicas (sp) y peso seco para *F. sclerodermeus* a los 12 d de crecimiento en medio GA en condiciones estáticas con diferentes combinaciones en las concentraciones de N, Cu²⁺ y Mn²⁺, estas combinaciones (run) fueron elegidas de acuerdo a Doehlert (1976) y poseen la cualidad de ser uniformemente espaciadas, se evitan así los muestreos o combinaciones solapadas. Los valores representan la media de triplicados.

run	N	Mn ²⁺	Cu ²⁺	MnP	lacasa	Peso seco	sp MnP	sp lacasa
	g l ⁻¹	mM	mM	mU ml ⁻¹	mU ml ⁻¹	mg	mU mg ⁻¹	mU mg ⁻¹
1	5	0,7	0,1	85,20	4640	72,7	29,30	1595,75
2	5	0,7	0,2	81,11	6150	72,65	27,91	2116,63
3	5	1	0,15	113,19	5436	62,4	45,35	2177,80
4	6	0,8	0,15	214,87	9489	79,7	67,40	2976,68
5	5	0,7	0	212,60	2508	84,5	62,89	742,25
6	5	0,4	0,05	19,14	3295	82,5	5,80	998,67
7	5	1	0,05	147,70	6748	67,2	54,94	2510,25
8	5	0,4	0,15	20,88	5986	67,8	7,69	2207,28
9	4	0,6	0,05	99,98	3867	88,95	28,10	1086,88
10	6	0,8	0,05	137,71	2581	90,05	38,23	716,45
11	4	0,6	0,15	24,68	5343	67,8	9,10	1970,28
12	6	0,5	0,1	77,79	5752	73,95	26,29	1323,30
13	4	0,9	0,1	98,96	7402	71,3	34,69	2595,38

Para *F. sclerodermeus* los efectos negativos en el crecimiento fueron despreciables. El incremento desde 0,4 hasta 0,8 mM de Mn²⁺ (condiciones 8 y 10) produjeron un mayor peso seco (25%), sin embargo el incremento desde 0,4 hasta 1 mM en el mismo nutriente pero en una combinación diferente (condiciones 6 y 7) causaron un efecto inhibitorio (18%). Estos resultados muestran que el efecto de aumento o inhibición en el crecimiento no se debe al efecto único del Mn²⁺, sino que podrían existir interacciones entre los nutrientes que resultan en las diferencias señaladas en el crecimiento. Cuando se analizan los efectos sobre las actividades lacasa y MnP las respuestas negativas o

positivas, fueron mucho más evidentes que aquellas encontradas en el crecimiento. La actividad MnP volumétrica se incrementó con las mayores concentraciones de Mn^{2+} . Las condiciones 6 y 7, mostraron que un incremento de 0,4 hasta 1 mM en la concentración de Mn^{2+} corresponde a un incremento de 8 veces en la actividad MnP, siendo estos valores las mayores y menores actividades, respectivamente. Las mayores actividades lacasa fueron encontradas en las condiciones con las más altas concentraciones de Cu^{2+}

4.2.1.1. Ecuación polinómica de segundo orden

Debido al efecto fisiológico que estos nutrientes pudieran tener sobre el crecimiento, y para anular interferencias de posibles actividades dependientes de la biomasa, fue necesario calcular las actividades por mg de micelio (actividad sp) como la variable respuesta. Este tipo de efecto fue mostrado en *Telephora terrestris*, donde la producción de lacasa fue dependiente de la biomasa (Kanunfre y Zancan 1998).

Con el objetivo de evaluar el efecto de cada nutriente y sus interacciones, los datos de actividad sp fueron ajustados a una ecuación completa cuadrática tal cual se muestra en materiales y métodos, sección 8.1. (Ec I), la cual incluye las variables y la combinación entre ellas, las cuales podrían explicar los efectos observados. Esta es la forma general adoptada para el modelo polinomial de tres factores (Strobel y Sullivan 1999).

Las 13 respuestas para cada actividad fueron ajustadas a la ecuación, los coeficientes para cada término obtenidos luego del ajuste se observan en la **tabla 3**. Los coeficientes con valor alto así sea positivo o negativo indican un gran impacto en la actividad, mientras que un estimador cercano a cero indica que ese factor tiene un impacto insignificante (Strobel y Sullivan 1999).

Los altos valores de R^2 junto con los efectos significativos proveen una fuerte evidencia de que el modelo explica el comportamiento de la producción enzimática. Los valores de R^2 para MnP y lacasa fueron 0,91 y 0,86 respectivamente. Esto significa que el 91 y 86% de la variabilidad en la actividad sp observada en la tabla puede ser explicada por la ecuación cuadrática polinómica de predicción. Esto fue tomado como evidencia para la aplicabilidad del modelo en los rangos de variables incluidos en este trabajo. El presente modelo y análisis de datos permite no sólo encontrar el medio óptimo de cultivo para la producción enzimática sino que muestra los efectos combinados entre los tres factores estudiados. Estas enzimas podrían estar relacionadas en su regulación dado

que la MnP y la lacasa participan en el proceso de degradación de lignina. Se vio que algunos compuestos xenobióticos regulan genes *mnp* y de lacasa en *Ceriporiopsis subvermispora* (Tello et al. 2000) y *P. sajor-caju* (Lo et al. 2001, Soden y Dobson 2001) respectivamente. Sin embargo aún falta determinar si existe una regulación coordinada en ambas enzimas dentro del mismo organismo.

Tabla 3 Coeficientes de regresión dados por el modelo junto con los valores de R² para cada ecuación.

Coef.	MnP	lacasa
C	26,44	1830,25
Mn ²⁺	24,23	495,49
(Mn ²⁺) ²	-4,36	383,11
Cu ²⁺	-8,32	846,06
(Cu ²⁺) ²	19,21	-420,37
N	12,12	19,35
N ²	7,32	-252,25
N Mn ²⁺	-1,10	417,19
N Cu ²⁺	41,60	1158,75
Mn ²⁺ Cu ²⁺	-6,63	-889,75
R ²	0,91	0,86

$$\text{sp MnP} = 26,44 + 24,23\text{Mn}^{2+} - 4,36(\text{Mn}^{2+})^2 - 8,32\text{Cu}^{2+} + 19,21(\text{Cu}^{2+})^2 + 12,12\text{N} + 7,32\text{N}^2 - 1,10\text{NMn}^{2+} + 41,60\text{NCu}^{2+} - 6,63\text{Mn}^{2+}\text{Cu}^{2+}$$

$$\text{sp lacasa} = 1830,25 + 495,49\text{Mn}^{2+} + 383,11(\text{Mn}^{2+})^2 + 846,06\text{Cu}^{2+} - 420,37(\text{Cu}^{2+})^2 + 19,35\text{N} - 252,25\text{N}^2 + 417,19\text{NMn}^{2+} + 1158,75\text{NCu}^{2+} - 889,75\text{Mn}^{2+}\text{Cu}^{2+}$$

4.2.1.2. *Manganeso peroxidasa*

Los coeficientes para la ecuación de regresión se muestran en la **tabla 3**. El alto valor para Mn^{2+} obtenido en el término lineal (24,23) muestra el significativo efecto que tiene en el aumento de esta actividad. Este coeficiente lineal positivo indica que la actividad MnP sp aumenta con incrementos en la concentración de Mn^{2+} en el medio de cultivo. Mientras que el coeficiente cuadrático negativo $-4,36$ indica que la actividad MnP sp posee un valor máximo a partir del cual decae. Es decir que concentraciones crecientes de Mn^{2+} en el rango de 0,4 hasta 1 mM incrementa fuertemente esta actividad mostrando una zona débil de inhibición cuando la concentración es de 1 mM. *P. sordida* es un conocido hongo de pudrición blanca el cual sólo produce MnP en presencia de Mn^{2+} con un máximo de actividad a 0,2 mM, concentraciones superiores fueron inhibitorias (Ruttimann-Johnson et al. 1994). Una excepción es la encontrada en *Pleurotus eryngii* donde la actividad MnP es completamente reprimida por la adición de manganeso al medio de cultivo (Martínez et al. 1996a).

En todos los erlenmeyers de cultivo se observó un amarronamiento del micelio. Probablemente, como fue observado en *P. chrysosporium* (Pérez y Jeffries 1992), este oscurecimiento puede ser debido a la precipitación de MnO_2 que se forma a partir de Mn^{3+} no quelado el cual a su vez es producto de la actividad MnP (Doehler 1970). El N tuvo un efecto lineal positivo, lo cual indica el incremento de la actividad sp conforme aumenta la concentración de N. Luego se observó un efecto lineal negativo o inhibitorio causado por Cu^{2+} . El término positivo cuadrático indica la existencia de un valor mínimo para esta actividad. Las interacciones más importantes fueron entre Cu^{2+} y N y su valor positivo indica sinergismo. Interacciones antagonistas o negativas fueron observadas entre Cu^{2+} y Mn^{2+} .

Los valores fueron ajustados a una ecuación cuadrática completa de segundo grado y se la graficó en función del Mn^{2+} y el Cu^{2+} ; el factor N fue fijado a concentraciones de 4, 5 y 6 g l⁻¹. A 4 g l⁻¹ la MnP alcanzó su máximo valor, este gráfico de contorno se observa en la **figura 2a**. A las otras dos concentraciones la actividad fue menor y los gráficos no se muestran. La zona sombreada se corresponde con la mayor actividad MnP. En este gráfico se hace evidente que son necesarias las mayores concentraciones de Mn^{2+} para obtener altas producciones de actividad, siendo el Cu^{2+} un inhibidor en estas condiciones. La mayor producción enzimática fue de 82,5 mU mg⁻¹.

4.2.1.3. *Lacasa*

Los coeficientes para la ecuación de regresión se muestran en la **tabla 3**. El alto valor para Cu^{2+} obtenido en el término lineal (846,06) muestra el significativo efecto que tiene en el aumento de esta actividad. Esto mostró que la actividad *sp* aumenta conforme aumenta la concentración de Cu^{2+} . El término cuadrático negativo indicó la existencia de un mínimo de actividad lacasa en función de este nutriente. Luego de este punto el Cu^{2+} mostró un efecto inhibitorio. Los compuestos empleados para la inducción de lacasa en otros hongos como por ej. xilidina y otros compuestos aromáticos no incrementaron la actividad como lo hizo el Cu^{2+} en este hongo y bajo estas condiciones (Muñoz et al. 1997, Pointing et al. 2000). El coeficiente lineal para N está cercano a cero; el término cuadrático para este nutriente es negativo, por lo tanto hubo un máximo de actividad. Estos resultados mostraron que el N tuvo un efecto insignificante sobre la producción de actividad lacasa. Un resultado similar se mostró que ocurre en *P. sajor-caju* (Fu et al. 1997). El Mn^{2+} tuvo un efecto positivo lineal, la actividad *sp* se incrementó con incrementos de este nutriente. Resultados similares fueron descritos en otros hongos (Scheel et al. 2000, Tekere et al. 2001). Se sabe que el Mn^{2+} está presente en todas las maderas, por lo tanto el efecto positivo sobre ambas enzimas (lacasa y MnP) podría ser una estrategia para la degradación de lignina *in vivo* sugiriendo una conexión entre la regulación de ambas enzimas. Hubo interacciones importantes entre los tres nutrientes evaluados, el más alto valor corresponde al par N y Cu^{2+} (1.158,75); esto indicó que estos nutrientes actuaron de forma sinérgica aumentando la actividad.

El gráfico de contorno para la actividad lacasa se muestra en la **figura 2b**. El criterio utilizado para graficar la actividad lacasa *sp* fue el mismo que se utilizó anteriormente para la MnP. Las más altas actividades fueron obtenidas a la mayor concentración de Cu^{2+} utilizado.

4.2.1.4. *Validación del modelo*

Se evaluaron los medios de cultivo optimizados para la producción de MnP y lacasa. Para la producción de lacasa, el medio fue suplementado con 0,2 mM de Cu^{2+} , 6 g l⁻¹ de asparagina y 0,4 mM de Mn^{2+} . Un máximo valor de actividad de 14 U ml⁻¹ fue obtenido a los 16 d de crecimiento (**Figura 3b**).

Figura 2 Gráficos de contorno según las ecuaciones halladas en la tabla 3 para las actividades MnP (a) y lacasa (b) en los medios optimizados para su producción. Las concentraciones de Cu^{2+} y Mn^{2+} están codificados de acuerdo al trabajo de Doehler (1976), en la tabla I de la sección de materiales y métodos se observan estos valores. Las concentraciones de asparagina para a y b fueron de 4 y 6 g l⁻¹ respectivamente. Las zonas o áreas sombreadas corresponden a las condiciones de cultivo que producen las máximas actividades específicas, las cuales están expresadas como U mg⁻¹ de micelio seco.

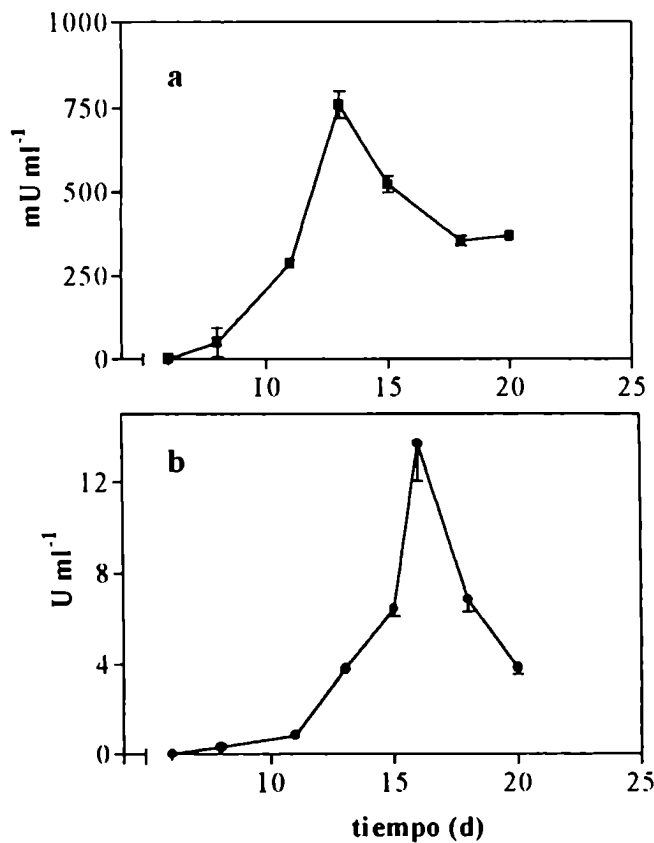
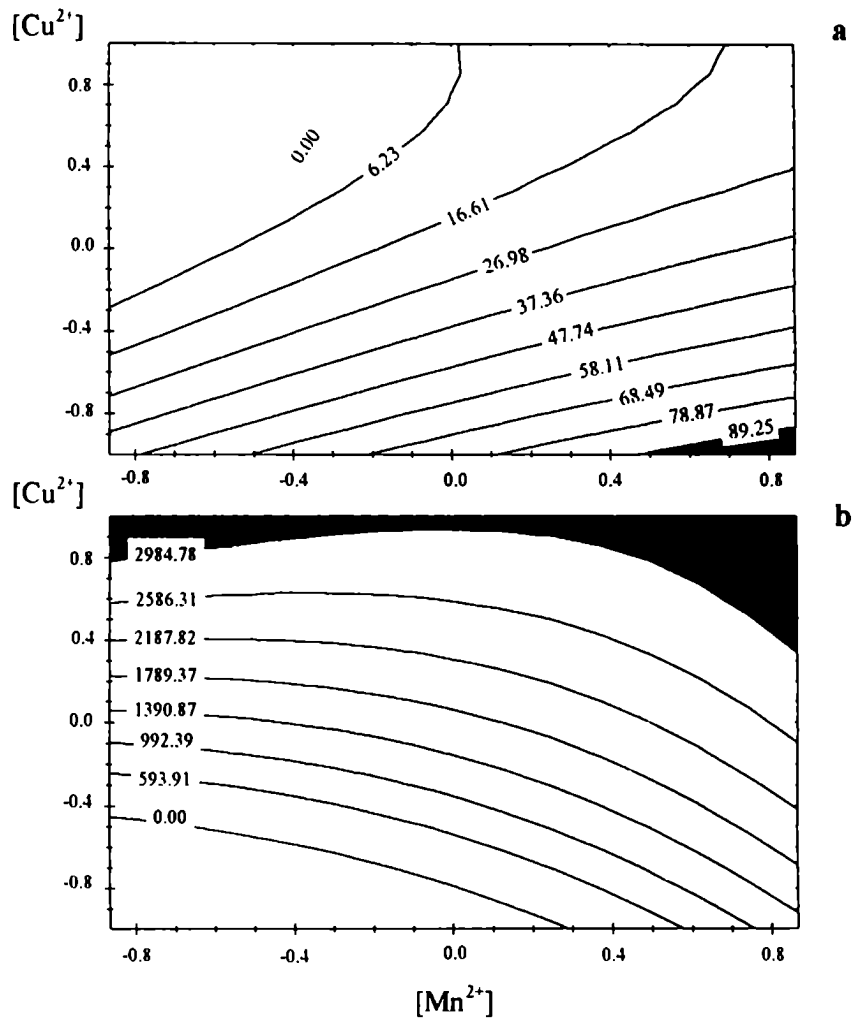


Figura 3 Actividades MnP (a) y lacasa (b) producidas por *F. sclerodermeus* en los medios optimizados en condiciones estáticas (zona sombreada de figura 2). Las actividades son volumétricas y los valores representan la media de tres réplicas y las barras el error típico el cual fue menor del 5%.

A los 12 d de crecimiento la actividad sp de lacasa fue $4.050 \pm 375 \text{ mU mg}^{-1}$, la ecuación dada por el modelo predijo un valor de $3.383,26 \text{ mU mg}^{-1}$. Para la obtención de MnP, el medio fue preparado con 1 mM de Mn^{2+} , 4 g l^{-1} de asparagina y $1,6 \text{ }\mu\text{M}$ Cu^{2+} . La máxima actividad volumétrica ($0,75 \text{ U ml}^{-1}$), como se ve en la **figura 3a**, fue obtenida a los 13 d de crecimiento, este valor fue similar a aquel obtenido en *B. adusta* ($0,9$ a $1,25 \text{ U ml}^{-1}$) crecido en condiciones óptimas (Mester y Field 1997). La actividad sp de MnP a los 12 d de crecimiento fue $90 \pm 5 \text{ mU mg}^{-1}$, mientras que el valor estimado fue $99,63 \text{ mU mg}^{-1}$. Por lo tanto el modelo fue capaz de describir el efecto de los nutrientes estudiados sobre ambas actividades dentro del rango de concentraciones fijadas para las tres variables independientes, los cuales fueron los límites de aplicabilidad del modelo. Así es posible predecir la respuesta para cualquier combinación de las variables independientes. *F. sclerodermeus* produjo altos títulos de actividades MnP y lacasa en los medios optimizados utilizando el diseño factorial de Doehlert.

4.2.2. Producción de lacasa y MnP utilizando salvado de trigo o soja como sustrato

4.2.2.1. Pérdida de peso, proteínas solubles, azúcares reductores, pH y contenido de quitina

Cuando el objetivo no es el estudio de la regulación de las actividades por determinados nutrientes sino la producción de enzimas para su posterior uso, entonces es necesario no sólo obtener altos títulos de actividad sino que el medio utilizado sea barato. En primer lugar se optó por medios de cultivo basados en salvado de trigo o soja como sustrato. Las curvas de pérdida de peso del sustrato, proteínas solubles, azúcares reductores, pH y contenido de quitina en el medio con salvado de trigo se observan en la **figura 4a**. El crecimiento fue estimado mediante la medición del contenido de quitina como NAGA liberada del sustrato. La máxima tasa de crecimiento fue observada entre los días 7 y 18. Dado que en el micelio de *F. sclerodermeus* se midieron $35 \text{ }\mu\text{g NAGA (mg de micelio)}^{-1}$, la biomasa puede ser estimada como un máximo de $136 \text{ mg de micelio (g de sustrato seco)}^{-1}$ al día 18 de crecimiento. Los datos de azúcares reductores revelaron que las pérdidas de peso debidas a estos carbohidratos fueron insignificantes, el valor inicial fue de $45 \text{ }\mu\text{g (g de salvado seco)}^{-1}$. Un 38% de pérdida en el total del peso en el medio fue

medido luego de 28 días de crecimiento, las mayores tasas de esta pérdida ocurrieron también entre los días 7-18 a partir de este día se hizo más lento. Con la hidrólisis ácida diferencial de las muestras de salvado de trigo secas fue posible cuantificar las pérdidas de celulosa y lignina debidas a la degradación (**Figura 4b**). Al graficar los datos de celulosa y lignina remanentes, se hizo evidente que la celulosa fue el polímero que sufrió la degradación más significativa con las más altas tasas de pérdida entre los días 7 y 14. Luego del período de 28 d de incubación, las pérdidas de celulosa y lignina fueron del 38 y 15%, respectivamente.

4.2.2.2. Actividades lacasa y MnP

F. sclerodermeus no produjo actividad LiP bajo ninguna de las condiciones, es conocido que la producción de LiP es un hecho muy raro entre los hongos de pudrición blanca, varios relevamientos en búsqueda de esta actividad lo muestran claramente (Peláez et al. 1995). Las curvas de actividad MnP y lacasa en salvado de trigo se presentan en la **figura 4c** y aquellas obtenidas en salvado de soja se exhiben en la **figura 5**.

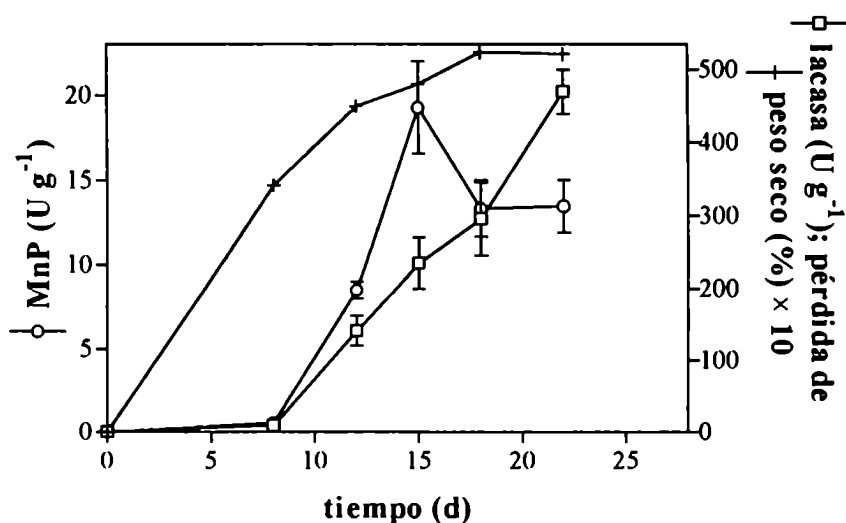


Figura 5 Pérdida de peso seco del sustrato, actividades lacasa y MnP en función del tiempo para *F. sclerodermeus* crecido en salvado de soja y agua como único sustrato. Los valores representan la media de triplicados independientes y las barras el error.

La mayor actividad MnP fue medida a los ~14 d de crecimiento en ambos medios con valores de 0,21 y 0,48 U ml⁻¹ en los medios de salvado de trigo y soja respectivamente, correspondiéndose a 6,3 y 16,56 U g⁻¹ en términos de producción, a partir de este día

decrece. La máxima producción de actividad lacasa fue a los 28 d de incubación. La figura 4c expone un incremento lineal de esta actividad hasta el último día de muestreo.

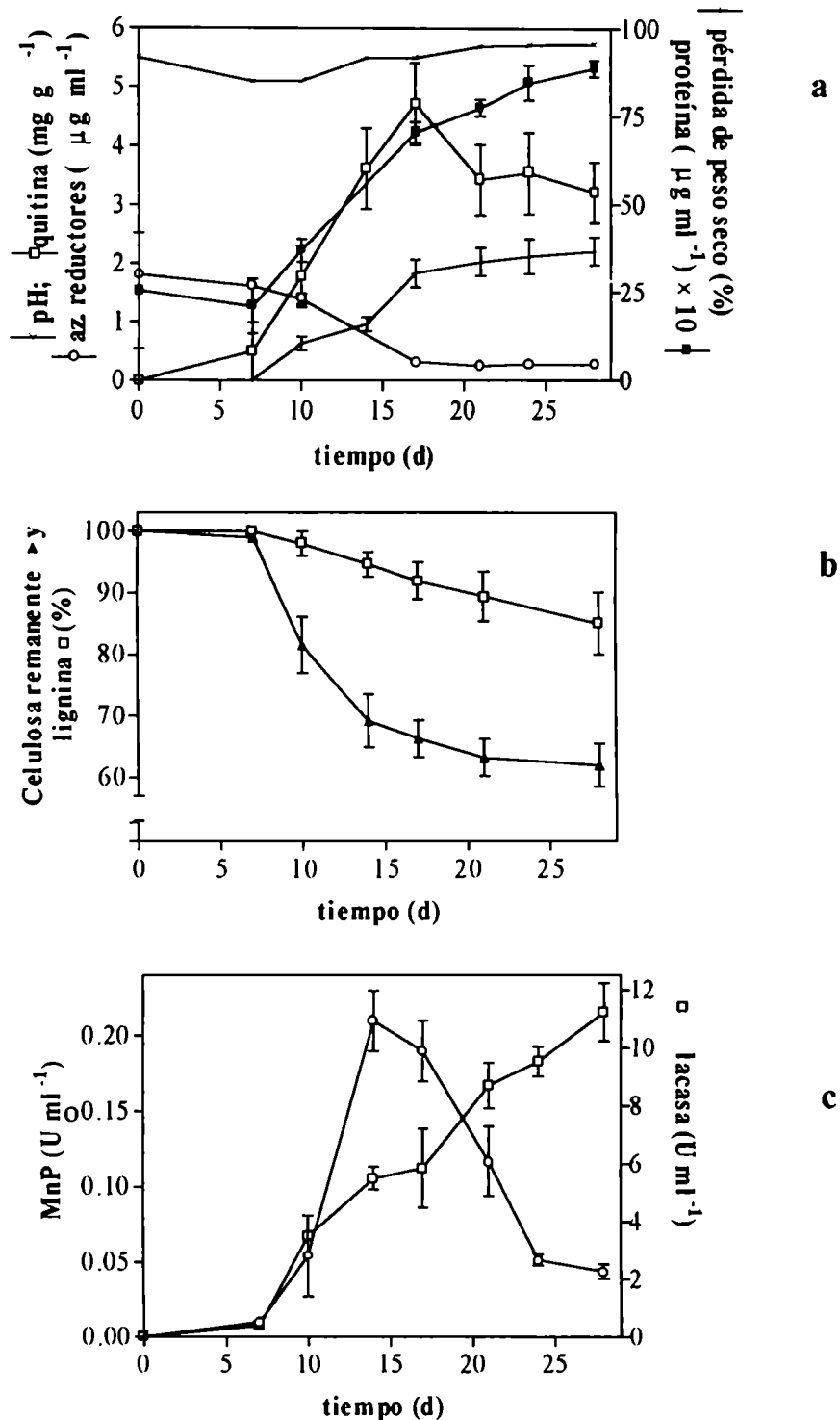


Figura 4 (a) Contenido de quitina, pH, azúcares reductores, pérdida de peso seco y contenido en proteínas solubles en función del tiempo para *F. sclerodermeus* crecido en salvado de trigo y agua como único sustrato. (b) Porcentajes remanentes en el sustrato de lignina y celulosa calculados por el método de hidrólisis diferencial con H₂SO₄ 72%. (c) Producción de MnP y lacasa. Los valores representan la media de triplicados independientes y las barras representan el error.

En términos de productividad el valor alcanzado a los 28 d fue de 270 U g⁻¹ y a los 24 d en salvado de soja fue de 490 U g⁻¹. Dado que las actividades LiP y MnP en *P. chrysosporium* aparecen durante la fase estacionaria, las enzimas ligninolíticas en este hongo están asociadas con el metabolismo secundario. En las fermentaciones sólidas de salvado evaluadas en este trabajo las actividades lacasa y MnP se incrementaron durante la trofofase hasta el día 18 paralelamente con el crecimiento. Este hecho reveló que estas enzimas no están asociadas con el metabolismo secundario. La producción de ambas actividades obtenidas con este medio de cultivo fueron muy superiores a las obtenidas en otros sistemas fúngicos. Cepas de *L. edodes* cultivadas bajo condiciones similares alcanzaron un valor de actividad de 3 mU g⁻¹ (Mata y Savoie 1998) mientras que la producción de esta enzima por *F. sclerodermeus* fue 2.100 veces superior. Respecto a la actividad lacasa, el hongo de pudrición blanca *Pleurotus sajor-caju* cultivado en fermentación sólida produjo no solamente un título más bajo que el obtenido en *F. sclerodermeus* sino que el medio fue suplementado con diferentes compuestos aromáticos para obtener una mayor productividad (Kumaran et al. 1997).

La **tabla 4** muestra el efecto de diferentes aditivos sobre la pérdida de peso del sustrato y las actividades lacasa y MnP luego de 21 d de incubación. *F. sclerodermeus*, bajo las condiciones ensayadas no produjo mayores actividades de ninguna de las dos enzimas como respuesta a los compuestos adicionados. El agregado de diferentes inductores de actividad como cobre o compuestos aromáticos, es rutinariamente utilizado para incrementar las actividades lacasa o MnP. Hasta el momento los más altos títulos de actividad lacasa fueron obtenidos tras el agregado de cobre al medio de cultivo, el efecto de incrementar mediante cobre fue también observado en la producción de lacasa en otros hongos como por ej. *Trametes pubescens* (Galhaup et al. 2002a), *P. chrysosporium* (Dittmer et al. 1997), *Pleurotus ostreatus* (Palmieri et al. 2000), *T. multicolor* (Hess et al. 2002), *T. trogii* (Levin et al. 2002), *T. versicolor* (Collins y Dobson 1997) *Marasmius quercophilus* (Klonowska et al. 2001) y diferentes isoenzimas secretadas por *P. ostreatus* (Giardina et al. 1999). El manganeso agregado como una sal inorgánica por lo general se agrega como MnSO₄, es ampliamente usado como inductor de la actividad MnP (Tekere et al. 2001, Bonnarme y Jeffries 1990, Ruttimann-Johnson et al. 1994), pero puede afectar el crecimiento de ciertos hongos (Buswell et al. 1995). Fue demostrado que el Mn²⁺ regula aumentando la expresión del gen *mnp* (Brown et al. 1990). Sin embargo fue descubierta la represión por Mn²⁺ de una

peroxidasa que oxida Mn^{2+} en especies de *Pleurotus*, sin embargo es destacable que esta peroxidasa no es una MnP típica sino que posee características compartidas entre la LiP y la MnP y puede oxidar a través del manganeso o directamente sustratos no fenólicos tal cual lo hace la LiP (Martínez et al. 1996a).

Tratamiento	lacasa (U ml ⁻¹)	MnP (U ml ⁻¹)	Pérd. de peso seco (%)
Control	9,94	0,118	32,3
Extracto de malta 6 g l ⁻¹	7,02	0,031	28,9
Extracto de malta 20 g l ⁻¹	5,83	0,106	30,5
Glucosa 15 g l ⁻¹	4,44	0,104	25,8
SO ₄ NH ₂ 4 g l ⁻¹	5,41	0,112	29,0
CuSO ₄ 0,15 mM	8,48	0,125	33,5
MnSO ₄ 1 mM	7,61	0,109	33,6

Tabla 4 Efecto de algunos aditivos sobre las actividades lacasa, MnP y pérdida de peso seco del salvado de trigo por *F. sclerodermeus* cosechado a los 21 d de crecimiento. Los valores representan el valor medio de triplicados con errores menores al 10%.

Teniendo en cuenta que estas enzimas pueden tener una respuesta dependiente de la biomasa, éstas pueden ser incrementadas tras el agregado de glucosa, nitrógeno u otro nutriente al medio que favorezca el crecimiento (Kanunfre y Zancan 1998). El medio sólido natural que se utilizó probablemente contiene inductores de lacasa o MnP debido al hecho de que ninguna de tales actividades pudo ser incrementada por la adición de varios compuestos. Así el medio sin agregados puede ser utilizado para escalar el proceso de producción de ambas enzimas dado que no sólo se obtienen altas actividades sino también porque el sustrato utilizado es de muy bajo costo y muy abundante. Otro aspecto de interés es que *F. sclerodermeus* produce lacasa y MnP al mismo tiempo y se vio que estas dos enzimas pueden actuar de forma sinérgica en la degradación de lignina (Galliano et al. 1991) y este sinergismo se podría manifestar también en procesos de biorremediación.

Resumiendo, en esta parte del trabajo se estudió el crecimiento de *F. sclerodermeus* y la producción barata de lacasa y MnP utilizando un medio basado en salvado de trigo o soja y agua. Los máximos valores de actividad alcanzados por ambas enzimas fueron comparables a aquellos obtenidos por otros hongos cultivados en medios químicamente definidos. Si bien son muy escasos los trabajos sobre producción de estas enzimas en fermentaciones sólidas están comenzando a ser vistos como una alternativa viable para una producción barata y eficiente (Fenice et al. 2003), así como la aplicación de estas enzimas a residuos para disminuir su toxicidad (Casa et al. 2003).

4.2.3. Efecto de inductores sobre la producción de lacasa y MnP en medios YPG y GA

En esta instancia del trabajo se probó en medio GA el efecto de diferentes compuestos aromáticos sobre la actividad ligninolítica de *F. sclerodermeus* (Figura 6). El efecto positivo de los compuestos aromáticos ya ha sido observado en otros hongos de pudrición blanca, un hongo muy afín con el que se usó en este trabajo *F. annosus*, mostró inducción de su actividad lacasa luego del agregado de compuestos fenólicos y esta inducción se la relacionó con una síntesis *de novo* de la enzima y se propuso un sitio específico de pegado de estos compuestos sobre la superficie de la hifa y esa sería la señal inductora de la síntesis (Haars y Hüttermann 1983). En este medio la adición de ácido cumárico y vainillina retrasaron el crecimiento fúngico hasta 10 días, mientras que los ácidos ferúlico y siríngico no presentaron ese efecto, pero comenzaron a ser tóxicos a partir de concentraciones de 4 mM (este dato no se muestra). Respecto a la inducción de lacasa y MnP, la vainillina y AF exhibieron la máxima eficiencia entre los compuestos aromáticos ensayados. El AF es una sustancia muy común en las paredes de las células de plantas (Rosazza et al. 1995) y está asociada con mecanismos que la planta posee para su resistencia a hongos patógenos (Assabgui et al. 1993). Así la inducción de lacasa y MnP por esta sustancia puede ser un mecanismo para detoxificarla y a su vez para atacar la lignina. En trabajos previos se mostró que *F. fomentarius* degradó AF llevándolo luego de este proceso a otro compuesto aromático, vainillina. (Ishikawa et al. 1963). Es interesante destacar que el AF y la vainillina fueron los dos aromáticos que más fuertemente aumentaron ambas actividades, lo cual sugiere que la vainillina producida a partir de AF podría ser el verdadero inductor en lugar del

AF. Los valores de actividad lacasa alcanzados en presencia de vainillina son comparables a aquellos obtenidos con el agregado de CuSO_4 al medio.

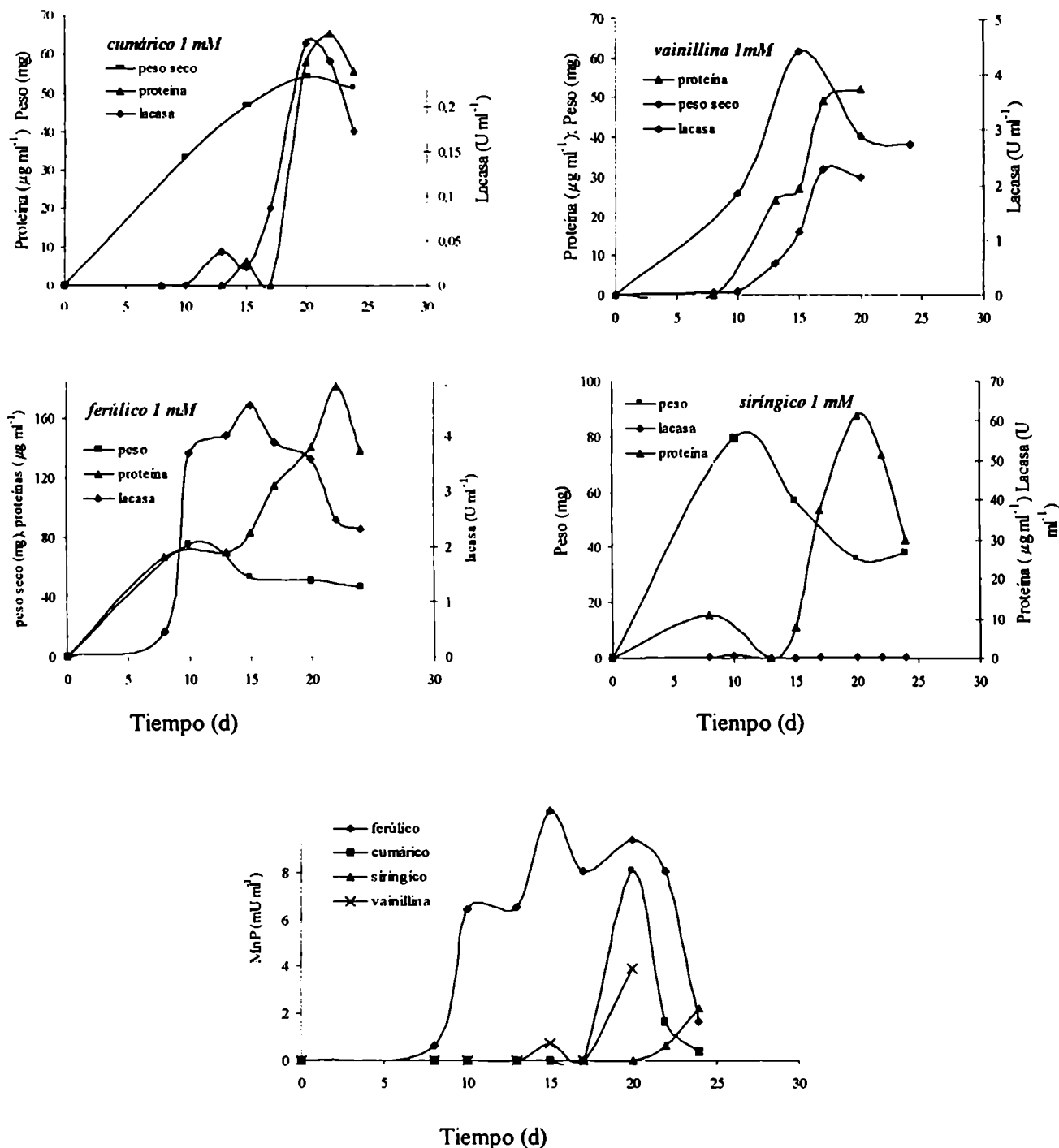


Figura 6 Efecto de diferentes compuestos aromáticos a una concentración de 1 mM sobre la actividades lacasa y MnP en *F. sclerodermeus* creciendo estáticamente en medio GA. Los valores representan la media de tres experimentos con una desviación típica menor al 5%.

Luego se utilizó medio YPG en agitación bajo diferentes condiciones para la inducción de actividades ligninolíticas.

Para estimular la actividad lacasa se agregaron diferentes compuestos aromáticos y Cu^{2+} . Los ácidos verátrico, vainillínico y ferúlico los cuales fueron ensayados como inductores, no aumentaron los niveles de actividad lacasa respecto al medio basal (**Figura 7**), en la **figura 8** se muestra el progreso del pH del medio de cultivo. En la **figura 11** se observa la curva de actividad lacasa en función del tiempo bajo la inducción por Cu^{2+} , Mn^{2+} y la combinación de ambos iones. Se detectaron alrededor de 70 mU ml^{-1} de actividad lacasa en el medio basal. Los valores más altos fueron obtenidos en el medio adicionado con CuSO_4 (alrededor de 20 U ml^{-1}). A diferencia de lo que se observó en el medio sintético, la presencia de Mn^{2+} en el medio de cultivo afectó de forma negativa los niveles de actividad lacasa, alcanzando a los 9 ó 10 días de incubación un valor de 20 mU ml^{-1} en el medio basal suplementado con Mn^{2+} y 3 U ml^{-1} en presencia de Cu^{2+} y Mn^{2+} .

Ninguno de los compuestos aromáticos ni el Cu^{2+} lograron inducir actividad MnP siendo nula en todos los medios. En la **figura 9** se observa la influencia del Mn^{2+} y del Cu^{2+} sobre la actividad MnP secretada por *F. sclerodermeus*. El agregado de Mn^{2+} fue obligado para obtener niveles significativos de actividad MnP la cual alcanzó un valor de 250 mU ml^{-1} a los 4 días de crecimiento. El efecto de ambos cationes, Cu^{2+} y Mn^{2+} agregados al mismo tiempo, retrasaron 5 días el máximo de MnP, la máxima actividad se alcanzó en cultivos con 9 días de crecimiento sin embargo los títulos obtenidos fueron similares a aquellos obtenidos con el único agregado de Mn^{2+} . En la **figura 10** se observa el progreso del pH del medio de cultivo. El aumento del pH del medio al día 18, fue alrededor de 2 unidades mayor en aquellos erlenmeyers adicionados solamente con CuSO_4 o en combinación con MnSO_4 . Es interesante destacar que los picos de actividad se dan antes que se produzca el aumento de pH.

No se detectó actividad LiP en ninguna de las diferentes condiciones ensayadas.

Los azúcares reductores decrecieron rápidamente en el medio basal sin aditivos y también en los medios suplementados con Cu^{2+} o Mn^{2+} , indicando el agotamiento de la fuente carbonada a los 4 días de incubación. En el medio con ambos cationes Cu^{2+} y Mn^{2+} el agotamiento de glucosa se retrasó hasta el día 7 de cultivo. Probablemente se deba a que la alta concentración de ambas sales resulte algo tóxicas y por lo tanto retrasen la fase lag de crecimiento. Las proteínas de sobrenadante en el medio con Cu^{2+} o Mn^{2+} incrementaron en coincidencia con la actividad lacasa o MnP. Probablemente

esto se deba a que las enzimas estudiadas sean las mayoritarias en el sobrenadante de cultivo (este dato no se muestra).

Así, para obtener una producción alta y rápida de actividades ligninolíticas, el hongo puede ser cultivado en YPG con agitación. Este medio debe ser suplementado con $MnSO_4$ o $CuSO_4$ con el fin de incrementar los niveles de ambas actividades.

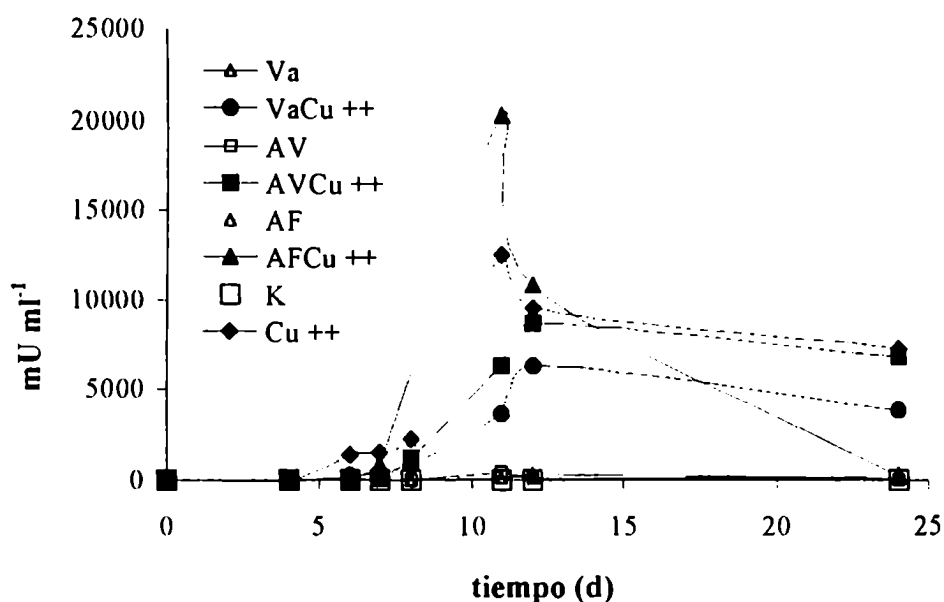


Figura 7 Efecto de algunos aditivos sobre la producción de actividad lacasa por *F. sclerodermeus* creciendo en un medio semidefinido (YPG) en agitación. Los puntos representan los valores medios de triplicados con un error menor al 5%. Referencias: Va: vainillina; AF: ácido ferúlico; AV: ácido verátrico; K: medio YPG sin agregados. Las concentraciones fueron de 1 mM para los aromáticos y 0,15 mM para el $CuSO_4$. Los valores representan la media de 3 mediciones. El error típico fue menor al 5%.

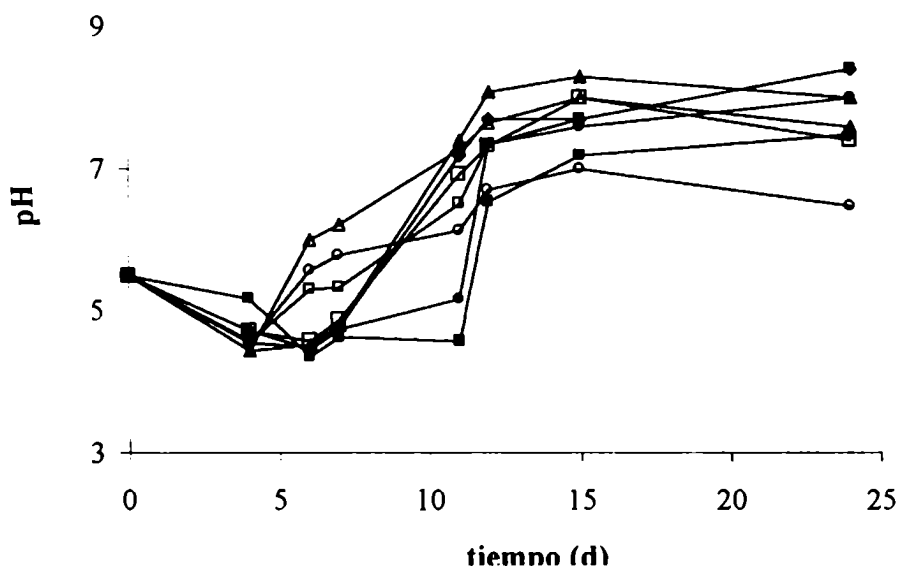


Figura 8 Variación del pH en función del tiempo para el medio semidefinido (YPG) en agitación y con algunos agregados. Las abreviaturas son las mismas que fueron utilizadas en la figura anterior. Los valores representan la media de dos mediciones.

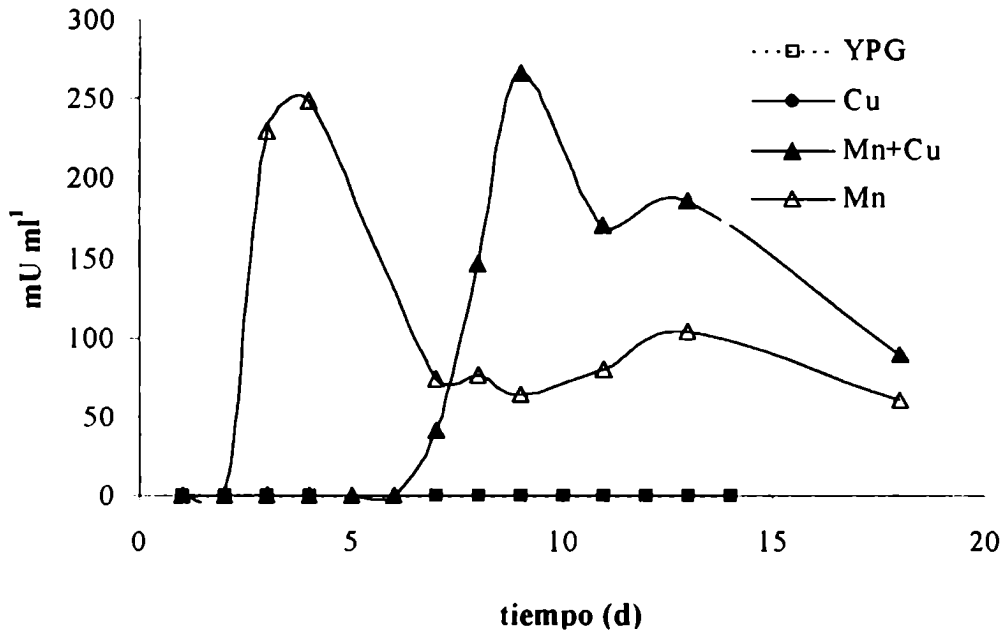


Figura 9 Actividad MnP producida por *F. sclerodermeus* en medio semidefinido (YPG) en agitación y con el agregado de 0,15 mM de CuSO₄, 1 mM de MnSO₄ o la combinación de ambos. Los valores representan el valor medio de triplicados con un error típico menor al 5%.

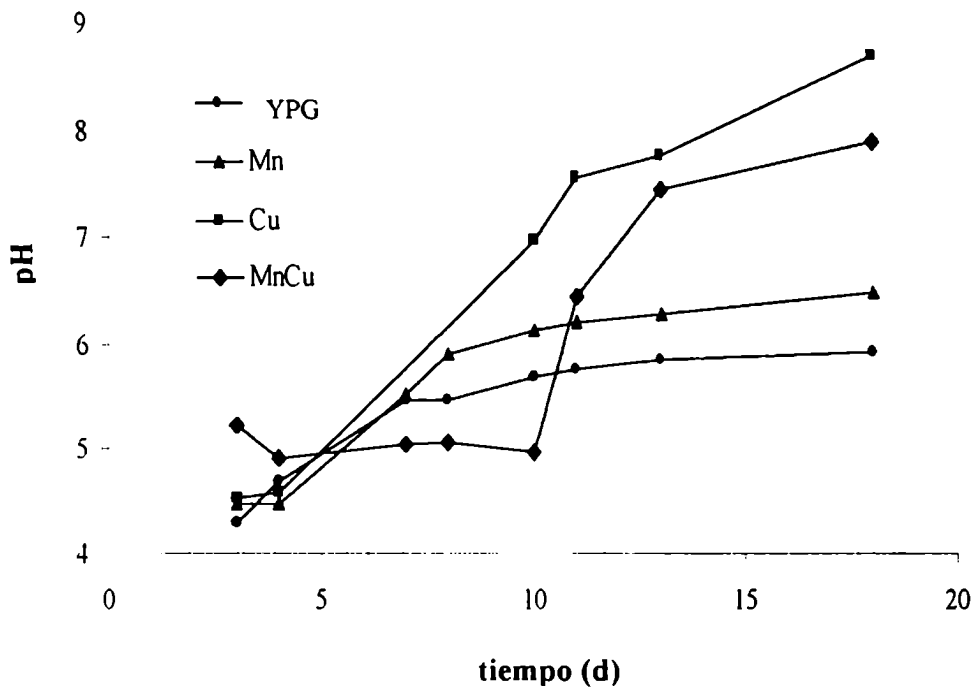


Figura 10 Variación del pH en función del tiempo para el medio semidefinido (YPG) en agitación y con el agregado de CuSO₄, MnSO₄ o la combinación de ambos al medio de cultivo. Las abreviaturas son las mismas que fueron utilizadas en la figura anterior. Los valores representan la media de dos mediciones.

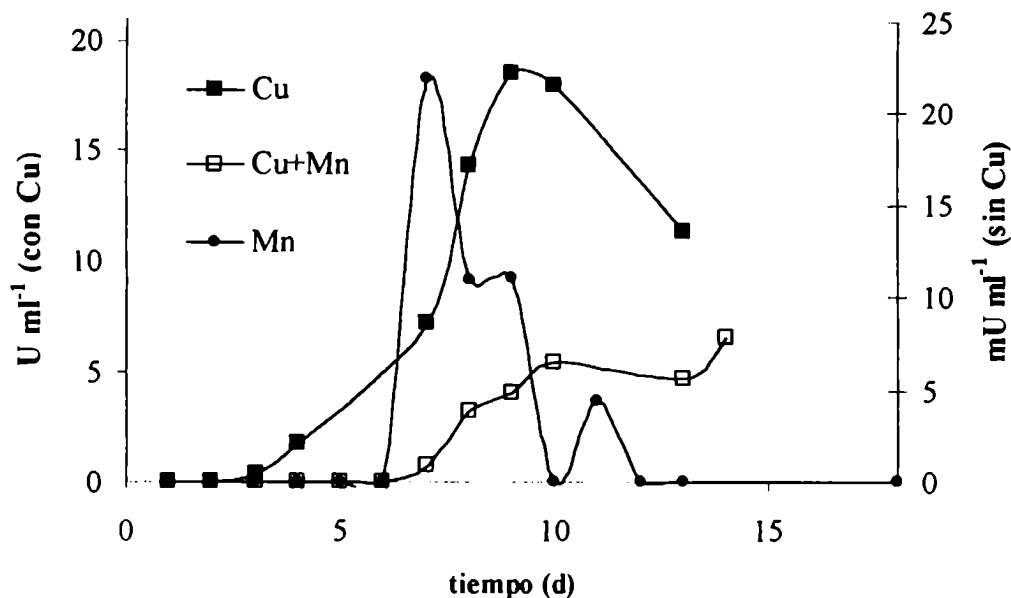


Figura 11 Efecto del Cu^{2+} , Mn^{2+} o la combinación de ambos ($\text{Cu}^{2+} + \text{Mn}^{2+}$) sobre la producción de actividad lacasa por *F. sclerodermeus* creciendo en un medio semidefinido (YPG) en agitación. Los puntos representan la media de triplicados independientes con un error menor al 5%. Las concentraciones fueron de 1 mM para el MnSO_4 y 0,15 mM para el CuSO_4 .

4.2.4. Actividades ligninolíticas y celulolíticas en medios con celulosa cristalina como única fuente de carbono

No existen trabajos previos en los cuales se evalúe el efecto sobre enzimas celulolíticas y ligninolíticas del agregado en combinación de conocidos inductores de estas actividades. Fueron probados MnSO_4 , CuSO_4 como inductores de ligninasas y celulosa cristalina para celulasas. Estos compuestos fueron estudiados en combinación con la CC como inductor de la actividad celulolítica. Se hizo crecer a *F. sclerodermeus* en un medio conteniendo celulosa cristalina como única fuente de carbono, esto es más aproximado a lo que ocurre en la naturaleza si lo comparamos con los medios donde se usó glucosa como fuente de carbono y energía. El crecimiento de *F. sclerodermeus* fue evaluado como el peso seco de micelio en función del tiempo, los valores resultantes de estas mediciones se observan en la **tabla 5**. *F. sclerodermeus* pudo utilizar CC como única fuente de carbono, es decir que posee las enzimas capaces de degradar este polímero e incorporar sus productos como fuente de energía y carbono. Dado que la obtención de C utilizable a partir de la CC es más difícil, la velocidad de crecimiento es más lenta que la observada en medios con glucosa como fuente de C y energía.

Tratamiento	Biomasa (mg)	Máx. crecimiento (d)
CC	68	20
CCCu	60	21
CCMn	72	20

Tabla 5 Crecimiento de *F. sclerodermeus* en condiciones estáticas con celulosa cristalina (CC) como única fuente de carbono y con el agregado de CuSO_4 o MnSO_4 . Los valores representan la media de experimentos realizados por triplicado con un error típico menor al 5%.

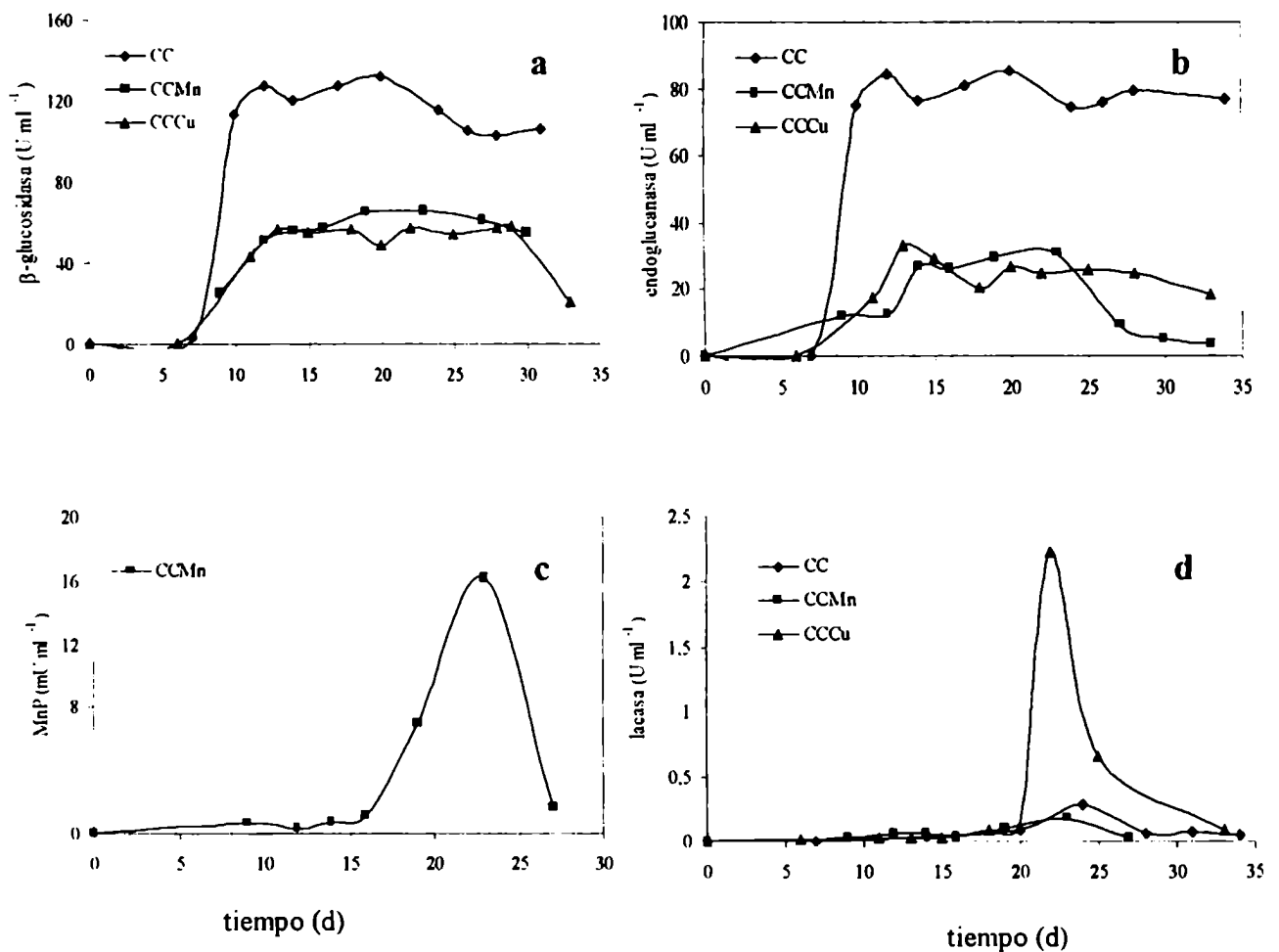


Figura 12 Efecto del CuSO_4 y el MnSO_4 sobre las actividades endoglucanasa (a); β -glucosidasa (b); MnP (c) y lacasa (d) producidas por *F. sclerodermeus* creciendo estáticamente en medio líquido (CC) con celulosa cristalina como única fuente de carbono. Los valores representan la media de experimentos triplicados con una desviación típica menor al 5%.

El agregado de los distintos compuestos ensayados como inductores no afectaron ni la velocidad de crecimiento ni la máxima biomasa alcanzada. El máximo valor de biomasa se alcanzó aproximadamente al día 20 de cultivo y a partir de éste comienza una fase de autólisis que se observa por la caída en la medición de peso seco. En las figuras 12 a, b, c y d se observan las curvas de actividades enzimáticas obtenidas en los diferentes cultivos. Las enzimas medidas del complejo celulasa fueron la endoglucanasa y β -glucosidasa, mientras que las ligninolíticas fueron la lacasa, MnP y LiP. La actividad endoglucanasa en medio CC comenzó a ser detectada repentinamente con valores altos al día 10 de crecimiento y la actividad alcanzada entre este día y el último de muestreo se mantuvo en valores cercanos a las 80 U ml⁻¹, este valor de actividad es similar al registrado por *Trametes trogii*, un hongo de pudrición blanca, creciendo en iguales condiciones (Levin y Forchiassin 1997). La actividad obtenida en los otros medios fue bastante menor con valores alrededor de las 30 U ml⁻¹, esto significa cerca de unas 3 veces menos que en el medio con CC, además a partir del día 25 comienza una leve caída de la actividad contrastando con lo que ocurre en el medio con CC. La actividad β -glucosidasa mostró un patrón similar al obtenido para la endoglucanasa. En el medio con CC la actividad se mantiene constante entre el día 10 y 25 de crecimiento, con valores alrededor de 130 U ml⁻¹. Respecto a las actividades ligninolíticas, la actividad LiP no se detectó en ninguno de los medios ensayados, ya se dijo anteriormente que es un hecho conocido que la presencia de actividad LiP en hongos de pudrición blanca es bastante rara y lo demuestran varios trabajos (Peláez et al. 1995). La actividad MnP sólo fue encontrada en el medio conteniendo MnSO₄ como inductor, el obligado requerimiento de una alta concentración de manganeso para la producción de MnP por *I. sclerodermeus* ya había sido observada en otros medios (Papinutti et al. 2001), en maderas atacadas por hongos de pudrición blanca suelen aparecer unas manchas color marrón las cuales corresponden a depósitos de MnO₂ (Pérez y Jeffries 1992) por lo tanto el inductor de esta actividad está comúnmente presente en las maderas atacadas. El pico de actividad se alcanzó al día 23 con valores 10 veces más bajos que aquellos obtenidos en esta misma cepa utilizando un medio con igual concentración de manganeso pero con glucosa como fuente de carbono (Papinutti y Forchiassin 2000). Por último la actividad lacasa alcanza su valor máximo en el medio con cobre coincidiendo con el mismo día que se alcanza la actividad MnP. La actividad alcanzada en el medio conteniendo cobre como inductor fue 6 veces mayor que aquellas obtenidas en CCMn o CC pero en todos los medios hay una coincidencia con el día en que se

alcanza el pico de actividad. La inducción de la actividad lacasa utilizando cobre es bastante conocida y este método es empleado para obtener una gran producción enzimática para sus posibles usos biotecnológicos (Galhaup et al. 2002). La aparición de ambas ligninasas fue bastante efímera, cuando se utilizó glucosa como sustrato ambas actividades marcan un pico de actividad varios días antes y se mantienen por más tiempo (Papinutti y Forchiassin 2000).

En esta parte del trabajo se muestra que las actividades celulolíticas (endoglucanasa y β -glucosidasa) merman hasta cerca de 3 veces su producción cuando se agrega $MnSO_4$, $CuSO_4$.

Se midió el pH óptimo de actividad para las cuatro enzimas. Las actividades endoglucanasa y β -glucosidasa mostraron un óptimo de actividad a pH 4,8; mientras que las ligninasas tuvieron un pH óptimo de 3,5 y 4,5 para lacasa y MnP respectivamente (Tabla 6). La termoestabilidad fue evaluada a pH 5 y a 40°C. La actividad lacasa fue la más estable, su actividad remanente luego de 20 h de incubación fue del 100%. Ambas celulasas fueron parcialmente desactivadas siendo su actividad residual del 50 y 35% para endoglucanasa y β -glucosidasa, respectivamente. La MnP fue afectada de manera similar (40% de actividad residual) a aquella observada para celulasas (Tabla 7).

Enzima	pH óptimo
Endoglucanasa	4,8
β-glucosidasa	4,8
MnP	4,5
Lacasa	3,5

Tabla 6 Valor de pH al cual la actividad es máxima (pH óptimo).

Enzima	Actividad (%)	Estabilidad (%)
endoglucanasa	10	50
β-glucosidasa	7	35
MnP	75	40
lacasa	63	100

Tabla 7 Actividad a pH 3,5 para endoglucanasa, β -glucosidasas y MnP. La actividad lacasa fue medida a pH 4,8. La actividad está expresada como el porcentaje respecto a la actividad medida al pH óptimo. Estabilidad tras 20 h de incubación a 40°C y a pH 5. Los valores representan la media de tres mediciones con un error menor al 5%.

Las actividades endoglucanasa, β -glucosidasa y MnP fueron medidas al pH óptimo de la lacasa (pH 3,5) y la lacasa fue medida al pH óptimo de las celulasas, pH 4,8 (Tabla 7). Las celulasas mostraron una gran caída de actividad cuando fueron medidas a este pH. Las actividades remanentes fueron del 10 y 7% para la endoglucanasa y β -glucosidasa, respectivamente. Sin embargo las actividades lacasa y MnP a pH 4,8 fueron bastante menos afectadas que las celulasas. Las actividades remanentes fueron 63 y 75% para lacasa y MnP respectivamente.

La compleja estructura de la madera junto con su composición química dificulta el estudio de su degradación. Los hongos son los únicos organismos capaces de llevar a cabo una completa degradación de tejidos totalmente lignificados. Los mecanismos por los cuales estos organismos operan para provocar tal patrón de pudrición no están totalmente entendidos, siendo esta parte del trabajo una contribución para saber un poco más acerca de este proceso.

4.3. Degradación de madera de álamo

4.3.1. Aspectos macroscópicos

Los bloques de madera de álamo fueron tratados con *F. sclerodermeus* en medio agar-extracto de malta por el término de 6 meses. Durante las tres primeras semanas de incubación el hongo colonizó toda la superficie de la madera, ya en el primer muestreo (2 meses) se observó que la colonización fue también en las superficies internas, dado que cortes longitudinales de los bloques expusieron el micelio. Transcurridos los 6 meses de incubación el color de los bloques no varió respecto al control, sin embargo las maderas atacadas fueron muy quebradizas, algo esponjosas y fácilmente divisibles en trozos longitudinales. Por lo general en las maderas atacadas por hongos causantes de pudrición blanca aparecen machas marrones que pueden deberse a depósitos de MnO_2 (Machuca y Ferraz 2001, Pérez y Jeffries 1992) en este trabajo no se observaron depósitos de este tipo. Se verificó la degradación de las maderas por pérdida de peso de las mismas (Figura 13). La tasa de degradación fue rápida hasta los 4 meses haciéndose más lenta en los meses subsiguientes. Las pérdidas de peso a los 6 meses alcanzaron un valor medio de 51% este valor es similar a los observados por Levin y Castro (1998) en maderas de *Salix* sp. y *Populus* sp. atacadas por *Trametes trogii*.

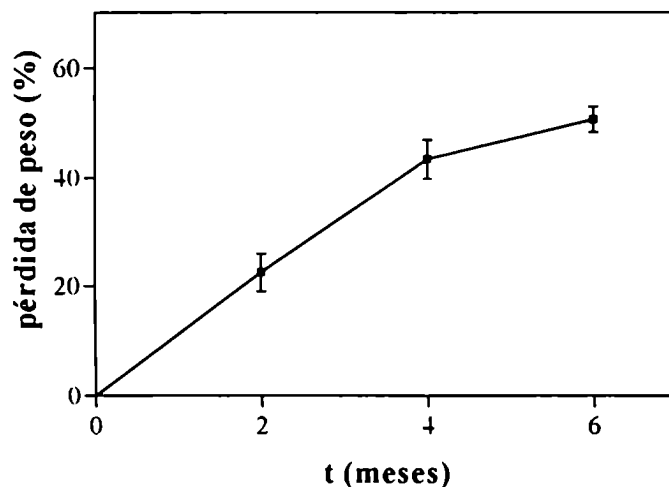


Figura 13 Pérdida de peso seco de los tacos de madera de álamo atacados por *F. sclerodermeus*. Cada punto representa el valor medio del peso de 10 tacos, las barras representan el error.

4.3.2. Pérdida de los componentes

Mediante hidrólisis diferencial de los componentes de los tacos de madera fue posible determinar su composición. En la **figura 14** se observa que celulosa y lignina fueron atacadas por igual, los valores obtenidos fueron de hasta un 58 y 56% para celulosa y lignina respectivamente. Esto mostró que el ataque a los distintos componentes de la madera fue simultáneo, similares resultados se observaron en otros hongos de pudrición blanca p.e. *Trametes versicolor* (Machuca y Ferraz 2001) y *Lentinus edodes* (Leatham 1985). Los hidrosolubles aumentaron hasta 3 veces su valor inicial, los extractos presentaron un color marrón el cual no se observó en aquellos provenientes de los tacos sin atacar y probablemente se deba a productos de degradación de la lignina. Estos resultados muestran la capacidad del hongo de degradar la lignina, si bien fue degradada junto con la celulosa es posible pensar que en condiciones naturales otros aspectos ambientales junto con los descritos en la sección 2.4. podrían influir para que se favorezca una degradación selectiva de los tejidos lignificados.

Es decir las enzimas celulolíticas y ligninolíticas podrían ser más estables y más activas a rangos de temperatura muy diferentes, otro factor podría ser el pH dentro de la madera, es probable que haya valores de pH que favorezcan más a un grupo de enzimas que a otro, también podrían verse favorecidas en cuanto su estabilidad, tal cual se vio en la sección anterior.

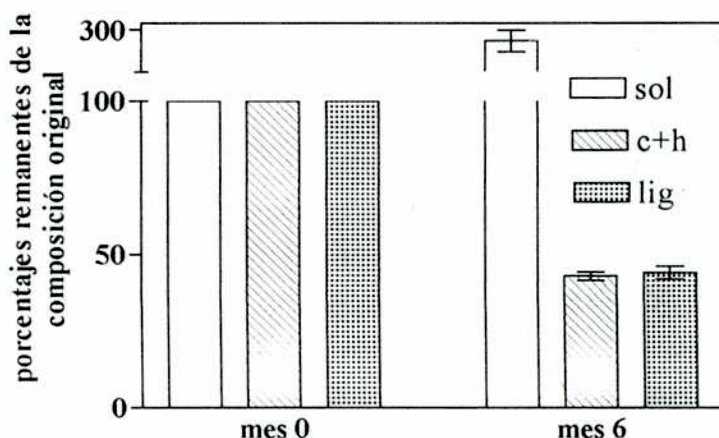


Figura 14 La hidrólisis diferencial de los tacos de madera de álamo atacados por *F. sclerodermeus* muestran los porcentajes remanentes de hidrosolubles (sol), celulosa junto con hemicelulosa (c+h) y lignina (lig). Las mediciones se realizaron por triplicado y las barras representan el error.

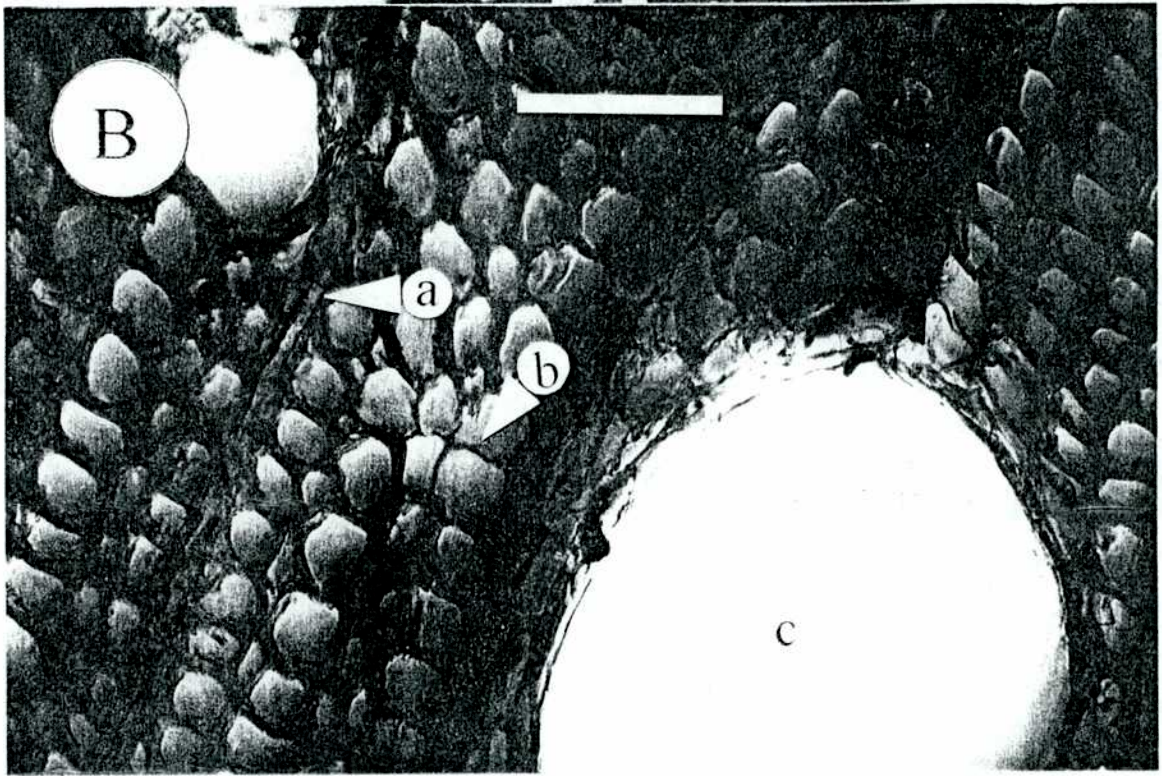
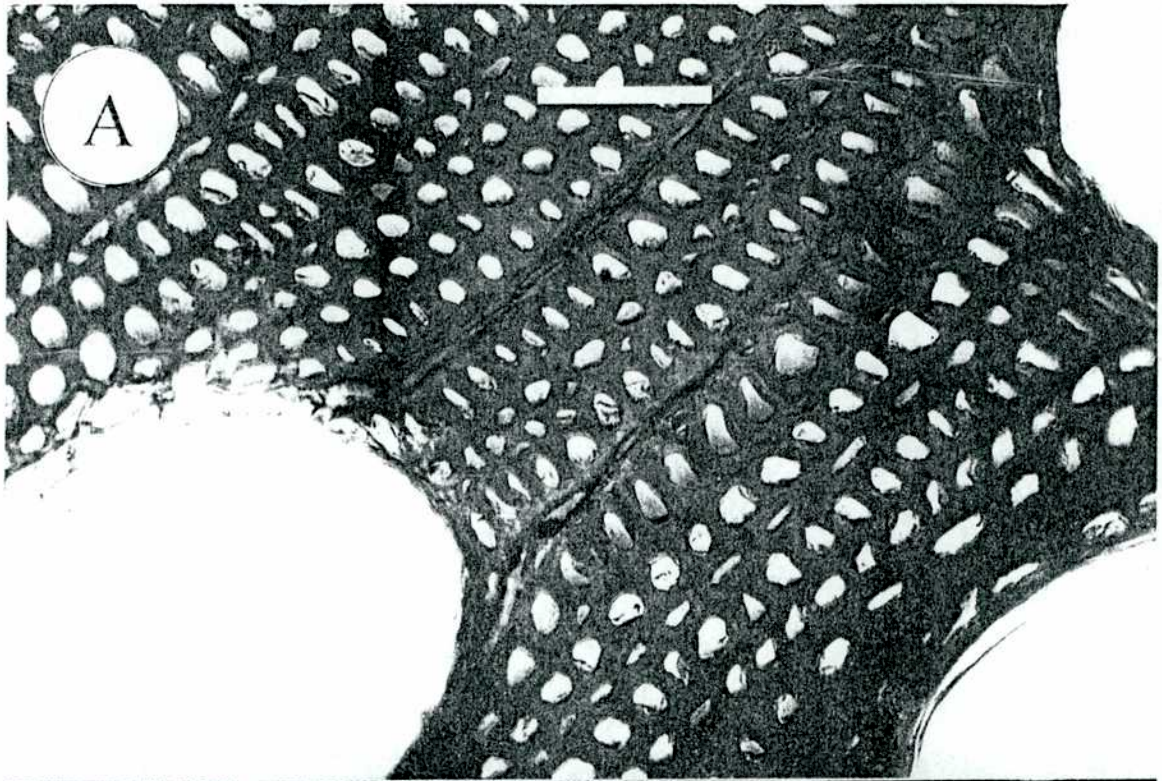
4.3.3. Aspectos anatómicos

En las **figuras 15 a y b** se observan los cortes anatómicos de la madera atacada y no atacada respectivamente. En la madera atacada se puede observar principalmente adelgazamiento de las paredes en algunas zonas, también aparecieron zonas de erosión circular en la superficie interna de los vasos (**flecha a**). Dentro de los vasos se observaron gran cantidad de hifas (**flecha b**). La degradación no ocurrió de manera uniforme en los tacos de madera dado que fueron observadas zonas de degradación junto con otras zonas intactas. Aparentemente los radios parenquimáticos fueron los más fácilmente degradados (**flecha c**). Similares resultados fueron encontrados por Levin y Castro, en maderas de álamo y sauce atacadas por *T. trogii* (Levin y Castro 1998).

Figura 15 (página siguiente) Cortes realizados a mano alzada de los tacos de madera no atacada (**A**) y atacada (**B**) revelan una estructura más esponjosa debido a adelgazamiento de paredes (**b**), también se observa degradación de los radios parenquimáticos (**a**) y algunas hifas colonizando los elementos de vasos (**c**). La barra representa 50 μM .

4.3.4. Actividades enzimáticas

La producción de enzimas ligninolíticas por *F. sclerodermeus* utilizando madera como único sustrato, fue evaluada en medios basados en aserrín de madera de álamo (**Figura 16a**) o cedro (**Figura 16b**). No se encontró actividad LiP en ninguno de los medios, esta enzima está poco distribuida entre los hongos de pudrición blanca, además es de difícil medición dado que en los sobrenadantes provenientes de un medio natural como es éste, es común que existan compuestos que interfieren en la lectura. Las actividades MnP y lacasa obtenidas en los medios con aserrín de álamo son muy superiores a las obtenidas en medio sintético sin agregado de inductores como Mn^{2+} o Cu^{2+} (Papinutti y Forchiassin 2000), probablemente esto se deba a que en las maderas existe una gran variedad de compuestos aromáticos que habrían pasado a solución, la inducción por este tipo de compuestos fue probada en varios hongos de pudrición blanca (Lo et al. 2001) y particularmente en *F. sclerodermeus* ya fue demostrado que compuestos aromáticos muy distribuidos en los tejidos lignocelulósicos como el AF (Rosazza et al. 1995) o vainillina (Muñoz et al. 1997) son buenos inductores. El manganeso que comúnmente



está presente en las maderas también pudo haber sido el inductor, y ya se expuso en la sección anterior que en *F. sclerodermeus* las actividades lacasa y MnP aumentan en presencia de este dicatión.

Tabla 8 Actividades lacasa y MnP (el día de máxima actividad) de *F. sclerodermeus* en medios con aserrín de madera de álamo o cedro y adicionados con glucosa o medio GA.

Tratamiento	lacasa (mU ml ⁻¹)		MnP (mU ml ⁻¹)	
	cedro	álamo	cedro	álamo
Glucosa 10 g l ⁻¹	562.9 (17)	1240 (14)	0	155.3 (16)
GA	432 (15)	932.5 (16)	0	124.35 (16)

En el medio conteniendo aserrín de cedro no se detectó actividad lacasa ni MnP. La cinética de consumo de azúcares reductores es similar para ambos medios, se observa que a partir del día 14 comienza la máxima tasa de consumo. Es decir que la falta de actividades en el medio de cedro no se debe a un retraso en el crecimiento del hongo sino que otro factor estaría afectando la producción enzimática.

Respecto a las cantidades de proteínas extraíbles de los medios, en la **figura 16a** se observa que en el medio de álamo hay un nivel basal de proteínas las cuales provienen de la madera, en el medio de cedro no hay proteínas al tiempo 0 y éstas comienzan a aumentar al día 11 de crecimiento producto de la liberación por el organismo. Con el objetivo de evaluar si existía alguna limitación en algunos nutrientes que estuviera afectando la producción de las actividades obtenidas en ambos medios, se hicieron cultivos agregando glucosa o medio GA en reemplazo del agua destilada. En la **tabla 8** figuran los valores de actividad para ambos medios en el día que éstas alcanzaron su valor máximo. Es interesante notar que en el medio de álamo las actividades lacasa fueron algo menores que sin agregados, mientras que en el medio de cedro ésta se indujo. Respecto a la actividad MnP en medio de álamo no mostró ser afectada por el agregado de nutrientes, mientras que en el medio de cedro no se detectó en ninguno de los casos. Por lo tanto la producción de enzimas ligninolíticas en *F. sclerodermeus* está estrechamente relacionada con el tipo de madera que se use como sustrato. El agregado de macro nutrientes como glucosa o nitrógeno no lograron revertir totalmente ese efecto.

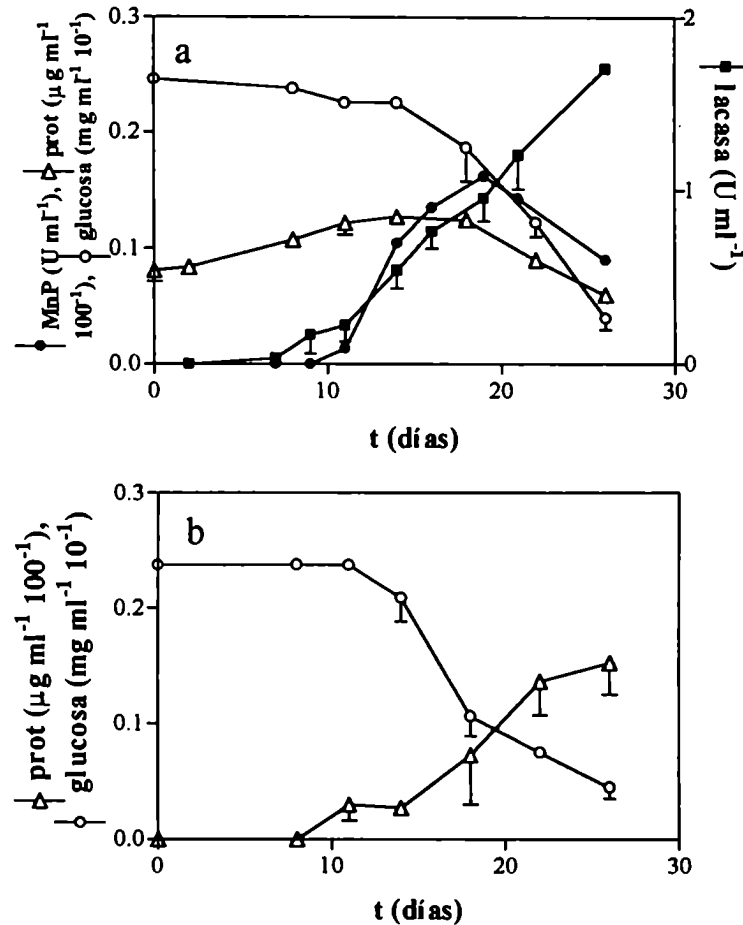


Figura 16 Curvas de actividad MnP y lacasa, proteínas y azúcares reductores en función del tiempo para *F. sclerodermeus* creciendo en aserrín de álamo (a) o cedro (b) como único sustrato. Las mediciones se realizaron por triplicado y las barras representan el error.

4.4. Purificación y caracterización de las enzimas lacasa y MnP

4.4.1. Proceso de purificación

Para su purificación ambas enzimas fueron producidas en medio YPG en agitación. Los pasos seguidos para la purificación de la MnP y lacasa se exponen en las **tablas 9 I y II**, respectivamente. Tres pasos de purificación, Q-cartridge (**Figura 17 Ia**), Sephacryl S-200 (**Figura 17 Ib**) y Mono-Q (**Figura 17 Ib**) fueron necesarios para separar dos isoenzimas de lacasa hasta homogeneidad electroforética, estas isoenzimas fueron denominadas Lac I y Lac II. Los mismos pasos cromatográficos utilizados para la lacasa fueron aplicados para la MnP (**Figuras 17 II a, b y c**). Luego del proceso de purificación se separaron dos isoenzimas a las cuales se denominó MnP I (mayoritaria) y MnP II.

II

— RESULTADOS Y DISCUSIÓN —

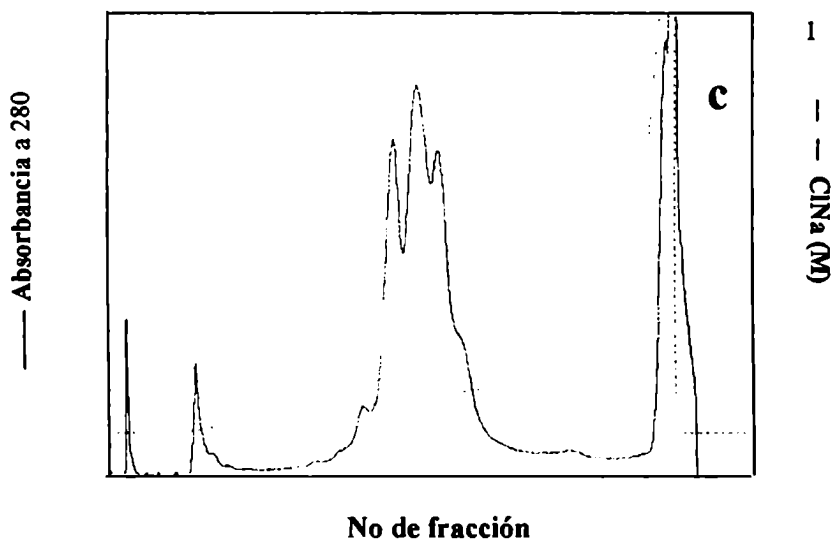
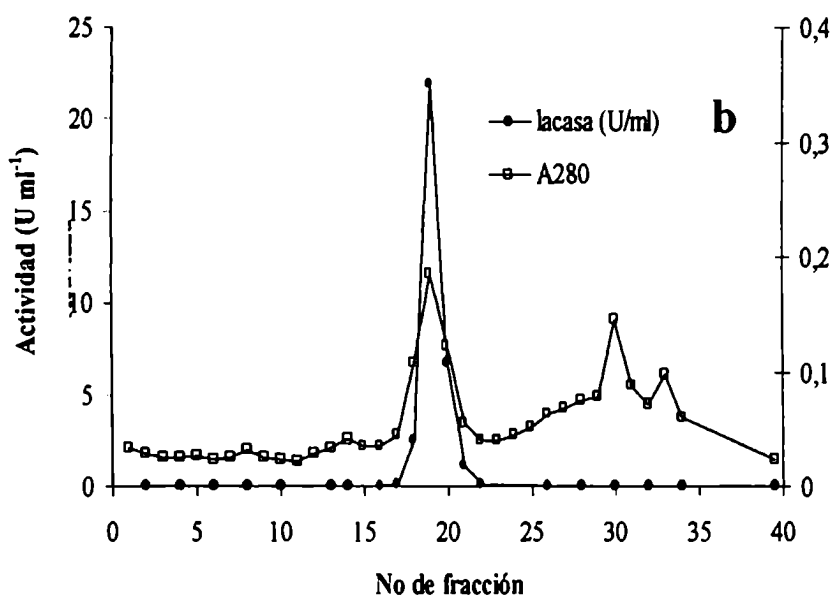
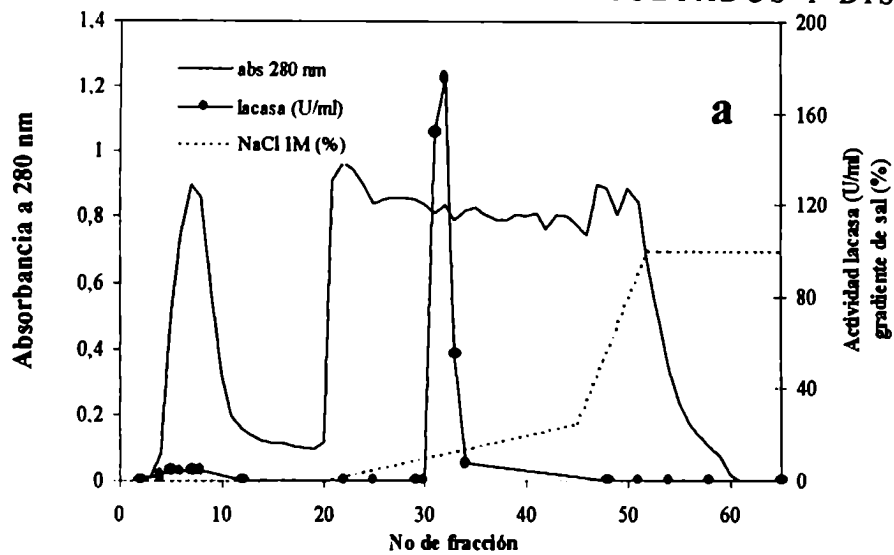
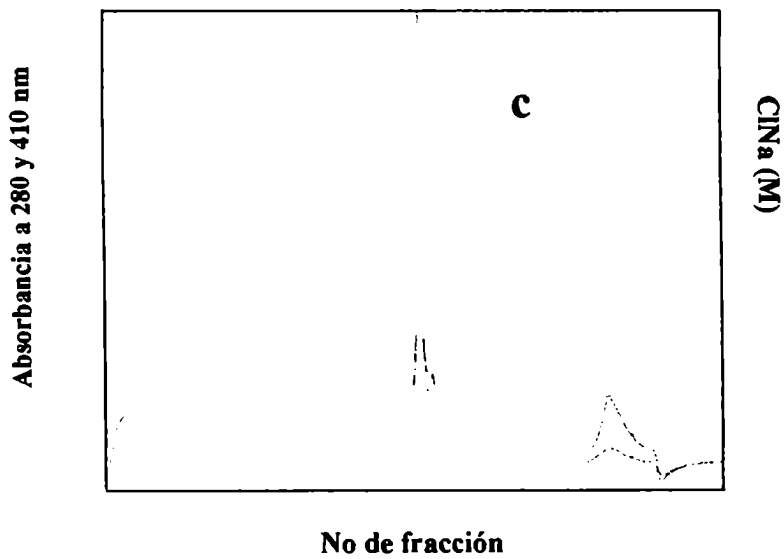
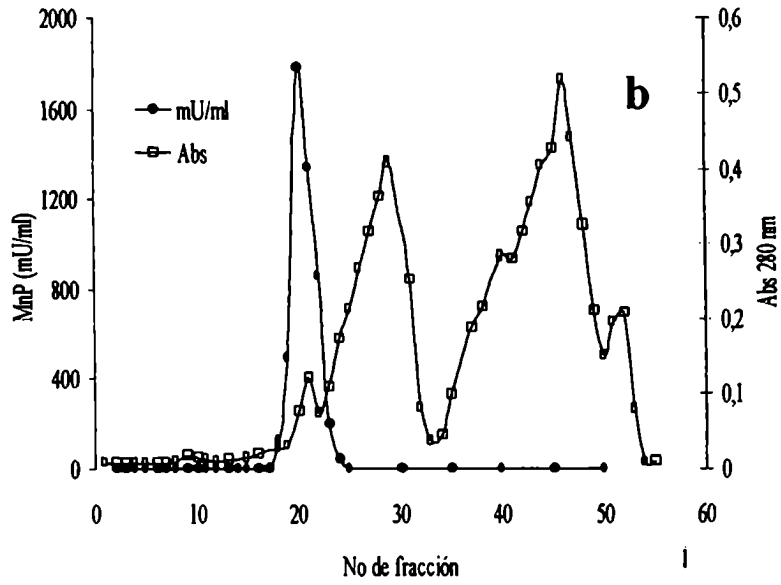
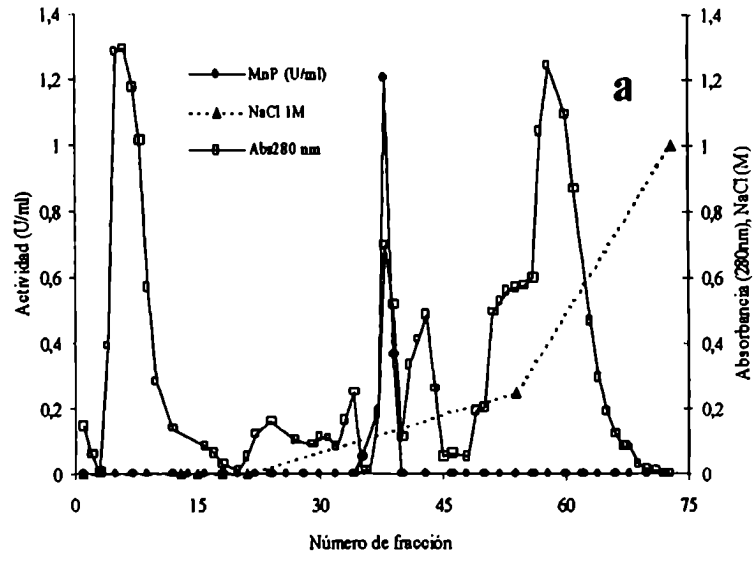


Figura 17 Pasos cromatográficos para la purificación de lacasa (I) y MnP (II). Los perfiles corresponden a: columna de intercambio iónico (Q-Cartridge) (a); filtración en gel (Sephacryl S-200) (b); y columna de intercambio iónico a alta presión (HPLC) (c).

I



I

	Proteína (mg)	Actividad Total (U)	Actividad Especifica (U mg ⁻¹)	Rendimiento (%)	Factor de Purif.
Sobrenadante	120	350	3	100	1,0
Ultrafiltración	75	325	4	93	1,5
Q-cartridge	47	236	5	67	1,7
Sephacryl	33	230	7	66	2,4
MonoQ MnP I	12	188	16	54	5,4
MonoQ MnP II	1	20	15	6	5,3
Total	13	208	16	59	

II

	Proteína (mg)	Actividad Total (U)	Actividad Especifica (U mg ⁻¹)	Rendimiento (%)	Factor de Purif.
Sobrenadante	190	20000	105	100	1,0
Ultrafiltración	123	19000	154	95	1,5
Q-cartridge	88	15417	174	77	1,7
Sephacryl S-200	68	15200	223	76	2,1
MonoQ Lac I	17	9799	562	49	5,3
MonoQ Lac II	20	5300	265	27	2,5
Total	37	15099	403	75	

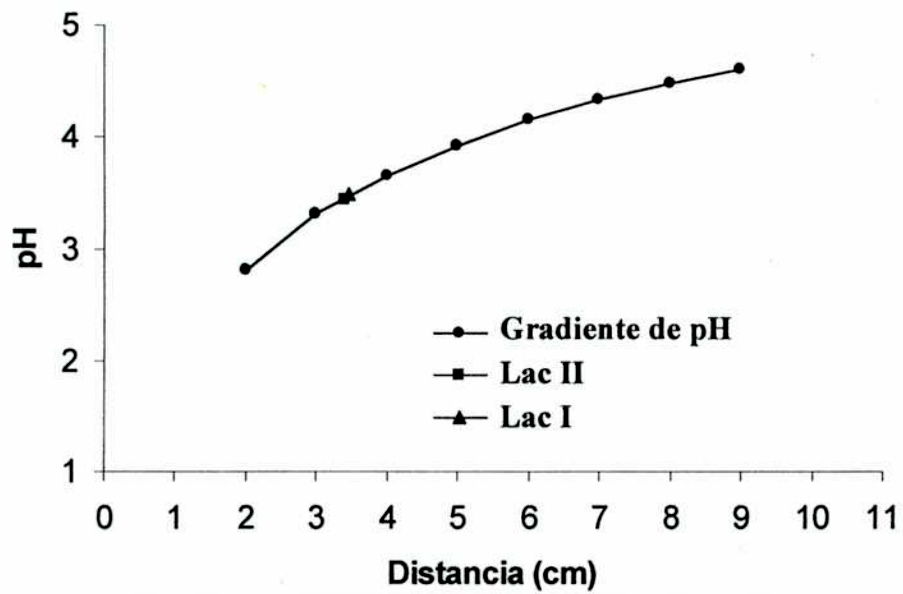
Tabla 9 Esquema del proceso de purificación de la MnP (I) y lacasa (II) producidas por *F. sclerodermeus* creciendo en un medio semidefinido (YPG) en agitación. El medio fue suplementado con CuSO₄ 0,15 mM o MnSO₄ 1 mM para obtener una alta producción de lacasa y MnP respectivamente.

4.4.2. Caracterización de isoenzimas

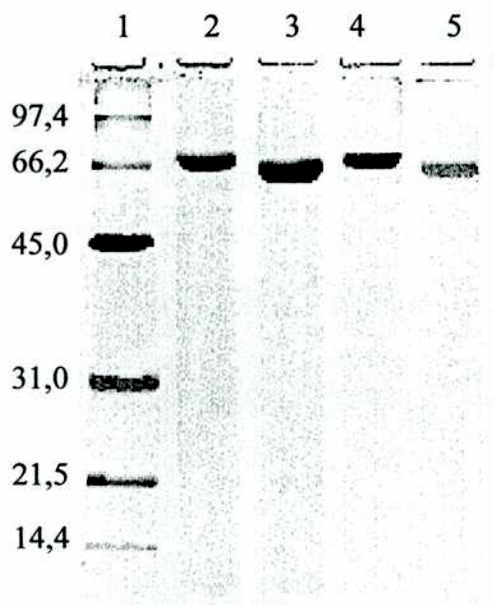
Luego de todo el proceso de purificación a través de columnas de los sobrenadantes obtenidos de *F. sclerodermeus* creciendo en el medio YPG, se lograron separar hasta homogeneidad electroforética dos isoenzimas de lacasa (Lac I y Lac II) y dos de MnP (MnP I y MnP II). Ambas isoenzimas de lacasa fueron glicoproteínas con un 3% de contenido de carbohidratos unidos a N y ambas con una masa molecular estimada en gel de poliacrilamida conteniendo SDS, de alrededor de 67 kDa (**Figura 18b**). El isoelectroenfoco de proteínas mostró que ambas enzimas difieren muy poco en sus puntos isoelectrónicos (pI), los valores fueron de 3,41 para la Lac I y de 3,48 para la Lac II (**figura 18a**).

Las dos isoenzimas de MnP de *F. sclerodermeus* también son glicoproteínas con un contenido de un 4% de carbohidratos unidos a N y una masa molecular estimada en aproximadamente 47 kDa (**figura 19b**). Como en el caso de las lacasas, el pI de ambas MnP difieren muy poco entre sí, siendo sus valores de aproximadamente 3,45 y 3,35 para la MnP I y MnP II, respectivamente (**figura 19a**). La masa molecular de las isoenzimas de las dos lacasas y las dos MnPs secretadas por *F. sclerodermeus* cuyos valores resultaron ser de 67 y 47 kDa respectivamente están dentro del rango de valores publicados para la mayoría de otras especies de hongos (Thurston 1994). Generalmente las lacasas son proteínas monoméricas glicosiladas y con una masa molecular entre 50 y 80 kDa (Thurston 1994, Yaropolov et al. 1994). Las MnPs también son proteínas hémicas glicosiladas con una masa molecular entre 42 y 53 kDa (Martínez et al. 1996b). El pI de las lacasas y MnPs secretadas por *F. sclerodermeus* pertenecen al grupo de las enzimas ligninolíticas más ácidas con valores en sus pI dentro del rango de 3,3-3,5 (estas pequeñas diferencias posibilitaron su separación en la columna Mono-Q). La MnP con el más alto pI fue descrita para *P. chryso sporium* (pI 4,5-4,9) (Datta et al. 1991, Pease y Tien 1992) y aquellas con los valores de pI más bajos fueron descritas en *T. versicolor* y *Panus tigrinus* (pI 2,9) (Maltseva et al. 1991, Johansson y Nyman, 1993). En el caso de las lacasas las mayores diferencias fueron mostradas en las isoenzimas de *P. ostreatus* (pI 2,9 y 6,7) (Palmieri et al. 1997).

Todas las lacasas y MnPs estudiadas siguieron una cinética típica de Michaelis Menten. Los espectros en el rango de UV y visible de las isoenzimas de lacasas nativas mostraron características típicas de aquellas enzimas que contienen cobre en su molécula como grupo prostético (este dato no se muestra). Las constantes cinéticas de las lacasas y MnPs se exponen en las **tablas 10 a y b**. Los valores más altos de eficiencia para ambas lacasas fueron hacia el sustrato ABTS, para los otros sustratos éstas mostraron también similar eficiencia y afinidad. Respecto a la especificidad de las isoenzimas de MnPs es interesante notar que entre ambas MnPs hubo diferencias en su afinidad sin embargo mostraron alta afinidad sobre H_2O_2 , Mn^{2+} y reacciones mediadas por Mn sobre el 2,6-DMF. La isoenzima mayoritaria MnP I, presentó mayor afinidad hacia el Mn^{2+} que la MnP II y ambas exhibieron una muy baja actividad independiente de Mn^{2+} a altas concentraciones de 2,6-DMF (se probaron rangos de entre 5 y 20 mM). Las propiedades catalíticas fueron muy similares entre las lacasas Lac I y Lac II provenientes de *F. sclerodermeus*, y algunas diferencias fueron detectadas entre las MnPs MnP I y MnP II como es expuesto por sus constantes cinéticas.

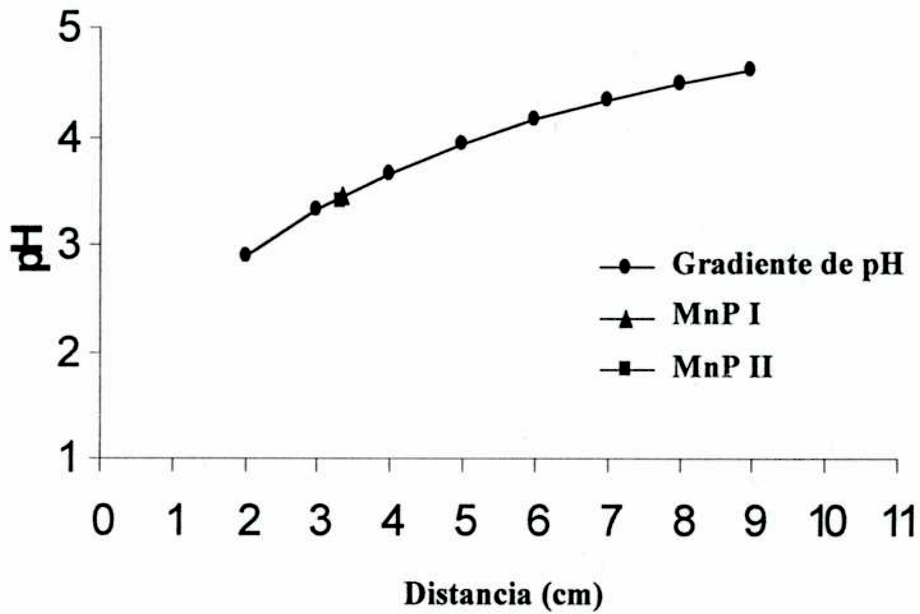


a

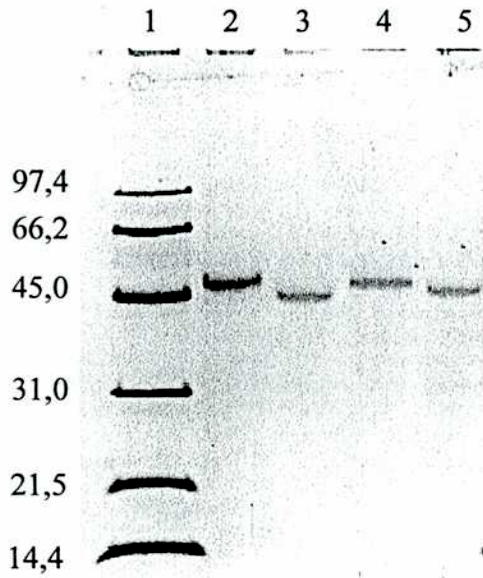


b

Figura 18 (a) Isoelectroenfoque para las isoenzimas de lacasa. Los valores de pI obtenidos fueron de 3,41 para la Lac I y 3,48 para la Lac II. (b) SDS/PAGE 12% de las isoenzimas Lac I y II, para determinar el contenido de carbohidratos unidos a N, a las enzimas se las trató con Endo-H y se vió que la Lac I y Lac II poseen 5% de carbohidratos (calles 3 y 5 respectivamente). El peso molecular fue de 67 para ambas enzimas (calles 2 y 4). En la calle 1 fueron corridos los patrones de peso molecular.



a



b

Figura 19 (a) Isoelectroenfoque para las isoenzimas de MnP. Los valores de pI obtenidos fueron de 3,45 para la MnP I y 3,35 para la MnP II. (b) SDS/PAGE 12% de las isoenzimas Lac I y II, para determinar el contenido de carbohidratos unidos a N, a las enzimas se las trató con Endo-H y se vió que la MnP I y MnP II poseen 4% de carbohidratos (calles 3 y 5 respectivamente). El peso molecular fue de 47 para ambas enzimas (calles 2 y 4). En la calle 1 fueron corridos los patrones de peso molecular.

Ambas lacasas (**Tabla 10b**) mostraron la más alta afinidad y eficiencia hacia el ABTS. Respecto a las MnPs (**Tabla 10a**), ambas isoenzimas mostraron la más alta afinidad y eficiencia hacia el H₂O₂, en la oxidación del 2,6-DMF. Existen dos tipos de enzimas peroxidadas oxidantes de Mn²⁺ aquellas que requieren Mn²⁺ por ej. las de *P. chrysosporium*, y aquellas que, mostrando alta afinidad hacia el Mn²⁺ también poseen una actividad independiente de Mn²⁺ es el caso de las enzimas descritas en especies de los géneros *Bjerkandera* y *Pleurotus* (Palma et al. 2000). Los resultados sugieren que la MnP proveniente de *F. sclerodermeus* requiere Mn²⁺ para completar su ciclo catalítico y es similar a la de *P. chrysosporium*. Fue estudiada la estabilidad de las lacasas y MnPs a temperatura ambiente (25°C) y un amplio rango de pH (2 hasta 8,5). La MnP presentó una completa estabilidad tras 24 h de incubación, mientras que la lacasa fue sensible a pH bajo. Perdiéndose un 90% de actividad luego de una incubación de 24 h a pH 2. En el rango de pH desde 6 hasta 8,5 la lacasa fue completamente estable luego de 24 h de incubación.

	MnP I		MnP II		a
	Km (mM)	Vmax (mU µg ⁻¹)	Km (mM)	Vmax (mU µg ⁻¹)	
H ₂ O ₂	11	553	6,6	112	
Mn ²⁺	30	775	27	412	
DMP c/Mn	291	342	84,5	68,1	
DMP	lineal	lineal	lineal	lineal	

	lacasa I		lacasa II		b
	Km	Vmax (mU µg ⁻¹)	Km	Vmax (mU µg ⁻¹)	
ABTS	27	184	21,3	168,3	
DMP	177	190,65	142	201,88	

Tabla 10 Constantes cinéticas para las MnP I y II (a) y lacasas I y II (b) de *F. sclerodermeus*. Para el cálculo de Km y Vmax se utilizaron los valores iniciales de reacción, para el procesamiento de datos se utilizó el programa Enzyfit. Todas las mediciones se hicieron a 30°C a la longitud de onda correspondiente según se detalla en la sección de materiales y métodos.

4.5. Evaluación de la estabilidad de la lacasa, la enzima mayoritaria producida por *F. sclerodermeus*

4.5.1. Efecto del pH y la temperatura sobre la estabilidad enzimática

La actividad lacasa obtenida mediante el cultivo de *F. sclerodermeus* en salvado de trigo fue sometida a diferentes tratamientos para evaluar su estabilidad. Los crudos así obtenidos fueron completamente estables por más de un año guardados a -20°C . Cuando la enzima fue sujeta a un periodo de preincubación de 30 min a 40°C , la actividad incrementó en aproximadamente 50% comparado con la lacasa no incubada. Este resultado coincide con otros trabajos publicados donde se describe un efecto similar para otras lacasas fúngicas por ej. en *Chaetomium thermophilum* (Chefetz et al. 1998), *Coriolus hirsutus* y *C. zonatus* (Koroleva et al. 2001). Así es que todos los subsecuentes experimentos fueron llevados a cabo con dicha preincubación la cual fue tomada como tiempo cero. Las fracciones fueron incubadas en soluciones amortiguadoras de citrato fosfato borato en un rango de pH desde 2 hasta 11 a temperaturas de 30, 40 y 50°C y luego fue medida su actividad (**Figura 20**). A 30°C (**Figura 20a**), la actividad lacasa mantuvo el 100% de actividad en el rango de pH desde 3 hasta 11 y tras una incubación de 24 h. Las actividades de los crudos mantenidos a 40°C (**Figura 20b**) presentaron perfiles de estabilidad completamente diferentes: para aquellos incubados por 1 h, la lacasa retuvo $>75\%$ de su actividad entre pH 5 y 10, con una actividad máxima a pH 8; luego de 6 y 24 h, la enzima mostró un patrón diferente de respuesta: en todos los casos, la actividad residual estuvo por debajo del 75%, y el óptimo cambió hacia pH 7. A 50°C (**Figura 20c**), la actividad residual de la enzima estuvo en todo momento por debajo del 75%, aunque haya sido un tiempo de incubación relativamente corto (0,5 h). Y de nuevo, el pH óptimo estuvo correlacionado con el periodo de incubación: después de 0,5 h, la actividad máxima fue registrada a pH 7, mientras que después de las 5 y 24 h las actividades máximas fueron detectadas a pH 5. La actividad lacasa obtenida de *F. sclerodermeus* a partir de un sustrato natural mostró ser más estable que otras lacasas purificadas, tales como las de *Pycnoporus sanguineus* (Pointing et al. 2000) o *Pleurotus sajor-caju* (Lo et al. 2001).

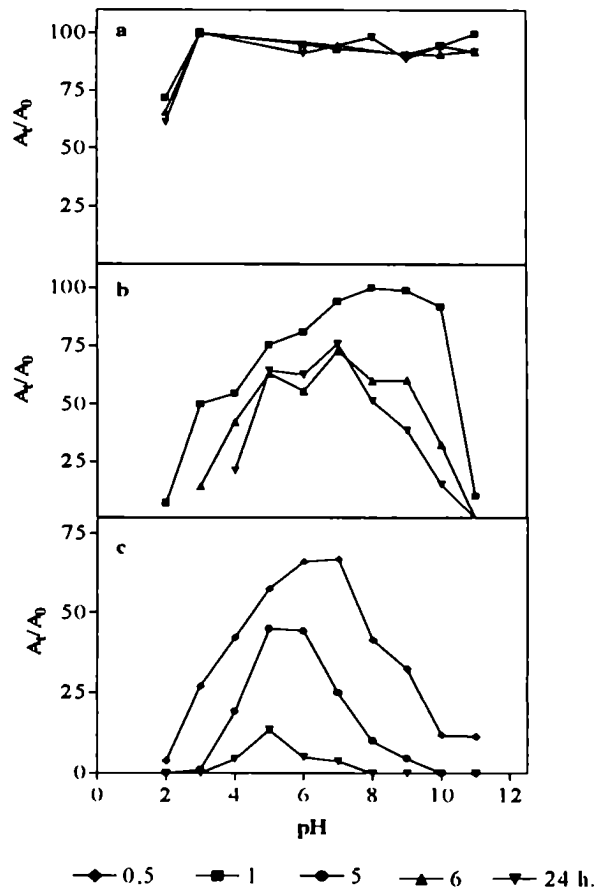


Figura 20 Perfiles de inactivación térmica de la enzima a 30 (a); 40 (b); y 50°C (c). Se incubaron 1,5 ml del crudo enzimático en tubos sellados para impedir la concentración por evaporación. El valor de pH deseado se obtuvo agregando 1,5 ml buffer citrato fosfato borato 1 M.

4.5.2. Patrón de inactivación de las isoenzimas

Con el objetivo de profundizar en la cinética de inactivación de la actividad lacasa, fueron preparados geles al 12% de poliacrilamida de los extractos crudos sujetos a los diferentes tratamientos de temperatura y pH. Todas las calles dentro del gel presentaron un patrón igual de inactivación, por lo tanto uno solo de los tratamientos se muestra en la figura. La **figura 21** muestra que la fracción no tratada (tiempo cero) contiene al menos tres isoenzimas. Luego de 1 h de incubación a 50°C (pH 8), ambas bandas la primera (Lc1) y la tercera (Lc3) se hicieron menos visibles, y luego de 6 h de incubación a 50°C éstas se hicieron prácticamente indetectables luego del revelado con su sustrato ABTS. En contraste, la banda central (Lc2), se mantuvo como la única banda visible por toda la duración del período de incubación, lo cual podría explicar la forma bifásica de la curva ajustada, donde una alta tasa de inactivación es acompañada por la

desaparición de las bandas Lc1 y Lc3, mientras que la Lc2 presentó la más baja tasa de inactivación reteniendo cerca del 10% de la actividad en el período de 6 h de incubación (**Figura 21A**). Estos resultados inclinan a pensar que las formas alternativas para la lacasa exhiben distintos patrones de sensibilidad a la temperatura, los cuales pueden explicar la muy gradual pérdida de actividad hacia los estados finales de incubación (**Figura 21B**). El análisis de los datos mediante la ecuación cinética es una descripción fenomenológica del decaimiento enzimático y no una identificación de los mecanismos moleculares involucrados en el proceso. Estos mecanismos son difíciles de explicar debido a la presencia de varios compuestos contaminantes dentro del extracto crudo.

4.5.3. Efecto de diferentes aditivos sobre la estabilidad enzimática

En este punto asumimos el hecho de que el extracto crudo puede contener proteasas junto con un amplio rango de compuestos que podrían interferir con la estabilidad de las enzimas todo esto junto con mecanismos intrínsecos de la proteína que podrían ser una desconfiguración espacial o pérdida de un grupo prostético. Con el objetivo de incrementar la estabilidad de la lacasa se utilizaron varios compuestos, entre éstos aquellos ampliamente usados como el glicerol, manitol y CuSO_4 este último no es utilizado para estabilizar actividades enzimáticas, pero de todos modos se probó su efecto sobre esta enzima dado que posee cobre como grupo. Las interacciones con el agua y la pérdida de cobre están descritos como hechos importantes para la estabilidad de esta enzima (Koroleva et al. 2001). También fue evaluado el efecto del cooxidante 1-HBT. La **tabla 11** muestra cómo los diferentes compuestos afectan la estabilidad de la lacasa luego de 24 h a pH 4,5 y 40°C. El incremento en la concentración de los aditivos estuvo asociada con una caída en la actividad lacasa bajo las condiciones anteriores, con la excepción del efecto provocado por CuSO_4 y manitol. Cuando se agregó CuSO_4 a una concentración de 1,25 mM, la enzima mantuvo el 81% de su actividad, mientras que el crudo de referencia sin agregados mantuvo solo el 57%. Resultados de trabajos previos fueron que el someter a la lacasa a altas temperaturas causó la liberación de los iones cobre. Este vaciamiento de los iones cobre no solo inactivó a la enzima sino que también causó el desacople de las subunidades, ambos procesos mostraron ser reversibles (Koroleva et al. 2001). Estos resultados podrían estar relacionados con el efecto estabilizador que se observó con este catión bajo las condiciones evaluadas. Es posible pensar que como resultado de la reversibilidad del vaciamiento de cobre, la

Aditivo	Concentración	Actividad remanente (A_t/A_0)
Veratril alcohol	0.2%	0.63
	1%	0.51
	5%	0.26
	10%	0.11
Glicerol	0.2%	0.60
	1%	0.50
	5%	0.49
	10%	0.48
Trealosa	0.05%	0.61
	0.1%	0.35
	0.5%	0.04
	1%	0.07
1-HBT	0.1 mM	0.59
	0.5 mM	0.39
	1.25 mM	0.11
	2.5 mM	0.07
CuSO₄	0.05 mM	0.58
	0.1 mM	0.53
	0.5 mM	0.73
	1.25 mM	0.81
Manitol	0.05%	0.55
	0.1%	0.53
	0.5%	0.54
	1%	0.78
Glutaraldeído	0.05%	0.46
	0.25%	0.35
	1%	0.37
Control		0.57

Tabla 11 Efecto de diferentes aditivos sobre la estabilidad de la lacasa luego de 24 h de incubación a pH 4,5 y 40°. Los valores representan la media de tres mediciones con un error menor al 5%.

Tomando en cuenta los resultados descriptos anteriormente, se decidió llevar a cabo un estudio algo más profundo para comprender algo más acerca de cómo el cobre afecta la estabilidad de la actividad lacasa (**Tabla 12**).

CuSO ₄ (mM)	Glicerol (%)	t _m (h)	
		40°C	50°C
1,25	0,2	114	14,51
	0	71	12,53
2,5	0,2	53	15,46
	0	44	14,01
5	0,2	30	9,35
	0	43	7,98
0	0,2	36	8,91
	0	40	9,81

Tabla 12 Vida media de la actividad lacasa tratada con diferentes combinaciones de CuSO₄ y glicerol a pH 4,5. Los valores surgen por interpolación en la curva hallada según se describe en materiales y métodos, sección 10.1.

A pH 4,5 y 40°C, los más altos valores de vida media (t_m) fueron obtenidos en presencia del agregado de CuSO₄ a una concentración de 1,25 mM y glicerol 0,2% (t_m=114 h) y 1,25 mM de CuSO₄ (t_m=71 h), mientras que los tratamientos a 50°C, los ensayos con 2,5 mM de CuSO₄ y glicerol 0,2% y 2,5 mM de CuSO₄ estimularon los mejores efectos de estabilización. Los valores de vida media de los controles fueron de 40 y 9,81 h a 40 y 50°C, respectivamente, a pesar de la posible presencia de proteasas estos valores son similares a aquellos obtenidos para lacasas purificadas de *Chaetomium thermophilum* el cual es un hongo termofílico y presentó vidas medias de su actividad lacasa de 24 y 12 h a 40 y 50°C, respectivamente (Chefetz et al. 1998). La estabilización de proteínas por solutos de bajo peso molecular es una estrategia ampliamente utilizada. Compuestos como azúcares (Baptista et al. 2000), polioles (Costa et al. 2002) y sales (Baptista et al. 2000) pueden llegar a incrementar la estabilidad térmica de las enzimas. En particular el papel de los polioles en la estabilización enzimática tiene que ver con la física del agua en la molécula, este metabolito baja la hidratación de la proteína y por lo tanto su

desnaturalización (Costa et al. 2002, Lozano et al. 1994). Así, dado que se observó un aumento en la estabilidad a 40°C en respuesta a la combinación de ambos metabolitos cobre (1,25 mM) y el ampliamente usado glicerol, es probable que la inactivación de la enzima lacasa opere a través de al menos dos eventos posibles: la carencia de un compuesto depresor de la hidratación y el vaciamiento de su grupo prostético, cobre.

4.6. Detoxificación del fungicida verde de malaquita por sobrenadantes de cultivo con alta actividad lacasa

En esta parte del trabajo fueron empleados sobrenadantes con alta actividad lacasa obtenidos a partir de cultivos optimizados para tal actividad según la sección 2.1. Las **figuras 22a y b** muestran las curvas de crecimiento de ambos hongos en presencia de VM. *P. chrysosporium* (**Figura 22a**) fue muy sensible al colorante e inhibido de crecer en el medio conteniendo una concentración de 64 μM de VM. Concentraciones de 32 μM y por debajo afectaron su crecimiento observándose una cinética más lenta que la del control sin el fungicida. *P. chrysosporium* cubrió en 60 h la caja conteniendo agar y extracto de malta sin la adición de VM mientras que este mismo medio adicionado con 2 μM del fungicida causó un retraso de 24 h en su crecimiento cubriendo la caja en 84 h. A una concentración de 64 μM el crecimiento radial fue totalmente inhibido. *F. sclerodermeus* exhibió mayor tolerancia al compuesto tóxico (**Figura 22b**), a 128 μM el hongo completó la caja en 9 d y no fue afectado a concentraciones de 32 μM o menores, en tales casos el llenado de la caja ocurrió luego de 7 d. El crecimiento de *P. chrysosporium* fue afectado a concentraciones de 32 μM y por debajo observándose una tasa de crecimiento más baja que el control. Si bien el hongo posee la maquinaria enzimática para degradar la lignina, éste exhibió una muy baja tolerancia hacia el fungicida, por otro lado, resultados previos mostraron que el hongo *Cunninghamella elegans* el cual no es ligninolítico fue capaz de crecer en presencia de VM a concentraciones de 81 μM (Cha et al. 2001). Entonces resulta evidente que el hecho de poseer las enzimas ligninolíticas puede no ser suficiente para que el organismo pueda tolerar compuestos tóxicos que pueden ser degradados y detoxificados por estas enzimas. Probablemente esto se deba a que *P. chrysosporium* secreta sus enzimas ligninolíticas (al menos LiP) en su fase de crecimiento secundario, por lo tanto la degradación y detoxificación de compuestos se daría en el momento de la liberación de estas enzimas, dificultando de esta manera la instalación del hongo en ambientes

contaminados. También existen aquellos hongos que sin estas enzimas pueden ser capaces de crecer en presencia de VM y se sugirió que el citocromo P450 podría estar involucrado en el proceso de modificación de la molécula del colorante (Cha et al. 2001).

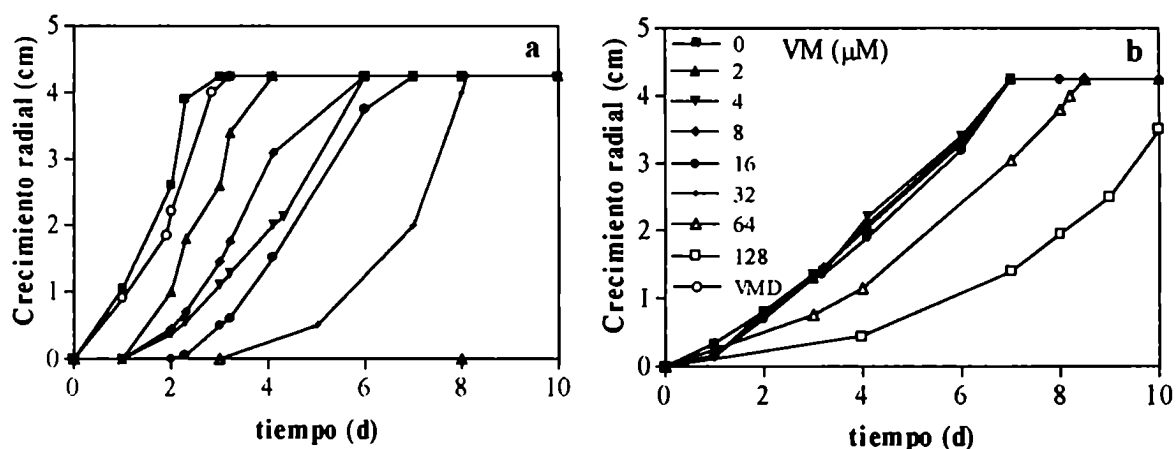


Figura 22 Crecimiento radial del micelio de *P. chrysosporium* (a) y *F. sclerodermeus* (b) en presencia del fungicida VM a varias concentraciones micromolares. El efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *P. chrysosporium* fue apreciablemente más marcado que en *F. sclerodermeus*. (VMD: verde de malachita decolorado). Los valores representan la media de duplicados independientes y el error fue menor al 5%.

Ambos hongos fueron capaces de decolorar el VM pero mostraron una manera diferente de hacerlo: en *F. sclerodermeus* el halo de decoloración es coincidente con el margen de crecimiento del micelio, mientras que en el caso de *P. chrysosporium* la decoloración se vio retrasada respecto del crecimiento esto coincide con el hecho de que estas enzimas son metabolitos secundarios en este hongo. La actividad lacasa de *F. sclerodermeus* en cajas con el agregado de VM fue de $0,1 \text{ U g}^{-1}$, mientras que en *P. chrysosporium* no hubo esta actividad en ningún caso.

También fue evaluado el efecto del VM y del VMD sobre la producción de biomasa en cultivos líquidos de *P. chrysosporium* y *F. sclerodermeus* (Figuras 23a y b respectivamente). Se observó un comportamiento similar al obtenido en cajas, *P. chrysosporium* fue mucho más sensible que *F. sclerodermeus*, para evaluar la detoxificación se usó una concentración de $16 \mu\text{M}$ de VMD, esta concentración fue menor que la utilizada para medio sólido dado que ambos hongos fueron mucho más sensibles al tóxico en medio líquido. Probablemente una de las razones sea que las enzimas en medio líquido se diluyen mucho más fácilmente y la detoxificación no sea tan localizada como puede ocurrir en medio agarizado.

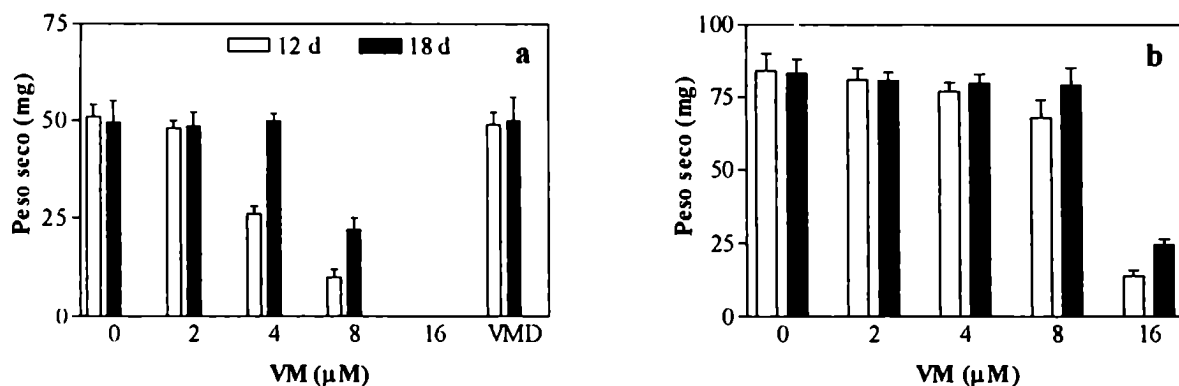


Figura 23 Efecto de los compuestos VM y VMD (16 µM) sobre la producción de biomasa en cultivos líquidos estáticos de malta para *P. chrysosporium* (a) y *F. sclerodermeus* (b). Las muestras se tomaron a los 12 y 18 d de crecimiento. Los representan la media de triplicados con un error menor al 5%.

La cinética de decoloración se muestra en las **figuras 24a y b**. La presencia de 1-HBT incrementó 200 veces la tasa de decoloración respecto de la decoloración sin el agregado. A 30°C solamente el 13 y 20% de la actividad lacasa inicial fue medida luego de 24 h de reacción en presencia de 1-HBT 10 o 2,5 mM respectivamente, mientras que la ausencia del cooxidante hizo que la enzima fuera totalmente estable por el mismo período. Respecto del uso biotecnológico que se podría dar a este proceso de detoxificación, cabe señalar que si bien el 1-HBT acelera las reacciones es importante también la inactivación enzimática que provoca sobre la lacasa, por lo tanto esta relación de compromiso entre ambos factores es necesario tenerla en cuenta para aumentar la eficiencia del proceso.

Los medios de cultivo basal mezclado con VMD de los tubos de reacción con y sin el agregado de 1-HBT (2, 10 y 40 µM VMD concentración final en la caja) mostraron no ser tóxicos para *P. chrysosporium* (**Figura 22a**). El hongo presentó una cinética de crecimiento similar a aquella en agar y extracto de malta sin la adición de VMD. Es interesante notar que el fungicida incompletamente decolorado (80%) rindió un compuesto detoxificado para *P. chrysosporium*, además la decoloración del VM remanente por este hongo fue bastante rápida (este dato no se muestra).

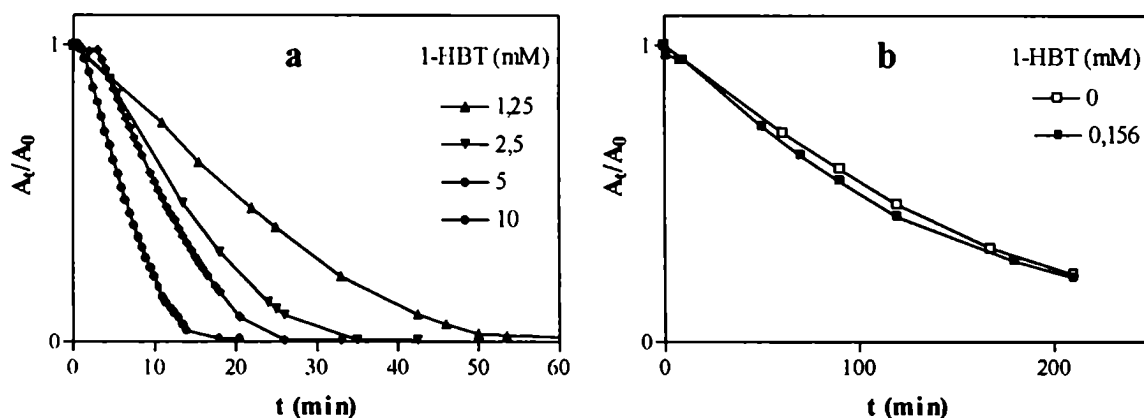


Figura 24 Cinética de decoloración del VM por sobrenadantes de *F. sclerodermeus* con alta actividad lacasa. (a) La presencia de 1-HBT acelera la velocidad de decoloración y depende de la concentración del cooxidante, (b) sin 1-HBT o con concentraciones del orden micromolar, las reacciones transcurren mucho más lentamente.

La toxicidad del VM y el VMD fue estudiada en otros hongos de pudrición blanca (Tabla 13). Los resultados fueron muy similares a los obtenidos con *P. chrysosporium*, excepto para *C. versicolor*, el cual mostró valores similares de retraso de su crecimiento radial en presencia de VM o VMD.

Tabla 13 Efecto del VM y el VMD sobre el crecimiento radial luego de 7 d de cuatro hongos de pudrición blanca. Los valores representan la madia de triplicados independientes, el error fue menor al 5%

	Crec. radial sin VM (cm)	Crec. radial con VM (cm)	Crec. radial con VMD (cm)
<i>C. versicolor</i> f. <i>antarcticus</i>	4	2,2	2,5
<i>P. lindquistii</i>	4	1,4	3,9
<i>S. fissilis</i>	4	0	4
<i>T. extenuata</i>	4	0,8	2,6

A 618 nm el VM exhibió su absorción máxima, sin embargo luego de 100 min de incubación en presencia de 1-HBT (0,16 mM) éste cambió hacia 610 nm. En el caso de la reacción sin el mediador la absorbancia a 618 nm decreció, mientras que fue

observado un aumento a 445 nm. La mezcla de reacción dejada toda la noche produjo un precipitado oscuro el cual podría deberse a reacciones de polimerización del fungicida llevándolo a dímeros u oligómeros (Aktas y Tanyolac 2003, Ruttimann-Johnson y Lamar 1996, Ward et al. 2001). Estos resultados sugieren que al menos dos reacciones estarían llevándose a cabo en el VM y que estas modificaciones rinden en una menor toxicidad en el fungicida para otros hongos de pudrición blanca, los cuales luego pueden degradar los productos de estas reacciones.

El cambio que se da en el máximo de absorbancia (de 618 a 610 nm) en presencia de 1-HBT está de acuerdo con resultados previos donde se propone que este cambio es debido a reacciones de demetilación del N (Cha et al. 2001). En el caso de la reacción sin el cooxidante la absorbancia a 618 nm decreció, mientras que fue observado un incremento a 445 nm. Esto podría deberse a diferencias en el mecanismo de acción de la lacasa en respuesta al cooxidante, así como fue demostrado en la lacasa de *Trametes versicolor* (Bourbonnais et al. 1997). El precipitado formado en los tubos de reacción en presencia o ausencia de 1-HBT pudo haber sido causado por la polimerización de las unidades del colorante. Resultados similares fueron obtenidos con AF en presencia de lacasa o LiP (Ward et al. 2001) y con 2,6 DMF el cual fue oxidado al dímero cerulignona por la lacasa de *Pleurotus eryngii* (Martínez et al. 1996a). Todos los organismos ensayados en esta parte del trabajo fueron hongos de pudrición blanca, por lo tanto son capaces de degradar lignina. Este carácter está relacionado con la habilidad para atacar sustancias aromáticas tales como anilinas, HAPs y BPCs (Field et al. 1993), sin embargo el principal problema es el establecimiento del organismo en los medios contaminados. Una solución para este problema podría ser llevar a cabo relevamientos de organismos no solamente capaces de detoxificar las sustancias sino también de adaptarse a las concentraciones del tóxico tal como se encuentra en los ambientes a tratar. Otra solución a este problema puede ser el uso de enzimas involucradas en el proceso de detoxificación. Con estos experimentos se mostró la capacidad de *F. sclerodermeus* para detoxificar el VM por medio de dos posibles reacciones. El hongo no sólo fue capaz de crecer en presencia del fungicida a altas concentraciones, sino también pudo decolorarlo y detoxificarlo. El VM tratado con sobrenadantes conteniendo alta actividad lacasa con o sin la adición de 1-HBT rindió una sustancia incolora (VMD) la cual no fue tóxica para *P. chrysosporium* y otros hongos de pudrición blanca.

— CONCLUSIONES —

Relevamiento

Como resultado de un relevamiento de 13 cepas locales de hongos causantes de pudrición blanca, *Fomes sclerodermeus* resultó ser el mayor productor de las actividades MnP y lacasa así como también el más eficiente para degradar el colorante polimérico poly-R. En ninguno de los organismos evaluados se detectó actividad LiP.

Medios de cultivo

Se optimizaron las condiciones para la producción de lacasa y MnP en cultivos estáticos con medio sintético. El diseño experimental factorial incompleto de Doehlert se eligió para evaluar el efecto de los compuestos: $MnSO_4$, $CuSO_4$ y asparagina. El diseño factorial permite no solo evaluar el efecto de cada variable por separado sino también las interacciones entre ellas. Los valores de actividad fueron ajustados a una ecuación cuadrática, la cual mostró el significativo efecto que tuvo el cobre sobre la producción de actividad lacasa y el manganeso sobre la actividad MnP.

En fermentación en estado sólido con salvado de trigo o soja como único sustrato, *F. sclerodermeus* produjo altas actividades lacasa (270 y 500 U g⁻¹ respectivamente) y MnP (6,3 y 16,5 U g⁻¹ respectivamente). Compuestos aromáticos, $MnSO_4$ o $CuSO_4$ no incrementaron la producción de ninguna de las actividades.

Entre los compuestos aromáticos ensayados como inductores en medio GA, la vainillina y el ácido ferúlico fueron los que lograron el mayor aumento en la producción de lacasa y MnP. Por otro lado en medio YPG, los compuestos aromáticos tuvieron un efecto nulo sobre ambas actividades. En este medio el mejor inductor resultó el cobre para lacasa y manganeso para MnP.

En medio basado en celulosa cristalina como única fuente de carbono las actividades β -glucosidasa y endoglucasa fueron algo inhibidas cuando se agrega $CuSO_4$ o $MnSO_4$. Se detectó actividad MnP solamente en los medios conteniendo $MnSO_4$ como inductor mientras que la actividad lacasa se expresó de manera constitutiva en todos los medios siendo varias veces mayor cuando se utilizó cobre como inductor. La velocidad de crecimiento en este medio fue bastante más lenta que en aquellos conteniendo glucosa como fuente de carbono y energía, alcanzándose al día 20 el máximo valor de biomasa.

La estabilidad de las enzimas producidas en este medio fue ensayada a 40°C siendo la lacasa la más estable.

Degradación de madera

Madera de álamo atacada durante 6 meses por *F. sclerodermeus* registró una pérdida de peso del 51%. El contenido residual de celulosa y lignina determinado por hidrólisis diferencial fue del 58 y 56% respectivamente. Por otro lado los hidrosolubles aumentaron hasta tres veces debido a los productos de degradación. Cortes a mano alzada revelaron degradación de radios parenquimáticos y adelgazamiento de paredes. En medio sólido basado en aserrín sólo se detectó actividad en álamo mientras que en cedro ambas actividades fueron nulas. El crecimiento en ambos medios siguió una cinética similar.

Caracterización

Las enzimas lacasa y MnP producidas en medio YPG, fueron purificadas hasta homogeneidad electroforética y caracterizadas bioquímicamente. Se encontraron dos isoenzimas de lacasa (Lac I y Lac II) y dos de MnP (MnP I y MnP II). Ambas lacasas con un PM de 67000 y 3% su porcentaje de glicosilación. Las MnP presentaron un PM de 47000, siendo su porcentaje de glicosilación del 4%. El pI de las MnP I y II fue de 3,45 y 3,35 respectivamente, mientras que para las lacasas I y II fue de 3,41 y 3,48 respectivamente. Todas las MnPs y lacasas estudiadas siguieron una cinética típica de Michaelis-Menten. Ambas MnPs mostraron alta afinidad hacia Mn^{2+} , H_2O_2 y reacciones mediadas por Mn sobre 2,6 DMP. Las propiedades catalíticas fueron muy similares entre Lac I y Lac II, ambas lacasas mostraron alta eficiencia y afinidad hacia el ABTS. Los resultados sugieren que la MnP secretada por *F. sclerodermeus* depende de Mn^{2+} para completar su ciclo catalítico, haciéndola muy similar a la producida por *P. chrysosporium*.

Estabilidad de la lacasa

La actividad lacasa producida en salvado de trigo reveló tres bandas en PAGE con patrones de inactivación térmica diferentes. La banda media resultó la más estable lo cual es explicado por la curva descriptiva hallada para el decaimiento de esta actividad.

Entre los estabilizadores probados el CuSO_4 1,25 mM fue el que rindió los mejores resultados, la combinación de CuSO_4 y glicerol 0,2% incrementó aún más la estabilidad de la enzima.

Detoxificación

La actividad lacasa producida en medio definido optimizado para dicha actividad fue utilizada para llevar a cabo ensayos de decoloración y detoxificación del fungicida verde de malaquita. El fungicida fue detoxificado por sobrenadantes del hongo con alta actividad lacasa, como biocontrol se utilizó a *P. chrysosporium* el cual expuso alta sensibilidad al fungicida, mientras que el mismo tóxico degradado por los sobrenadantes mostró una toxicidad nula frente al crecimiento de este hongo. La presencia de 1-HBT aceleró las reacciones de detoxificación. En medio líquido ambos hongos mostraron ser mucho más sensibles pero de todos modos la detoxificación fue evidente. Otros hongos de pudrición blanca mostraron igual respuesta que *P. chrysosporium* hacia la detoxificación del verde de malaquita.

En síntesis:

Se demostró que *F. sclerodermeus* es capaz de producir altas actividades lacasa y MnP. La enzima mayoritaria es la lacasa lo cual resulta interesante debido a que se trata de la enzima con mayores posibilidades para usar en procesos de biorremediación, dado que las peroxidasas necesitan del agregado de H_2O_2 para llevar a cabo tales procesos.

La lacasa secretada por *F. sclerodermeus* es muy estable y puede utilizarse en procesos de degradación y detoxificación.

El medio de cultivo más conveniente para la producción resultó ser aquel basado en salvado, que si bien lleva más tiempo es mucho más barato y no necesita el agregado de inductores, que son generalmente tóxicos.

Parte de los resultados mostrados en esta Tesis dieron lugar a las siguientes publicaciones:

Papinutti, VL y Forchiassin, F. 2000. Enzimas de hongos de pudrición blanca involucradas en la degradación de lignina. Rev. Arg. Microbiol. 32: 83-88.

Papinutti, VL, Diorio, L.A., Forchiassin, F. 2003. Production of laccase and manganese peroxidase by *Fomes sclerodermeus* grown on wheat bran. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 30: 157-160


Papinutti, VL, Diorio, L.A., Forchiassin, F. 2003. Degradación de madera de álamo por *Fomes sclerodermeus*: producción de enzimas lignolíticas en aserrín de álamo y cedro. Rev. Iberoam. Micol. 20: 16-20.

Papinutti, VL, Forchiassin, F. Optimization of manganese peroxidase and laccase production in the South American fungus *Fomes sclerodermeus* (Cke.) Lév. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. (Enviado)

Papinutti, VL, Martínez, MJ. Biochemical characterization of laccase and manganese peroxidase from the white rot fungus *Fomes sclerodermeus*. J. Biotechnol. (Enviado)

Papinutti, VL; Forchiassin, F. Decolorization and detoxification of malachite green by *Fomes sclerodermeus*. Mycologia. (Enviado)

Papinutti, VL, Dimitriu, PA, Forchiassin, F. Stabilization studies of *Fomes sclerodermeus* laccases. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. (Enviado)

- < 



— R E F E R E N C I A S —

- Aktas N, Tanyolac A.** (2003). Reaction conditions for laccase catalyzed polymerization of catechol. *Bioresour Technol* 87: 209-214.
- Aggelis G, Ehaliotis C, Nerud F, Stoychev I, Lyberatos G, Zervakis GI.** (2002). Evaluation of white-rot fungi for detoxification and decolorization of effluents from the green olive debittering process. *Appl Microbiol Biotechnol* 59: 353-360.
- Ahn MY, Dec J, Kim JE, Bollag JM.** (2002). Treatment of 2,4-dichlorophenol polluted soil with free and immobilized laccase. *J Environ Qual* 31: 1509-1515.
- Antorini M, Herpoel-Gimbert I, Choinowski T, Sigoillot JC, Asther M, Winterhalter K, Piontek K.** (2002). Purification, crystallisation and X-ray diffraction study of fully functional laccases from two ligninolytic fungi. *Biochim Biophys Acta* 1594: 109-114.
- Archibald FS.** (1992). A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye Azure B. *Appl Environ Microbiol* 58: 3110-3116.
- Arora DS, Rampal P.** (2002). Laccase production by some *Phlebia* species. *J Basic Microbiol* 42: 295-301.
- Assabgui RA, Reid LM, Hamilton RI, Arnason JT.** (1993). Correlation of kernel(E)-ferulic acid content of maize with resistance to *Fusarium graminearum*. *Phytopathology* 83: 953-949.
- Aymard C, Belarbi A.** (2000). Kinetics of thermal deactivation of enzymes: a simple three parameters phenomenological model can describe the decay of enzyme activity, irrespectively of the mechanism. *Enzyme Microb Technol* 27: 612-618.
- Bajpai P.** (1997). Microbial xylanolytic enzyme system: properties and applications. *Adv Appl Microbiol* 43: 141-194.
- Baldrian P, Gabriel J.** (2002). Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiol Lett* 206: 69-74.
- Baldrian P.** (2003). Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enz. Microb. Technol.* 32: 78-91.
- Banci L, Ciofi-Baffoni S, Tien M.** (1999). Lignin and Mn peroxidase-catalyzed oxidation of phenolic lignin oligomers. *Biochemistry* 38: 3205-3210.
- Banci L, Bartalesi I, Ciofi-Baffoni S, Tien M.** (2003). Unfolding and pH studies on manganese peroxidase: Role of heme and calcium on secondary structure stability. *Biopolymers* 72: 38-47.
- Bao W, Omalley DM, Whetten R, Sederoff RR.** (1993b). A laccase associated with lignification in loblolly pine xylem. *Science* 260: 672-674.
- Bao W, Usha SN, Renghanatan N.** (1993a). Purification and characterization of cellobiose dehydrogenase, a novel hemoflavoenzyme from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Biochem Biophys* 300: 705-713.

- Bao W Fukushima Y, Jensen KAJr, Moen MA, Hammel KE.** (1994). Oxidative degradation of non-phenolic lignin during lipid peroxidation by fungal manganese peroxidase. *FEBS Lett* 354: 297-300.
- Baptista RP, Cabral JMS, Melo EP.** (2000). Trehalose delays the reversible but not the irreversible thermal denaturation of cutinase. *Biotechnol Bioeng* 70: 699-703.
- Barr BK, Hsieh Y-L, Ganem B, Wilson DB.** (1996). Identification of two functionally different classes of exocellulases. *Biochemistry* 35: 586-592.
- Bergbauer M, Eggert C.** (1994). Degradability of chlorine-free bleachery effluent lignins by two fungi: effects on lignin subunit type and on polymer molecular weight. *Can J Microbiol* 40: 192-197.
- Bermek H, Li K, Eriksson KE.** (2002). Studies on mediators of manganese peroxidase for bleaching of wood pulps. *Bioresour Technol* 85: 249-252.
- Bertrand T, Jolivalt C, Briozzo P, Caminade E, Joly N, Madzak C, Mougin C.** (2002b). Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: insights into substrate recognition and correlation with kinetics. *Biochemistry* 41: 7325-7333.
- Bertrand T, Jolivalt C, Caminade E, Joly N, Mougin C, Briozzo P.** (2002a). Purification and preliminary crystallographic study of *Trametes versicolor* laccase in its native form. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58: 319-321.
- Boisset C, Fraschini C, Schülein M, Henrissat B, Chanzy H.** (2000). Imaging the enzymatic digestion of bacterial cellulose ribbons reveals the endo character of the cellobiohydrolase Cel6A from *Humicola insolens* and its mode of synergy with cellobiohydrolase Cel7A. *Appl Environ Microbiol* 66: 1444-1452.
- Bonnarme P, Jeffries TW.** (1990). Mn(II) regulation of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidases from lignin-degrading white rot fungi. *Appl Environ Microbiol* 56: 210-217.
- Boominathan K, Dass SB, Randall TA, Kelley RL, Reddy CA.** (1990). Lignin peroxidase-negative mutant of the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J Bacteriol* 172: 260-265.
- Bourbonnais R, Paice MG, Freiermuth B, Bodie E, Borneman S.** (1997). Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Appl Environ Microbiol* 63: 4627-4632.
- Böckle B, Martínez MJ, Guillén F, Martínez AT.** (1999). Mechanism of peroxidase inactivation in liquid cultures of the ligninolytic fungus *Pleurotus pulmonarius*. *Appl Environ Microbiol* 65: 923-928.
- Bradford MM.** (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.
- Breen A, Singleton FL.** (1999). Fungi in lignocellulose breakdown and biopulping. *Curr Opin Biotechnol* 10: 252-258.
- Brinch DS, Pedersen PB.** (2002a). Toxicological studies on *Polyporus pinsitus* laccase expressed by *Aspergillus oryzae* intended for use in food. *Food Addit Contam* 19: 323-334.

- Brinch DS, Pedersen PB.** (2002b). Toxicological studies on laccase from *Myceliophthora thermophila* expressed in *Aspergillus oryzae*. *Regul Toxicol Pharmacol* 35: 296-307.
- Brown JA, Glenn JK, Gold MH.** (1990). Manganese regulates expression of manganese peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*. *J Bacteriol* 172: 3125-3130.
- Bulter T, Alcalde M, Sieber B, Meinhold P, Schlachtbauer C, Arnold FH.** (2003). Functional expression of a fungal laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by directed evolution. *Appl Environ Microbiol*. 69:987-995.
- Buswell JA, Cai YJ, Chang Y.** (1995). Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. *FEMS Microbiol Lett* 128: 81-88.
- Camarero S, Sarkar S, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ, Martínez AT.** (1999). Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. *J Biol Chem* 274: 10324-10330.
- Campos R, Kandelbauer A, Robra KH, Cavaco-Paulo A, Gubitz GM.** (2001). Indigo degradation with purified laccases from *Trametes hirsuta* and *Sclerotium rolfsii*. *J Biotechnol* 89: 131-139.
- Carbajo JM, Junca H, Terron MC, Gonzalez T, Yague S, Zapico E, Gonzalez AE.** (2002). Tannic acid induces transcription of laccase gene *cglccl* in the white-rot fungus *Corioloropsis gallica*. *Can J Microbiol* 48: 1041-1047.
- Casa R, D'Annibale A, Pieruccetti F, Stazi SR, Giovannozzi SG, Lo CB.** (2003). Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. *Chemosphere* 50: 959-966.
- Castro-Sowinski S, Martínez-Drets G, Okon Y.** (2002). Laccase activity in melanin-producing strains of *Sinorhizobium meliloti*. *FEMS Microbiol Lett* 209: 115-121.
- Cha CJ, Doerge DR, Cerniglia CE.** (2001). Biotransformation of malachite green by the fungus *Cunninghamella elegans*. *Appl Environ Microbiol* 67: 4358-4360.
- Chen SC, Ma D, Ge W, Buswell JA.** (2003). Induction of laccase activity in the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. *FEMS Microbiol Lett* 218: 143-148.
- Chefetz B, Chen Y, Hadar Y.** (1998). Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification. *Appl Environ Microbiol* 64: 3175-3179.
- Claus H, Faber G, König H.** (2002). Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. *Appl Microbiol Biotechnol* 59: 672-678.
- Coughlan MP, Ljungdahl LG.** (1988). Comparative biochemistry of fungal and bacterial cellulolytic enzyme systems. *Biochemistry and genetics of cellulose degradation 43° FEMS symposium* Aubert, Beguin y Millet (Eds) AP NY.
- Collins PJ, Dobson ADW.** (1997). Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Appl Environ Microbiol* 63: 3444-3450.
- Costa SA, Tzanov T, Carneiro AF, Paar A, Gubitz GM, Cavaco-Paulo A.** (2002). Studies of stabilization of native catalase using additives. *Enzyme Microb Technol* 30: 387-391.

- Crestini C, D'Annibale A, Sermanni GG, Saladino R.** (2000). The reactivity of phenolic and non-phenolic residual kraft lignin model compounds with Mn(II)-peroxidase from *Lentinula edodes*. *Bioorg Med Chem* 8: 433-438.
- Crowe JD, Olsson S.** (2001). Induction of laccase activity in *Rhizoctonia solani* by antagonistic *Pseudomonas fluorescens* strains and a range of chemical treatments. *Appl Environ Microbiol* 67 : 2088-2094.
- D'Acunzo F, Galli C, Masci B.** (2002). Oxidation of phenols by laccase-mediator systems. *Eur J Biochem* 269: 5330-5335.
- D'Souza TM, Merritt CS, Reddy CA.** (1999). Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Appl Environ Microbiol* 65: 5307-5313.
- Das N, Chakraborty TK, Mukherjee M.** (2001). Purification and characterization of a growth-regulating laccase from *Pleurotus florida*. *J Basic Microbiol* 41: 261-267.
- Datta A, Bettermann A, Kirk TK.** (1991). Identification of a specific manganese peroxidase among ligninolytic enzymes secreted by *Phanerochaete chrysosporium* during wood decay. *Appl Environ Microbiol* 57: 1453-1460.
- Davidson RW, Campbell WA, Blaisdell DJ.** (1938). Differentiation of wood-decaying fungi by their reactions on gallic or tannic acid medium. *Journal of Agricultural Research. J Agric Res* 57: 683-695.
- de Jong E, Field JA, de Bont JA.** (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 la Rubia T, Ruiz E, Pérez J, Martínez J.** (2002). Properties of a laccase produced by *Phanerochaete flavido-alba* induced by vanillin. *Arch Microbiol* 179: 70-73.
- Dedeyan B, Klonowska A, Tagger S, Tron T, Iacazio G, Gil G, Le Petit J.** (2000). Biochemical and molecular characterization of laccase from *Marasmius quercophilus*. *Appl Environ Microbiol* 66: 925-929.
- Dhawan S, Kuhad RC.** (2002). Effect of amino acids and vitamins on laccase production by the bird's nest fungus *Cyathus bulleri*. *Bioresour Technol* 84: 35-38.
- Dhawan S, Lal R, Kuhad RC.** (2003). Ethidium bromide stimulated hyper laccase production from bird's nest fungus *Cyathus bulleri*. *Lett Appl Microbiol* 36: 64-67.
- Dill I, Kraepelin G.** (1986). Palo podrido: model for extensive delignification of wood by *Ganoderma applanatum*. *Appl Environ Microbiol* 52: 1312.
- Dittmer JK, Patel NJ, Dhawale SW, Dhawale SS.** (1997). Production of multiple laccase isoforms by *Phanerochaete chrysosporium* under nutrient sufficiency. *FEMS Microbiol Lett* 149: 65-70.
- Doehlert DH.** (1970). Uniforms shell designs. *Applied Statistics* 19: 231-239.
- Du P, Collins JR, Loew GH.** (1992). Homology modeling of a heme protein, lignin peroxidase, from the crystal structure of cytochrome c peroxidase. *Protein Eng* 5: 679-691.

- Ducros V, Brzozowski AM, Wilson KS, Ostergaard P, Schneider P, Svendson A, Davies GJ.** (2001). Structure of the laccase from *Coprinus cinereus* at 1.68 Å resolution: evidence for different 'type 2 Cu-depleted' isoforms. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57: 333-336.
- Eggert C, Temp U, Eriksson KEL.** (1997). Laccase is essential for lignin degradation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *FEBS Lett* 407: 89-92.
- Eriksson KE, Habu N, Samejima M.** (1993). Recent advances in fungal cellobiose oxidoreductase. *J Ferment Bioeng* 75: 399-404.
- Fenice M, Giovannozzi SG, Federici F, D'Annibale A.** (2003). Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media. *J Biotechnol* 100: 77-85.
- Field JA, de Jong E, Feijoo Costa G, de Bont JA.** (1993). Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Trends Biotechnol* 11: 44-49.
- Fu SY, Yu HS, Buswell JA.** (1997). Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Pleurotus sajor-caju*. *FEMS Microbiol Lett* 147: 133-137.
- Galhaup C, Goller S, Peterbauer CK, Strauss J, Haltrich D.** (2002b). Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiology* 148: 2159-2169.
- Galhaup C, Wagner H, Hinterstoisser B, Haltrich D.** (2002a). Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme Microb Technol* 30: 529-536.
- Galliano H, Gas G, Seris JL, Boudet AM.** (1991). Lignin degradation by *Rigidoporus lignosus* involves synergistic action of two oxidizing enzymes: Mn peroxidase and laccase. *Enzyme Microb Technol* 13: 478-482.
- Gelpke MD, Youngs HL, Gold MH.** (2000). Role of arginine 177 in the MnII binding site of manganese peroxidase. Studies with R177D, R177E, R177N, and R177Q mutants. *Eur J Biochem* 267: 7038-7045.
- George SJ, Kvaratskhelia M, Dilworth MJ, Thorneley RN.** (1999). Reversible alkaline inactivation of lignin peroxidase involves the release of both the distal and proximal site calcium ions and bishistidine co-ordination of the haem. *Biochem J* 344: 237-244.
- Giardina P, Palmieri G, Scalon A, Fontanella B, Faraco V, Cennamo G, Sannia G.** (1999). Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochem J* 341: 655-663.
- Gielkens, M.M. E. Dekkers, J. Visser, LH de Graff.** (1999). Two cellobiohydrolase-encoding genes from *Aspergillus niger* require D-xylose and the xylanolytic transcriptional activator XlnR for their expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4340-4345.
- Gill PK, Arora DS.** (2003). Effect of culture conditions on manganese peroxidase production and activity by some white rot fungi. *J Ind Microbiol Biotechnol* 30: 28-33.
- Glenn JK, Akileswaran L, Gold MH.** (1986). Mn(II) oxidation is the principal function of the extracellular Mn- peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Biochem Biophys* 251: 688-696.

- Glenn JK, Gold MH. (1985). Purification and characterisation of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Biochem Biophys* 242: 329-341.
- Glenn JK, Morgan MA, Mayfield MB, Kuwahara M, Gold MH. (1983). An extracellular H₂O₂ -requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem Biophys Res Commun* 114: 1077-1083.
- Godfrey BJ, Mayfield MB, Brown JA, Gold MH. (1990). Characterization of a gene encoding a manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Gene* 93: 119-124.
- Gold MH, Alic M. (1993). Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiol Rev* 57: 605-622.
- Gold MH, Wariishi H, Valli K. (1989). Extracellular peroxidases involved in lignin degradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. In: *Biocatalysis in Agricultural Biotechnology*. 127-140.
- Gold MH, Glenn JK, Alic M. (1988). Use of polymeric dyes in lignin biodegradation assays. *Methods Enzymol* 161: 74-78.
- Grabski AC, Grimek HJ, Burgess RR. (1998). Immobilization of manganese peroxidase from *Lentinula edodes* and its biocatalytic generation of Mn(III)-chelate as a chemical oxidant of chlorophenols. *Biotechnol Bioeng* 60: 204-215.
- Grabski AC, Rasmussen JK, Coleman PL, Burgess RR. (1996). Immobilization of manganese peroxidase from *Lentinula edodes* on alkylaminated Emphaze AB 1 polymer for generation of Mn³⁺ as an oxidizing agent. *Appl Biochem Biotechnol* 60: 1-17.
- Haars A, Hüttermann A. (1983). Laccase induction in the white-rot fungus *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. (*Fomes annosus* Fr. Cooke). *Arch Microbiol* 134: 309-313.
- Hakulinen N, Kiiskinen LL, Kruus K, Saloheimo M, Paananen A, Koivula A, Rouvinen J. (2002). Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site. *Nat Struct Biol* 9: 601-605.
- Harvey PJ, Palmer JM. (1990). Oxidation of phenolic compounds by ligninase. *J Biotechnol* 13: 169-179.
- Hatakka A. (1994). Lignin modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol Reviews* 13: 125-135.
- Hatvani N, Kredics L, Antal Z, Mecs I. (2002). Changes in activity of extracellular enzymes in dual cultures of *Lentinula edodes* and mycoparasitic *Trichoderma* strains. *J Appl Microbiol* 92: 415-423.
- Herpoel I, Asther M, Sigoillot JC. (1999). Design and scale up of a process for manganese peroxidase production using the hypersecretory strain *Phanerochaete chrysosporium* I-1512. *Biotechnol Bioeng* 65: 468-473.
- Hess J, Leitner C, Galhaup C, Kulbe KD, Hinterstoisser B, Steinwender M, Haltrich D. (2002). Enhanced formation of extracellular laccase activity by the white-rot fungus *Trametes multicolor*. *Appl Biochem Biotechnol* 98-100: 229-241.

- Hilden L, Johansson G, Pettersson G, Li J, Ljungquist P, Henriksson G.** (2000). Do the extracellular enzymes cellobiose dehydrogenase and manganese peroxidase form a pathway in lignin biodegradation? *FEBS Lett* 477: 79-83.
- Hirano T, Honda Y, Watanabe T, Kuwahara M.** (2000). Degradation of bisphenol A by the lignin-degrading enzyme, manganese peroxidase, produced by the white-rot basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 64: 1958-1962.
- Hodgson J, Rho D, Guiot SR, Ampleman G, Thiboutot S, Hawari J.** (2000). Tween 80 enhanced TNT mineralization by *Phanerochaete chrysosporium*. *Can J Microbiol* 46: 110-118.
- Hofrichter M.** (2002). Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme Microb Technol* 30: 454-466.
- Hofrichter M, Vares T, Kalsi M, Galkin S, Scheibner K, Fritsche W, Hatakka A.** (1999). Production of manganese peroxidase and organic acids and mineralization of ¹⁴C-labelled lignin (¹⁴C-DHP) during solid-state fermentation of wheat straw with the white rot fungus *Nematoloma frowardii*. *Appl Environ Microbiol* 65: 1864-1870.
- Holker U, Dohse J, Hofer M.** (2002). Extracellular laccases in ascomycetes *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma harzianum*. *Folia Microbiol (Praha)* 47: 423-427.
- Hong F, Meinander NQ, Jonsson LJ.** (2002). Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng* 79: 438-449.
- Ishikawa H, Schubert WJ, Nord FF.** (1963). The degradation by *Polyporus versicolor* and *Fomes fomentarius* of aromatic compounds structurally related to softwood lignin. *Arch Biochem Biophys* 100: 140-149.
- Iwahara K, Honda Y, Watanabe T, Kuwahara M.** (2000). Polymerization of guaiacol by lignin-degrading manganese peroxidase from *Bjerkandera adusta* in aqueous organic solvents. *Appl Microbiol Biotechnol* 54: 104-111.
- Jarosz-Wilkolazka A, Malarczyk E, Pirszel J, Skowronski T, Leonowicz A.** (2002). Uptake of cadmium ions in white-rot fungus *Trametes versicolor*: effect of Cd(II) ions on the activity of laccase. *Cell Biol Int* 26: 605-613.
- Johansson M, Denekamp M, Asiegbu FO.** (1999). Production and isozyme pattern of extracellular laccase in the S and P intersterility groups of the root pathogen *Heterobasidion annosum*. *Mycol Res* 103: 365-371.
- Johansson T, Nyman PO.** (1993). Isozymes of lignin peroxidase and manganese(II) peroxidase from the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*. I. Isolation of enzyme forms and characterization of physical and catalytic properties. *Arch Biochem Biophys* 300: 49-56.
- Johansson T, Nyman PO, Cullen D.** (2002). Differential regulation of *mnp2*, a new manganese peroxidase-encoding gene from the ligninolytic fungus *Trametes versicolor* PRL 572. *Appl Environ Microbiol* 68: 2077-2080.
- Johansson T, Welinder KG, Nyman PO.** (1993). Isozymes of lignin peroxidase and manganese(II) peroxidase from the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*. II. Partial sequences, peptide maps, and amino acid and carbohydrate compositions. *Arch Biochem Biophys* 300: 57-62.

- Johjima T, Itoh N, Kabuto M, Tokimura F, Nakagawa T, Wariishi H, Tanaka H.** (1999). Direct interaction of lignin and lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 1989-1994.
- Joseleau JP, Ruel K.** (1994). Wood polysaccharides and their degradation by fungi. En: Host wall alterations by parasitic fungi. Petrini, Ouelet (eds). APS Press, Minnesota.
- Kahraman SS, Gurdal IH.** (2002). Effect of synthetic and natural culture media on laccase production by white rot fungi. *Bioresour Technol* 82: 215-217.
- Kanunfre CC, Zancan GT.** (1998). Physiology of exolaccase production by *Telephora terrestris*. *FEMS Microbiol Lett* 16: 151.
- Kapich A, Hofrichter M, Vares T, Hatakka A.** (1999). Coupling of manganese peroxidase-mediated lipid peroxidation with destruction of nonphenolic lignin model compounds and ¹⁴C-labeled lignins. *Biochem Biophys Res Commun* 259: 212-219.
- Karlsson S, Holmbom B, Spetz P, Mustranta A, Buchert J.** (2001). Reactivity of *Trametes* laccases with fatty and resin acids. *Appl Microbiol Biotechnol* 55: 317-320.
- Kawai S, Nakagawa M, Ohashi H.** (2002). Degradation mechanisms of a non-phenolic β -O-4 lignin model dimer by *Trametes versicolor* laccase in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. *Enzyme Microb Technol* 30: 482-489.
- Kawai R, Yoshida M, Tani T, Igarashi K, Ohira T, Nagasawa H, Samejima M.** (2003). Production and characterization of recombinant *Phanerochaete chrysosporium* β -glucosidase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67: 1-7.
- Keharia H, Madamwar D.** (2002). Transformation of textile dyes by white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Appl Biochem Biotechnol* 102-103: 99-108.
- Kersten PJ, Kalyanarman B, Hammel KE, Reinhammar B, Kirk TK.** (1990). Comparison of lignin peroxidase, horseadish peroxidase and laccase in the oxidation of methoxybenzenes. *Biochem J* 268: 475-480.
- Khindaria A, Barr DP, Aust SD.** (1995). Lignin peroxidases can also oxidize manganese. *Biochemistry* 34: 7773-7779.
- Kirk TK, Cullen D.** (1998). Enzymology and molecular genetics of wood degradation by wood-degrading fungi. 273-307.
- Kirk TK, Farrell RL.** (1987). Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Annu Rev Microbiol* 41: 465-505.
- Klonowska A, Le Petit J, Tron T.** (2001). Enhancement of minor laccases production in the basidiomycete *Marasmius quercophilus* C30. *FEMS Microbiol Lett* 200: 25-30.
- Ko EM, Leem YE, Choi HT.** (2001). Purification and characterization of laccase isozymes from the white- rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 57: 98-102.
- Koduri RS, Tien M.** (1994). Kinetic analysis of lignin peroxidase-explanation for the mediation phenomenon by veratryl alcohol. *Biochemistry* 33: 4225-4230.
- Kondo R, Harazono K, Sakai K.** (1994). Bleaching of hardwood kraft pulp with manganese peroxidase from *Phanerochaete sordida* YK-624. *Appl Environ Microbiol* 60: 4359-4363.

- Koroleva OV, Stepanova EV, Binukov VI, Timofeev VP, Pfeil W.** (2001). Temperature-induced changes in copper centers and protein conformation of two fungal laccases from *Coriolus hirsutus* and *Coriolus zonatus*. *Biochim Biophys Acta* 1547: 397-407.
- Kumaran S, Sastry CA, Vikineswary S.** (1997). Laccase, cellulase and xylanase activities during growth of *Pleurotus sajor-caju* on sago hampas. *World J Microb Biotech* 13: 43-49.
- Kunz A, Reginatto V, Duran N.** (2001). Combined treatment of textile effluent using the sequence *Phanerochaete chrysosporium*-ozone. *Chemosphere* 44: 281-287.
- Kusters-van Someren M, Kishi K, Lundell T, Gold MH.** (1995). The manganese binding site of manganese peroxidase: characterization of an Asp179Asn site-directed mutant protein. *Biochemistry* 34: 10620-10627.
- Leatham GF.** (1985). Extracellular enzymes produced by the cultivated mushroom *Lentinus edodes* during degradation of lignocellulosic medium. *Appl Environ Microbiol* 50: 859-867.
- Leitner C, Hess J, Galhaup C, Ludwig R, Nidetzky B, Kulbe KD, Haltrich D.** (2002). Purification and characterization of a laccase from the white-rot fungus *Trametes multicolor*. *Appl Biochem Biotechnol* 98-100: 497-507.
- Levin L, Castro M.** (1998). Anatomical study of the decay caused by the white-rot fungus *Trametes trogii* (Aphyllphoralles) in wood of *Salix* and *Populus*. *IAWA Journal* 19: 169-180.
- Levin L, Forchiassin F.** (1997). Efecto de las condiciones de cultivo sobre la producción de celulasas por *Trametes trogii*. *Rev Arg Microbiol* 29: 16-23.
- Levin L, Forchiassin F.** (2001). Ligninolytic enzymes of the white rot basidiomycete *Trametes trogii*. *Acta Biotechnol* 21: 179-186.
- Levin L, Forchiassin F, Ramos AM.** (2002). Copper induction of lignin modifying enzymes in the white-rot fungus *Trametes trogii*. *Mycologia* 94: 377-383.
- Leontievsky AA, Myasoedova NM, Golovleva LA, Sedarati M, Evans CS.** (2002). Adaptation of the white-rot basidiomycete *Panus tigrinus* for transformation of high concentrations of chlorophenols. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 599-604.
- Li D, Alic M, Brown JA, Gold MH.** (1995). Regulation of manganese peroxidase gene transcription by hydrogen peroxide, chemical stress, and molecular oxygen. *Appl Environ Microbiol* 61: 341-345.
- Li D, Alic M, Gold MH.** (1994). Nitrogen regulation of lignin peroxidase gene transcription. *Appl Environ Microbiol* 60: 3447-3449.
- Li D, Li N, Ma B, Mayfield MB, Gold MH.** (1999). Characterization of genes encoding two manganese peroxidases from the lignin-degrading fungus *Dichomitus squalens*(1). *Biochim Biophys Acta* 1434: 356-364.
- Li D, Youngs HL, Gold MH.** (2001). Heterologous expression of a thermostable manganese peroxidase from *Dichomitus squalens* in *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Biochem Biophys* 385: 348-356.
- Li L, Steffens JC.** (2002). Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta* 215: 239-247.

- Liu L, Tewari RP, Williamson PR.** (1999). Laccase protects *Cryptococcus neoformans* from antifungal activity of alveolar macrophages. *Infect Immun* 67: 6034-6039.
- Lo SC, Ho YS, Buswell JA.** (2001). Effect of phenolic monomers on the production of laccases by the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*, and partial characterization of a major laccase component. *Mycologia* 93: 413-421.
- Lomascolo A, Record E, Herpoel-Gimbert I, Delattre M, Roberts SA, Georis J, Dauvrin T, Sigoillot JC, Asther M.** (2003). Overproduction of laccase by a monokaryotic strain of *Pycnoporus cinnabarinus* using ethanol as inducer. *J Appl Microbiol* 94: 624.
- Lorenzo M, Moldes D, Rodríguez CS, Sanroman A.** (2002). Improving laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of *Trametes versicolor*. *Bioresour Technol* 82: 109-113.
- Lozano P, Combes D, Iborra JL.** (1994). Effects of polyols on α -chymotrypsin thermostability a mechanistic analysis of the enzyme stabilization. *J Biotechnol* 35: 9-18.
- Lyons JJ, Newell SY, Buchan A, Moran MA.** (2003). Diversity of Ascomycete laccase gene sequences in a Southeastern US salt marsh. *Microb Ecol* 42: 25-30.
- Machuca A, Ferraz A.** (2001). Hydrolytic and oxidative enzymes produced by white- and brown-rot fungi during *Eucalyptus grandis* decay in solid medium. *Enzyme Microb Technol* 29: 386-391.
- Magnelli P.** (1998). Regulación de la producción del sistema celulolítico por *Saccobolus saccoboloides*. Tesis doctoral.
- Maltseva OV, Niku-Paavola ML, Leontievsky AA, Myasoedova NM, Golovleva LA.** (1991). Ligninolytic enzymes of the white rot fungus *Panus tigrinus*. *Biotechnol Appl Biochem* 13: 291-302.
- Markham P, Bazin MJ.** (1991). Decomposition of cellulose by fungi. En: Handbook of Applied Mycology. Arora, Rai, Mujerki, Knudsen (eds). M Dekker Inc, NY.
- Marques De Souza CG, Zilly A, Peralta RM.** (2002). Production of laccase as the sole phenoloxidase by a Brazilian strain of *Pleurotus pulmonarius* in solid state fermentation. *J Basic Microbiol* 42: 83-90.
- Martínez MJ, Böckle B, Camarero S, Guillén F, Martínez AT.** (1996b). MnP isoenzymes produced by two *Pleurotus* species in liquid culture and during wheat straw solid-state fermentation. En: Jeffries, T W y Viikari, L (Eds) Enzymes for Pulp and Paper Processing ACS, Washington, pp 183-196
- Martínez MJ, Ruiz-Dueñas FJ, Guillén F, Martínez AT.** (1996a). Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *Eur J Biochem* 237: 424-432.
- Mata G, Savoie JM.** (1998). Extracellular enzyme activities in six *Lentinula edodes* strains during cultivation in wheat straw. *World J Microb Biotech* 14: 513-519.
- Marui J, N Kitamoto, M Kato, T Kobayashi, N Tsukagoshi.** (2002). Transcriptional activator, AoXlnR, mediates cellulose-inductive expression of the xylanolytic and cellulolytic genes in *Aspergillus oryzae*. *FEMS Letters* 528: 279-282.

- Mayer AM, Staples RC.** (2002). Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60: 551-565.
- Mayfield MB, Godfrey BJ, Gold MH.** (1994). Characterization of the *mnp2* gene encoding manganese peroxidase isozyme 2 from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Gene* 142: 231-235.
- McDougall GJ.** (2001). Cell-wall proteins from Sitka spruce xylem are selectively insolubilised during formation of dehydrogenation polymers of coniferyl alcohol. *Phytochemistry* 57: 157-163.
- Messner R, Kubicek CP.** (1991). Carbon source control of cellobiohydrolase I and II by *Trichoderma reesei*. *Appl Environ Microbiol* 57: 630-635.
- Mester T, de Jong E, Field JA.** (1995). Manganese regulation of veratryl alcohol in white rot fungi and its indirect effect on lignin peroxidase. *Appl Environ Microbiol* 61: 1881-1887.
- Mester T, Field JA.** (1997). Optimization of manganese peroxidase production by the white rot fungus *Bjerkandera sp* strain BOS55. *FEMS Microbiol Lett* 155: 161-168.
- Mester T, Field JA.** (1998). Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera* species strain BOS55 in the absence of manganese. *J Biol Chem* 273: 15412-15417.
- Mielgo I, Moreira MT, Feijoo G, Lema JM.** (2001). A packed-bed fungal bioreactor for the continuous decolourisation of azo-dyes (Orange II). *J Biotechnol* 89: 99-106.
- Min KL, Kim YH, Kim YW, Jung HS, Hah YC.** (2001). Characterization of a novel laccase produced by the wood-rotting fungus *Phellinus ribis*. *Arch Biochem Biophys* 392: 279-286.
- Muñoz C, Guillén F, Martínez AT, Martínez MJ.** (1997). Induction and characterization of laccase in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Curr Microbiol* 34: 1-5.
- Mylonakis E, Ausubel FM, Perfect JR, Heitman J, Calderwood SB.** (2002). Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15675-15680.
- Nagai M, Sato T, Watanabe H, Saito K, Kawata M, Enei H.** (2002). Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes*, and decolorization of chemically different dyes. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 327-335.
- Nelson NJ.** (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J Biochem* 153: 375-380.
- Nie G, Reading NS, Aust SD.** (1999). Relative stability of recombinant versus native peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Biochem Biophys* 365: 328-334.
- Nidetzky B, Steiner W, Hayn M, Claeysens M.** (1994). Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: a new model for synergistic interaction. *Biochem J* 298: 705-710.
- Ohga S, Royse DJ.** (2001). Transcriptional regulation of laccase and cellulase genes during growth and fruiting of *Lentinula edodes* on supplemented sawdust. *FEMS Microbiol Lett* 201: 111-115.

- Palma C, Martínez AT, Lema JM, Martínez MJ.** (2000). Different fungal manganese-oxidizing peroxidases: a comparison between *Bjerkandera sp* and *Phanerochaete chrysosporium*. *J Biotechnol* 77: 235-245.
- Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Fontanella B, Sannia G.** (2000). Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol* 66: 920-924.
- Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Scaloni A, Capasso A, Sannia G.** (1997). A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *J Biol Chem* 272: 31301-31307.
- Paszczynski A, Crawford DL.** (1991). Degradation of azo compounds by ligninase from *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of veratryl alcohol. *Biochem Biophys Res Commun* 178: 1056-1063.
- Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Scaloni A, Capasso A, Sannia G.** (1997). A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *J Biol Chem* 272: 31301-31307.
- Papinutti VL, Forchiassin F.** (2000). Enzimas de hongos de pudrición blanca involucradas en la degradación de lignina. *Rev Arg Microbiol* 32: 83-88.
- Papinutti VL, Forchiassin F, Levin L.** (2001). Manganese peroxidase and laccase activities in *Trichoderma sclerotiforme*. *Fourth Latin American Biodeterioration and Biodegradation Symposium Buenos Aires*
- Pease EA, Tien M.** (1992). Heterogeneity and regulation of manganese peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. *J Bacteriol* 174: 3532-3540.
- Peláez F, Martínez MJ, Martínez AT.** (1995). Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. *Mycol Res* 99: 37-42.
- Pérez J, Jeffries TW.** (1992). Roles of manganese and organic acid chelators in regulating lignin degradation and biosynthesis of peroxidases by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 58: 2402-2409.
- Pérez J, Jeffries TW.** (1993). Role of organic acid chelators in manganese regulation of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Biochem Biotechnol* 39-40: 227-238.
- Pickard MA, Roman R, Tinoco R, Vazquez-Duhalt R.** (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Coriolopsis gallica* UAMH 8260 laccase. *Appl Environ Microbiol* 65: 3805-3809.
- Plassard CS, Mousain DG, Salsac LE.** (1982). Estimation of mycelial growth of basidiomycetes by means of chitin determination. *Phytochemistry* 21: 345-348.
- Pointing SB.** (2001). Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 57: 20-33.
- Pointing SB, Jones EBG, Vrijmoed LLP.** (2000). Optimization of laccase production by *Pycnoporus sanguineus* in submerged liquid cultures. *Mycologia* 92: 139-144.
- Pribnow D, Mayfield MB, Nipper VJ, Brown JA, Gold MH.** (1989). Characterization of a cDNA encoding a manganese peroxidase, from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J Biol Chem* 264: 5036-5040.

- Puls J, Schuseil J.** (1993). Chemistry of hemicellulose: relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. En: Hemicellulose and hemicellulases. Coughlan and Hazlewood (eds). Portland Press, London.
- Raghukumar C, D'Souza TM, Thorn RG, Reddy CA.** (1999). Lignin-modifying enzymes of *Flavodon flavus*, a basidiomycete isolated from a coastal marine environment. *Appl Environ Microbiol* 65: 2103-2111.
- Ragusa S, Cambria MT, Pierfederici F, Scire A, Bertoli E, Tanfani F, Cambria A.** (2002). Structure-activity relationship on fungal laccase from *Rigidoporus lignosus*: a Fourier-transform infrared spectroscopic study. *Biochim Biophys Acta* 1601: 155-162.
- Rajakumar S, Gaskell J, Cullen D, Lobos S, Karahanian E, Vicuña R.** (1996). Lip-like genes in *Phanerochaete sordida* and *Ceriporiopsis subvermispora*, white rot fungi with no detectable lignin peroxidase activity. *Appl Environ Microbiol* 62: 2660-2663.
- Reading NS, Aust SD.** (2000). Engineering a disulfide bond in recombinant manganese peroxidase results in increased thermostability. *Biotechnol Prog* 16: 326-333.
- Record E, Punt PJ, Chamkha M, Labat M, van den Hondel CA, Asther M.** (2002). Expression of the *Pycnoporus cinnabarinus* laccase gene in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme. *Eur J Biochem* 269: 602-609.
- Reddy CA, D'Souza TM.** (1994). Physiology and molecular biology of the lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol Rev* 13: 137-152.
- Reddy GV, Gold MH.** (2000). Degradation of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: intermediates and reactions involved. *Microbiology* 146: 405-413.
- Reddy GV, Sridhar M, Gold MH.** (2003). Cleavage of nonphenolic beta-1 diarylpropane lignin model dimers by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Eur J Biochem* 270: 284-292.
- Rehman AU, Thurston CF.** (1992). Purification of laccase-I from *Armillaria mellea*. *J Gen Microbiol* 138: 1251-1257.
- Reid ID, Paice MG.** (1998). Effects of manganese peroxidase on residual lignin of softwood kraft pulp. *Appl Environ Microbiol* 64: 2273-2274.
- Reinhammar B, Malmstrom RG.** (1981). "Blue" copper-containing oxidases. 109-149.
- Richardson A, Duncan J, McDougall GJ.** (2000). Oxidase activity in lignifying xylem of a taxonomically diverse range of trees: identification of a conifer laccase. *Tree Physiol* 20: 1039-1047.
- Robinson T, Chandran B, Nigam P.** (2001). Studies on the decolourisation of an artificial textile-effluent by white-rot fungi in N-rich and N-limited media. *Appl Microbiol Biotechnol* 57: 810-813.
- Rodríguez E, Pickard MA, Vazquez-Duhalt R.** (1999). Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. *Curr Microbiol* 38: 27-32.
- Rosazza JP, Huang Z, Dostal L, Volm T, Rousseau B.** (1995). Biocatalysis of ferulic acid, an abundant naturally occurring aromatic chemical. *J Ind Microbiol* 15: 457-471.

- Roy BP, Paice MG, Archibald FS, Misra SK, Misiak LE.** (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.
- Ruttimann-Johnson C, Cullen D, Lamar RT.** (1994). Manganese peroxidases of the white rot fungus *Phanerochaete sordida*. *Appl Environ Microbiol* 60: 599-605.
- Ruttimann-Johnson C, Lamar RT.** (1996). Polymerization of pentachlorophenol and ferulic acid by fungal extracellular lignin-degrading enzymes. *Appl Environ Microbiol* 62: 3890-3893.
- Sachlehner A, Nidetzky B, Kulbe KD, Haltrich D.** (1998). Induction of mannanase, xylanase, and endoglucanase activities in *Sclerotium rolfsii*. *Appl Environ Microbiol* 64: 594-600.
- Sarkanen KV, Hergert HL.** (1971). Classification and distribution, in lignins: Occurrence, Formation, Structure and reactions. Sarkanen, KV, Ludwig, CH eds., Wiley-Interscience, New York.
- Sasaki T, Kajino T, Li B, Sugiyama H, Takahashi H.** (2001). New pulp biobleaching system involving manganese peroxidase immobilized in a silica support with controlled pore sizes. *Appl Environ Microbiol* 67: 2208-2212.
- Scheel T, Hofer M, Ludwig S, Holker U.** (2000). Differential expression of manganese peroxidase and laccase in white-rot fungi in the presence of manganese or aromatic compounds. *Appl Microbiol Biotechnol* 54: 686-691.
- Scherer M, Fisher R.** (1998). Purification and characterization of laccase II of *Aspergillus niger*. *Arch Microbiol* 179: 78-84.
- Schomburg D, Stephan D.** (1994). Enzyme Handbook Vol. 8 Springer: Berlin.
- Sjöström, E.** (1993). Wood chemistry. Fundamentals and applications. Academic press, NY.
- Smirnov SA, Koroleva OV, Gavrilova VP, Belova AB, Klyachko NL.** (2001). Laccases from Basidiomycetes: physicochemical characteristics and substrate specificity towards methoxyphenolic compounds. *Biochemistry (Mosc)* 66: 774-779.
- Soares GM, Costa-Ferreira M, de Amorim MT.** (2001b). Decolorization of an anthraquinone-type dye using a laccase formulation. *Bioresour Technol* 79: 171-177.
- Soares GM, de Amorim MT, Costa-Ferreira M.** (2001a). Use of laccase together with redox mediators to decolourize Remazol Brilliant Blue R. *J Biotechnol* 89: 123-129.
- Soden DM, Dobson AD.** (2001). Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. *Microbiology* 147: 1755-1763.
- Soden DM, O'Callaghan J, Dobson AD.** (2002). Molecular cloning of a laccase isozyme gene from *Pleurotus sajor-caju* and expression in the heterologous *Pichia pastoris* host. *Microbiology* 148: 4003-4014.
- Sollewijn G, Moenne-Loccoz P, Gold MH.** (1999). Arginine 177 is involved in Mn(II) binding by manganese peroxidase. *Biochemistry* 38: 11482-11489.
- Somogyi M.** (1945). A new reagent for the determinations of sugars. *J Biol Chem* 160: 61-73.

- Srebotnik E, Jensen KA, Hammel KE. (1994). Fungal degradation of recalcitrant non phenolic lignin structures without lignin peroxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 : 12794-12797.
- Srisodsuk M, Lethioi Linder M, Margolles CE, Reinikainen T, Teeri TT. (1997). *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I with an endoglucanase-binding domain: action on bacterial microcrystalline cellulose. *J Biotechnol* 57: 49-57.
- Srisodsuk M, Reinikainen T, Penttila M, Teeri TT. (1993). Role of the interdomain linker peptide of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I in its interaction with crystalline cellulose. *J Biol Chem* 268: 20756-20761.
- Stewart P, Cullen D. (1999). Organization and differential regulation of a cluster of lignin peroxidase genes of *Phanerochaete chrysosporium*. *J Bacteriol* 181: 3427-3432.
- Stewart P, Whitwam RE, Kersten PJ, Cullen D, Tien M. (1996). Efficient expression of a *Phanerochaete chrysosporium* manganese peroxidase gene in *Aspergillus oryzae*. *Appl Environ Microbiol* 62: 860-864.
- Strobel RJ y Sullivan GR. (1999). Experimental design for improvement of fermentations. En: Manual of industrial microbiology and biotechnology (Demain AL y Davies JE editores) pp. 80-90. American Society for Microbiology. Washington
- Sugimoto HH, Barbosa AM, Dekker RF, Castro-Gomez RJ. (2001). Veratryl alcohol stimulates fruiting body formation in the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiol Lett* 194: 235-238.
- Sundaramoorthy M, Kishi K, Gold MH, Poulos TL. (1994). The crystal structure of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.06-Å resolution. *J Biol Chem* 269: 32759-32767.
- Tappi methods. (1983). Acid insoluble lignin in wood and pulp. T222 om-83
- Tekere M, Mswaka AY, Zvauya R, Read JS. (2001b). Growth, dye degradation and ligninolytic activity studies on Zimbabwean white rot fungi. *Enzyme Microb Technol* 28: 420-426.
- Tekere M, Zvauya R, Read JS. (2001a). Ligninolytic enzyme production in selected subtropical white rot fungi under different culture conditions. *J Basic Microbiol* 41: 115-129.
- Tello M, Corsini G, Larrondo LF, Salas L, Lobos S, Vicuña R. (2000). Characterization of three new manganese peroxidase genes from the ligninolytic basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Biochim Biophys Acta* 1490: 137-144.
- ten Have R, Hartmans S, Teunissen PJ, Field JA. (1998). Purification and characterization of two lignin peroxidase isozymes produced by *Bjerkandera sp.* strain BOS55. *FEBS Lett* 422: 391-394.
- Thiele S, Fernandes E, Bollag JM. (2002). Enzymatic transformation and binding of labeled 2,4,6-trinitrotoluene to humic substances during an anaerobic/aerobic incubation. *J Environ Qual* 31: 437-444.
- Tien M, Kirk TK. (1983). Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Science* 221: 661-663.

- Timofeevski SL, Nie G, Reading NS, Aust SD.** (1999). Addition of veratryl alcohol oxidase activity to manganese peroxidase by site-directed mutagenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 256: 500-504.
- Timofeevski SL, Nie G, Reading NS, Aust SD.** (2000). Substrate specificity of lignin peroxidase and a S168W variant of manganese peroxidase. *Arch Biochem Biophys* 373: 147-153.
- Thurston CF.** (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology-UK* 140: 19-26.
- Uemura S, Ishihara S, Jellison J.** (1993). Differential responses of wood-rot fungi cellulases towards polyclonal antibodies against *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase. *Appl Biochem Biotechnol* 39: 788-794.
- Urzúa U, Kersten PJ, Vicuña R.** (1998a). Kinetics of Mn³⁺-oxalate formation and decay in reactions catalyzed by manganese peroxidase of *Ceriporiopsis subvermispora*. *Arch Biochem Biophys* 360: 215-222.
- Urzúa U, Kersten P, Vicuña R.** (1998b). Manganese peroxidase-dependent oxidation of glyoxylic and oxalic acids synthesized by *Ceriporiopsis subvermispora* produces extracellular hydrogen peroxide. *Appl Environ Microbiol* 64: 68-73.
- Van Aken B, Cameron MD, Stahl JD, Plumat A, Naveau H, Aust SD, Agathos SN.** (2000). Glutathione-mediated mineralization of ¹⁴C-labeled 2-amino-4,6- dinitrotoluene by manganese-dependent peroxidase H5 from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Microbiol Biotechnol* 54: 659-664.
- Van der Woude MW, Boominathan K, Reddy CA.** (1993). Nitrogen regulation of lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase production is independent of carbon and manganese regulation in *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Microbiol* 160: 1-4.
- Van AB, Agathos SN.** (2002). Implication of manganese (III), oxalate, and oxygen in the degradation of nitroaromatic compounds by manganese peroxidase (MnP). *Appl Microbiol Biotechnol* 58: 345-351.
- Vares T, Lundell TK, Hatakka AI.** (1992). Novel heme-containing enzyme possibly involved in lignin degradation by the white-rot fungus *Junghunia separabilima*. *FEMS Microbiol Lett* 99: 53-58.
- Verma P, Madamwar D.** (2002). Production of ligninolytic enzymes for dye decolorization by cocultivation of white-rot fungi *Pleurotus ostreatus* and *Phanerochaete chrysosporium* under solid-state fermentation. *Appl Biochem Biotechnol* 102-103: 109-118.
- Viterbo A, Yagen B, Rosenthal R, Mayer AM.** (1993). Dependence of activity of cucurbitacin in repression of *Botrytis* laccase on its structure. *Phytochemistry* 33: 1313-1315.
- Vyas BRM, Volc J, Sasek V.** (1994). Ligninolytic enzymes of selected white rot fungi cultivated on wheat straw. *Folia Microbiol* 39: 235-240.
- Wang CJ, Thiele S, Bollag JM.** (2002). Interaction of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) and 4-amino-2,6- dinitrotoluene with humic monomers in the presence of oxidative enzymes. *Arch Environ Contam Toxicol* 42: 1-8.
- Ward G, Hadar Y, Bilkis I, Konstantinovskiy L, Dosoretz CG.** (2001). Initial steps of ferulic acid polymerization by lignin peroxidase. *J Biol Chem* 276: 18734-18741.

- Wariishi H, Valli K, Renganathan V, Gold MH.** (1989). Thiol-mediated oxidation of nonphenolic lignin model compounds by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *J Biol Chem* 264: 14185-14191.
- Whitwam RE, Gazarian IG, Tien M.** (1995). Expression of fungal Mn peroxidase in *E. coli* and refolding to yield active enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 216: 1013-1017.
- Whitwam RE, Koduri RS, Natan M, Tien M.** (1999). Role of axial ligands in the reactivity of Mn peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry* 38: 9608-9616.
- Wood DA.** (1980). Inactivation of extracellular laccase during fruiting of *Agaricus bisporus*. *Gen Microbiol* 117: 339-345.
- Wood TM, García Campayo V.** (1990). Enzymology of cellulose degradation. *Biodegradation* 1: 147-161.
- Yaropolov AI, Skorobogatko OV, Vartanov SS, Varfolomeyev SD.** (1994). Laccase: properties, catalytic mechanism and applicability. *Appl Biochem Biotechnol* 49: 257-280.
- Yeung BK, Wang X, Sigman JA, Petillo PA, Lu Y.** (1997). Construction and characterization of a manganese-binding site in cytochrome c peroxidase: towards a novel manganese peroxidase. *Chem Biol* 4: 215-221.
- Youngs HL, Sundaramoorthy M, Gold MH.** (2000). Effects of cadmium on manganese peroxidase competitive inhibition of MnII oxidation and thermal stabilization of the enzyme. *Eur J Biochem* 267: 1761-1769.
- Zabel, RA and Morrel, JJ.** (1992). Wood microbiology. Decay and its prevention. Academic Press, California.
- Zacchi L, Burla G, Zuolong D, Harvey PJ.** (2000b). Metabolism of cellulose by *Phanerochaete chrysosporium* in continuously agitated culture is associated with enhanced production of lignin peroxidase. *J Biotechnol* 78: 185-192.
- Zacchi L, Morris I, Harvey PJ.** (2000a). Disordered ultrastructure in lignin-peroxidase-secreting hyphae of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiology* 146: 759-765.
- Zarra I, Revilla G.** (1993). Fisiología y bioquímica vegetal. Azcón-Bieto and Talon (eds). Interamericana, España..
- Zhang X, Eigendorf G, Stebbing DW, Mansfield SD, Saddler JN.** (2002). Degradation of trilinolein by laccase enzymes. *Arch. Biochem. Biophys* 405: 44-54.
- Ziegenhagen D, Hofrichter M.** (1998). Degradation of humic acids by manganese peroxidase from the white-rot fungus *Clitocybula dusenii*. *J Basic Microbiol* 38: 289-299.
- Ziegenhagen D, Hofrichter M.** (2000). A simple and rapid method to gain high amounts of manganese peroxidase with immobilized mycelium of the agaric white-rot fungus *Clitocybula dusenii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 53: 553-557.

— A B R E V I A T U R A S —

2,6 DMF	2,6 dimetoxifenol
1-HBT	1-hidroxibenzotriazol
ABTS	2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazoline-6-sulfonato)
AF	ácido ferúlico
CC	celulosa cristalina
BPC	bifenilo policlorado
G	ácido gálico
GA	medio glucosa y asparagina
Gu	guayacol
HAP	hidrocarburo aromático policíclico
IEF	isoelectroenfoque
K	medio de Kirk
LiP	lignin peroxidasa
MnP	manganeso peroxidasa
N	nitrógeno
NAGA	N-acetil glucosamina
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
pI	punto isoeléctrico
Poly-R	poly-R 478
T	ácido tánico
VM	verde de malaquita
VMD	verde de malaquita decolorado
YPG	Medio extracto de levadura, peptona y glucosa