

Tesis Doctoral

Producción de sistemas lignocelulolíticos en Trametes y géneros relacionados (grupo Trametes). Posibles aplicaciones en biorremediación

Castiglia, Valeria Carolina

2016

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:

Castiglia, Valeria Carolina. (2016). Producción de sistemas lignocelulolíticos en Trametes y géneros relacionados (grupo Trametes). Posibles aplicaciones en biorremediación. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6024_Castiglia

Cita tipo Chicago:

Castiglia, Valeria Carolina. "Producción de sistemas lignocelulolíticos en Trametes y géneros relacionados (grupo Trametes). Posibles aplicaciones en biorremediación". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6024_Castiglia

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

Producción de sistemas lignocelulolíticos en *Trametes* y géneros relacionados (grupo *Trametes*). Posibles aplicaciones en biorremediación

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área: CIENCIAS BIOLÓGICAS

Valeria Carolina Castiglia

Directores de Tesis: Dra. Laura Noemí Levin
Dr. Víctor Leandro Papinutti[†]
Consejero de Estudios: Dra. Silvia López

Buenos Aires, 2016

Producción de sistemas lignocelulolíticos en *Trametes* y géneros relacionados (grupo *Trametes*). Posibles aplicaciones en biorremediación

Resumen

Los hongos causantes de pudrición blanca son los únicos organismos capaces de degradar eficientemente todos los componentes de la madera dado que producen ligninasas, celulasas, hemicelulasas y pectinasas. Debido a la producción de ligninasas, enzimas extracelulares inespecíficas con alto poder oxidativo, son capaces también de degradar un amplio rango de compuestos fenólicos, muchos de ellos importantes contaminantes ambientales. En este trabajo de tesis se realizó un relevamiento de aislamientos provenientes de los alrededores de Buenos Aires, Misiones, Entre Ríos y Santiago del Estero, pertenecientes al grupo *Trametes*, con el fin de evaluar sus capacidades enzimáticas lignocelulolíticas con miras a aplicaciones en biorremediación. Se seleccionó un aislamiento de *Trametes versicolor* (BAFC 4272) por su capacidad de degradación de distintos colorantes industriales. Se estudió en este aislamiento la producción de actividades endoglucanasa, endoxilanasas, amilasa total, polimetilgalacturonasa y actividades ligninolíticas (lacasa, manganeso peroxidasa y lignin peroxidasa). Se evaluó el efecto de variaciones en el medio de cultivo sobre la producción de ligninasas. La mayor actividad lacasa (10000 UE L^{-1}) se logró con el agregado de cobre 1 mM . No se registraron actividades significativas de otras ligninasas. *T. versicolor* fue capaz de decolorar varios tipos de colorantes industriales sin la ayuda de mediadores. El colorante trifenilmetánico verde de malaquita (VM) no afectó el crecimiento e indujo actividad lacasa, promoviendo su propia degradación. Se ensayó el co-cultivo de *T. versicolor* con otro hongo de pudrición blanca (*Ganoderma lucidum*) en fermentación en estado sólido (SSF) en un medio a base de aserrín. En los cultivos duales se incrementó la producción de lacasa, reduciéndose el tiempo necesario para lograr la decoloración completa del VM y lográndose una mayor eficiencia en la detoxificación del colorante, con respecto a los monocultivos. Además, se registró un patrón isoenzimático de lacasa diferente. La pérdida de peso de la madera y la degradación de celulosa, hemicelulosa y lignina resultó comparable en monocultivos y cultivos duales pero el índice de selectividad (pérdida de lignina/pérdida de celulosa) de los cultivos duales fue marcadamente mayor. Chips de madera de pino y álamo colonizadas por *T. versicolor* creciendo en SSF con aserrín de álamo y semillas de avena registraron al cabo de 30 días pérdidas de peso del 10 y el 30%, respectivamente. La adición de cobre al medio de cultivo produjo un aumento de actividad lacasa pero no favoreció la degradación de la madera. En concordancia, el cultivo de *T. versicolor* en aserrín impregnado con un preservante de maderas a base

de cobre produjo un aumento del 35% en la actividad lacasa, aunque no se registró una pérdida de peso seco significativa en la madera. Los resultados obtenidos, en particular los relacionados con degradación de VM por la cepa seleccionada, permiten considerarla como potencialmente útil para biorremediación de efluentes contaminados.

Palabras claves: *Trametes, co-cultivo, lacasa, biorremediación, colorantes.*

Production of lignocellulolytic systems in *Trametes* and related genera (*Trametes* group), possible applications in bioremediation

Abstract

White-rot fungi are the only organisms in nature that can efficiently depolymerize and mineralize all major components of wood, due to their capacity to produce ligninases, cellulases, hemicellulases and pectinases. Their extracellular non-specific ligninolytic enzyme system composed by laccases and high redox peroxidases, allow them to degrade a wide range of phenolic compounds, many of them important environmental pollutants. In this research, strains isolated around Buenos Aires, Misiones, Entre Ríos and Santiago del Estero, belonging to the *Trametes* group, were examined in order to assess their lignocellulolytic enzymatic capabilities for application in bioremediation. A strain of *Trametes versicolor* (BAFC 4272) was selected for its ability to degrade different industrial dyes. Production of endoglucanase, endoxylanase, total amylase, polymethylgalacturonase and ligninolytic activities (laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase) was studied in this strain. The effect of variations in the culture medium on ligninolytic production was also evaluated. The highest laccase activity (10000 UL^{-1}) was achieved with the addition of copper 1 mM. No other significant ligninolytic activities were recorded. *T. versicolor* was able to decolorize various types of industrial dyes without the aid of mediators. The triphenylmethane dye malachite green (VM) did not affect fungal growth and induced laccase activity, promoting its own degradation. Co-cultivation of *T. versicolor* with another white-rot fungus (*Ganoderma lucidum*) was tested in solid state fermentation (SSF) in a sawdust-based medium. Co-cultivation reduced the time needed to achieve complete decolorization of VM. Moreover, co-cultivation produced a noticeable increase in laccase activity along with a more efficient decolorization and detoxification of VM. A modified isoenzymatic laccase pattern was also observed, showing one isoenzyme that was absent in monocultures. Dual-species treatment did not differ in wood dry weight loss and lignin, cellulose and hemicellulose degradation, compared to monocultures; but the selectivity index (lignin loss/cellulose loss) of dual cultures was markedly higher than the attained by monocultures. Chips of pine and poplar colonized by *T. versicolor* growing in SSF on a poplar sawdust and oat seeds based medium, registered after 30 days a weight loss of 10 and 30%, respectively. Addition of copper to the culture medium resulted in increased laccase activity but did not favor the degradation of wood. Accordingly, the cultivation of *T. versicolor* in sawdust impregnated with a copper-based wood

preservative produced a 35% increase in laccase activity, but no significant wood dry weight loss was detected. The results obtained, in particular those related to degradation of VM by the selected strain, allow considering this strain as potentially useful for bioremediation of contaminated effluents.

Keywords: *Trametes, co-cultivation, laccase, biorremediation, dyes.*

El grupo ***Trametes*** fue creado por Ryvarden en 1991 abarcando 16 géneros de hongos causantes de pudrición blanca, en su mayoría con sistema hifal trimitico, denominados *Cerreña*, *Corioloopsis*, *Cryptoporus*, *Daedaleopsis*, *Datronia*, *Earliella*, *Elmerina*, *Fomitella*, *Hexagonia*, *Lenzites*, *Megasporoporia*, *Microporus*, *Mollicarpus*, *Pycnoporus*, *Trametes* y *Trichaptum*. Estos géneros presentan también hifas generativas fibuladas y esporas lisas, hialinas, con paredes delgadas, no amiloides y usualmente cilíndricas. En base a estudios moleculares más recientes el grupo ha sido modificado. Por ejemplo, algunos géneros han sido ubicados fuera de los *Polyporales*, como *Trichaptum* en *Hymenochaetales* (Hibbett & Donoghue, 1995; Binder *et al.*, 2005; Larsson *et al.*, 2006), y *Elmerina* en *Tremellales* (Larsson *et al.*, 2004). Otros géneros del grupo, aunque pertenecen a los *Polyporales*, no están estrechamente relacionados con *Trametes* como *Cerreña*, *Daedalea* y *Fomitopsis* (Ko & Jung, 1999; Binder *et al.*, 2005; Lee & Lim, 2010) por lo cual también han sido eliminados del grupo. Welti *et al.* (2012) proponen clasificar el grupo *Trametes* en cuatro géneros: *Trametes*, *Pycnoporus*, *Artolenzites* y *Leiotrametes*.

Trametes versicolor (Lloyd) es una especie cosmopolita. Crece sobre todo tipo de maderas caducifolias en bosques, jardines y parques, pero también se lo puede encontrar en bosques de coníferas. En los bosques patagónicos fue estudiada por Wright & Deschamps (1972). Su basidiocarpo es anual, sésil y flexible, generalmente se encuentra en grupos numerosos formando rosetas, aunque también se lo puede encontrar solitario. La superficie del píleo es concéntricamente surcada y zonada, con bandas de diferentes colores, desde amarillo crémeo hasta gris azulado, pasando por castaños anaranjados. Esta coloración varía según las condiciones de crecimiento y cada variante ha recibido un nombre distinto. Numerosos estudios demostraron que este hongo posee un complicado sistema lignocelulolítico, que produce pudrición blanca en las maderas. *T. versicolor* ha sido utilizado exitosamente en muchos estudios de biorremediación *in-situ* y *ex-situ* para la degradación de distintos tipos de contaminantes (Champagne & Ramsay, 2005; Levin *et al.*, 2016).

AGRADECIMIENTOS

Muchas personas me ayudaron y acompañaron durante el transcurso de mi doctorado, quiero agradecerles a todas, y espero no olvidarme de ninguna.

A Leandro Papinutti, mi director inicial, quién me invitó a formar parte del equipo de trabajo del Laboratorio de Micología Experimental, me guió en mis primeros años de doctorado y siempre me ayudó y acompañó con cariño. Pasamos muchos buenos momentos dentro y fuera del laboratorio, y fue para mí más un amigo que un director.

A Laura, mi directora actual, por hacerse cargo de mí en un momento muy difícil y ayudarme a seguir adelante. Por dedicarme su tiempo, y por su paciencia para organizar mi trabajo.

A Silvia López, mi consejera de estudios.

A Flavia, Nora, Marce, Euge y Luis por estar siempre dispuestos a ayudarme con mi trabajo, por compartir sus conocimientos y principalmente por su afecto.

A Isabel, Emanuel, Fran, Raúl, Julieta, Leo, Maira y Ruth, por todos los buenos momentos juntos, por los experimentos compartidos, por ser tan divertidos y sobre todo por la amistad que tenemos entre todos.

A mi familia, por ayudarme siempre a seguir adelante, por darme fuerzas cuando más las necesité, por su apoyo emocional y su ayuda constante para resolver hasta los problemas más cotidianos.

A Sascha, por apoyarme con mi carrera, por ayudarme, por acompañarme y principalmente por su cariño.

A Lean.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Estructura y constituyentes de la pared celular vegetal	2
1.1.1. Celulosa.....	4
1.1.2. Hemicelulosas	5
1.1.3. Pectina.....	6
1.1.4. Lignina	7
1.2. Principales mecanismos de degradación de lignocelulosa por hongos xilófagos.	14
1.2.1. Pudrición blanca	14
1.2.2. Pudrición castaña	16
1.2.3. Pudrición blanda	17
1.3. Enzimas extracelulares involucradas en la degradación de materiales lignocelulósicos.....	18
1.3.1. Enzimas celulolíticas.....	18
1.3.2. Enzimas xilanolíticas.....	26
1.3.3. Enzimas pectinolíticas.....	30
1.3.4. Enzimas ligninolíticas.....	35
1.3.4.1. Lacasas.....	36
1.3.4.2. Lignina peroxidasa	45
1.3.4.3. Manganeso peroxidasa	48
1.3.4.4. Peroxidasa versátil	51
1.3.4.5. Peroxidasas decolorantes de tintes (Dye-decolorizing peroxidases) ...	52
1.4. Las enzimas fúngicas aplicadas a la biorremediación	53
1.4.1. Degradación de colorantes industriales	56
1.5. Co-cultivo de hongos de pudrición blanca	66
1.6. Preservantes de maderas	67
1.7. Perspectivas a futuro.....	68
2. OBJETIVOS.....	70
2.1. Objetivo general	70
2.2. Objetivos específicos.....	70
3. MATERIALES Y MÉTODOS	72
3.1 Organismos.....	72
3.2. Medios de cultivo.....	73
3.2.1. Medios agarizados.....	73

3.2.1.1. Medio MEA.....	73
3.2.1.2. Medio APG.....	73
3.2.1.3. Medio GA (agarizado)	73
3.2.2. Medios líquidos.....	73
3.2.2.1. Medio GA	73
3.2.3. Fermentación en medio sólido (SSF).....	74
3.3. Condiciones de cultivo.....	75
3.4. Inóculos.....	75
3.5. Procesamiento de los cultivos	75
3.5.1. Fermentaciones en medio líquido	75
3.5.2. Fermentaciones en medio sólido	76
3.5.3. Ensayos de cocultivo	76
3.6. Determinaciones analíticas.....	77
3.6.1. Azúcares reductores	77
3.6.2. Determinación del contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina (ensayos de cocultivo)	77
3.7. Actividades enzimáticas	77
3.7.1. Actividad Endo- β -D-1,4-glucanasa (E.C.3.2.1.4).....	77
3.7.2. Actividad amilasa total	78
3.7.3. Actividad Endo- β -D-1,4-xilanasasa (E.C.3.2.1.8).....	78
3.7.4. Actividad Polimetilgalacturonasa (actividad endo y exo) (PMG).....	78
3.7.5. Actividad Lacasa (E.C.1.10.3.2).....	78
3.7.6. Actividad Manganese peroxidasa (MnP) (E.C.1.11.1.13).....	79
3.7.7. Actividad Lignin peroxidasa (E.C.1.11.1.14).....	80
3.8. Temperatura y pH optimos para la actividad lacasa	80
3.8.1. Temperatura óptima.....	80
3.8.2. pH óptimo	80
3.9. Ensayos de estabilidad de la enzima lacasa	80
3.9.1. Efecto de la temperatura	81
3.9.2. Efecto del pH	81
3.10. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	81
3.11. Extracción de DNA, amplificación por PCR, purificación y cuantificación.	82
3.12. Ensayos de decoloración de colorantes industriales.....	83
3.12.1. Colorantes industriales utilizados en los ensayos de decoloración.....	83
3.12.2. Degradación de colorantes industriales en medios agarizados	83
3.12.3. Degradación de una mezcla de colorantes industriales en medio líquido adicionado con distintos inductores de la actividad lacasa.....	84
3.13. Ensayos con Verde de Malaquita	84

3.13.1. Efecto de la concentración de VM en combinación con cobre 1 mM sobre el crecimiento y las actividades lacasa y MnP en medio líquido.....	84
3.13.2. Efecto de compuestos aromáticos, cobre y manganeso en combinación con VM sobre el crecimiento y las actividades lacasa y MnP en medio líquido....	85
3.13.3. Degradación y detoxificación de VM	85
3.14. Degradación de madera de álamo y pino	87
3.15. Relevamiento de hongos trametoides con características trametoides.....	88
3.16. Ensayos con el preservante industrial para maderas CCA	88
3.17. Análisis estadísticos	89
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	90
4.1. Relevamiento de hongos con características trametoides	90
4.1.1. Evaluación cualitativa de las actividades enzimáticas y la capacidad de decoloración.	90
4.1.2. Evaluación cuantitativa del crecimiento y la producción enzimática.	95
4.2. Cinética de crecimiento y producción enzimática de <i>T. versicolor</i> BAFC 4272 .	98
4.2.1. Cinética de crecimiento.....	98
4.2.2. Producción de enzimas involucradas en la conversión de materiales lignocelulósicos y en la degradación del almidón por <i>T. versicolor</i> BAFC 4272 .	100
4.2.3. Actividades ligninolíticas lacasa y MnP	107
4.2.4. Efecto de distintas fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento y las actividades ligninolíticas	108
4.2.5. Efecto de inductores aromáticos sobre el crecimiento y las actividades ligninolíticas	114
4.2.6. Efecto del cobre y el manganeso sobre el crecimiento y las actividades ligninolíticas	121
4.2.7. Ensayos de actividad y estabilidad enzimática.....	125
4.3. Colorantes industriales	132
4.3.1 Degradación de colorantes industriales y actividades enzimáticas en medios agarizados.....	132
4.3.2. Efecto del agregado de una mezcla de colorantes industriales a cultivos en medio líquido adicionados con distintos inductores de actividad lacasa.....	136
4.4. Ensayos con el colorante industrial verde de malaquita	138
4.4.1. Efecto de la concentración de VM en combinación con cobre sobre el crecimiento y las actividades lacasa y MnP	140
4.4.2. Decoloración y adsorción de VM. Ensayos con cobre.....	144
4.4.3. Efecto de compuestos aromáticos, cobre y manganeso en combinación con VM sobre el crecimiento y las actividades lacasa y MnP en medio líquido.....	152
4.4.4. Decoloración y Detoxificación de VM.....	154
4.5. Cocultivo de hongos causantes de pudrición blanca	160
4.5.1. Estimación cualitativa de la actividad lacasa.....	161

4.5.2. Cuantificación de actividades enzimáticas lacasa, MnP y LiP	163
4.5.3. Decoloración y detoxificación de VM.....	168
4.5.4. Análisis de espectros de absorción.....	170
4.5.5. Composición del medio de cultivo ya utilizado	171
4.6. Degradación de madera de álamo (<i>Populus</i> sp.) y pino (<i>Pinus</i> sp.).....	173
4.6.1. Cortes anatómicos y pérdida de peso seco.....	173
4.6.2. Actividad lacasa	178
4.7. Ensayos con CCA	180
CONCLUSIONES.....	185
REFERENCIAS.....	188

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos son un grupo diverso de organismos, que pueden encontrarse en todos los ambientes. Juegan un rol vital en los ecosistemas y son capaces de regular el flujo de nutrientes y energía a través de sus redes miceliales. Afectan fuertemente el medioambiente, aunque su impacto muchas veces permanece oculto al resto del mundo (Lawton & Jones, 1995).

Estos organismos, que incluyen levaduras y hongos filamentosos, son altamente plásticos, y muchos son capaces de sobrevivir en condiciones extremas. La mayoría de las células fúngicas son totipotenciales, de modo que el organismo completo puede regenerarse no sólo a partir de esporas sino también a través de fragmentos de hifas (Carlile *et al.*, 2001).

Algunos hongos son parásitos o simbioses y obtienen su alimento a partir de organismos vivos. Otros hongos son saprófitos, es decir, que obtienen sus nutrientes de organismos muertos. Estos últimos son los principales responsables del reciclado de restos vegetales, la descomposición de restos animales y otros microorganismos (incluyendo hongos y bacterias) es realizada mayormente por bacterias (Carlile *et al.*, 2001).

El ciclo del carbono involucra la fijación de dióxido de carbono atmosférico en moléculas orgánicas por medio de la fotosíntesis. Los hongos juegan un importante papel en la degradación de estas moléculas, reponiendo de este modo el dióxido de carbono a la atmosfera. La degradación de estos restos vegetales también es importante para el ciclo de otros elementos, como por ejemplo nitrógeno, fósforo y potasio (Carlile *et al.*, 2001).

El valor promedio de la cantidad de restos vegetales que son depositados anualmente en bosques de regiones templadas es del orden de 2 toneladas por hectárea. De esta cantidad, hasta $\frac{1}{4}$ se encuentra en la forma de restos leñosos, que sólo pueden ser degradados por hongos especializados. Teniendo en cuenta esto, podemos afirmar que la actividad de estos organismos es esencial para la vida en la tierra. Sin estos procesos

degradativos, la acumulación de restos vegetales y la falta de carbono atmosférico terminarían con la vida en unas pocas décadas (Carlile *et al.*, 2001).

1.1. Estructura y constituyentes de la pared celular vegetal

La pared celular vegetal es una entidad dinámica y metabólicamente activa que juega un rol crucial en el crecimiento, diferenciación y comunicación célula-célula. Su principal característica es su rigidez, esencial para proveerle a la planta la fuerza necesaria para resistir el estrés mecánico y mantener su forma.

Típicamente la pared vegetal consiste en tres capas: la pared primaria (capa delgada, producida por las células en crecimiento), la pared secundaria (capa gruesa que se forma dentro de la pared primaria luego de finalizado el crecimiento celular) y la laminilla media (capa mas externa que se forma en la interfase entre las paredes primarias de células adyacentes manteniéndolas unidas) (Kubicek, 2013). **Fig. 1.**

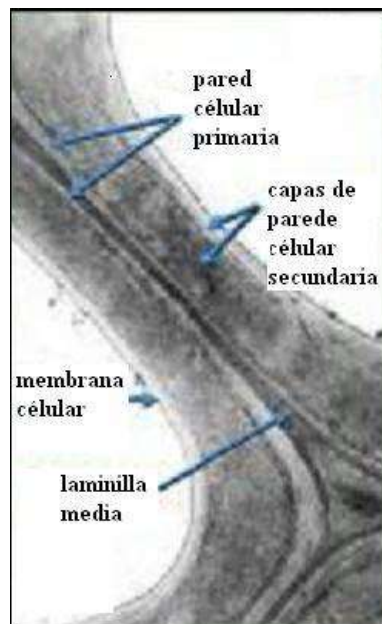


Figura 1: Micrografía electrónica de transmisión donde pueden observarse las paredes celulares (x2000).

La pared primaria está compuesta por celulosa, hemicelulosa y pectina (Rose *et al.*, 2004). La celulosa forma microfibrillas, las cuales se encuentran covalentemente unidas a las cadenas de hemicelulosa formando así una red de celulosa-hemicelulosa embebida en una matriz de pectina.

La pared secundaria está compuesta por celulosa, hemicelulosa (principalmente xilano) y lignina. Este último compuesto es un polímero aromático complejo que llena los espacios entre la celulosa, hemicelulosa y componentes pectínicos de la pared celular.

En la madera, se pueden diferenciar tres capas dentro de la pared secundaria, llamadas S₁, S₂ y S₃, que resultan de los diferentes arreglos de microfibrillas de celulosa (Mauseth, 1988) (**Fig. 2**). Durante la formación de la pared secundaria la lignificación tiene lugar en las capas S₁ y S₂, en la pared primaria y en la laminilla media.

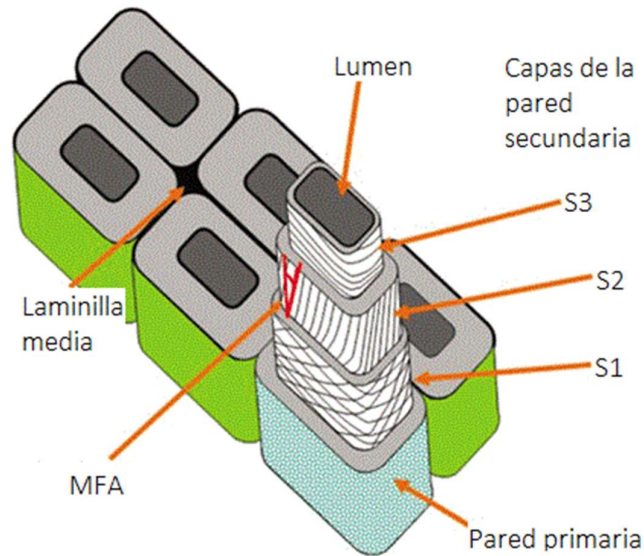


Figura 2: Esquema anatómico de la pared celular vegetal. Las líneas grises en la pared celular secundaria representan microfibrillas de celulosa. El ángulo formado por las microfibrillas en la capa S₂, llamado ángulo de microfibrillas (MFA por sus siglas en inglés), juega un rol crucial en la rigidez de la madera. Fuente: Stokke & Groom, 2006.

Las microfibrillas de celulosa se incrustan y fijan dentro de la lignina de forma similar a las barras de acero que se incrustan en el concreto (**Fig. 3**).

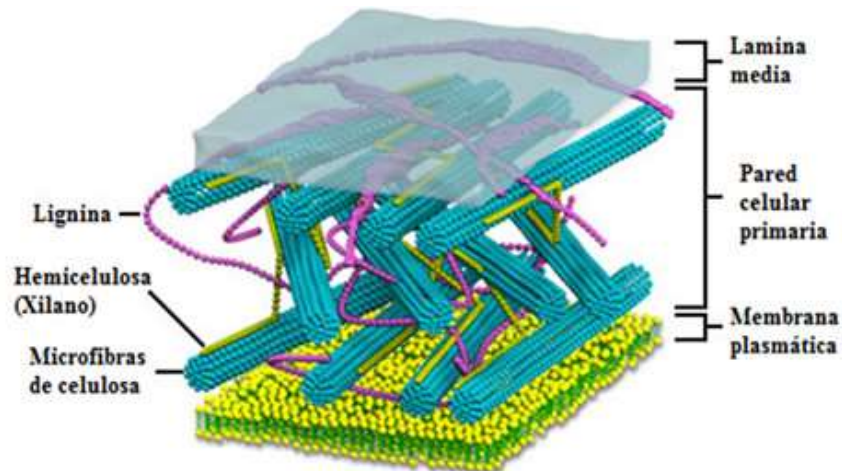


Figura 3: Disposición esquemática de los principales componentes de la pared celular.

En las paredes celulares de la mayoría de las plantas también podemos encontrar proteínas estructurales, aunque su función no está aún bien dilucidada (Albenne *et al.*, 2009).

La composición relativa de carbohidratos, compuestos secundarios y proteínas varía entre las diferentes especies de plantas, tipos celulares y según la edad (Reiter, 2002; Popper, 2008).

1.1.1. Celulosa

La celulosa está constituida por cadenas de monómeros de glucosa unidos por enlaces β -1,4 (**Fig. 4**). Estas cadenas no están ramificadas ni sustituidas y debido a esto, la molécula adopta una forma extendida. Las moléculas de glucosa de una cadena pueden formar puentes de hidrógeno con moléculas de glucosa de la misma cadena o de otras, gracias a los múltiples grupos hidroxilos que poseen. Estas uniones mantienen las cadenas firmemente unidas una al lado de la otra, formando microfibrillas (Zarra & Revilla, 1993).

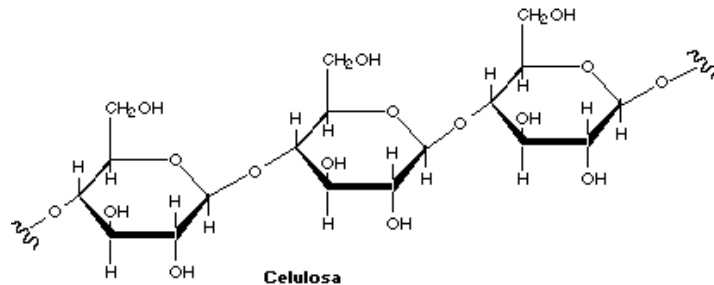


Figura 4: Estructura de una cadena de celulosa.

La celulosa tiene una estructura cristalina (Meyer & Misch, 1937). La jerarquía morfológica está dada por fibrillas elementales, microfibrillas y bandas de microfibrillas. Las microfibrillas pueden disponerse en forma de hélices con distintos ángulos de giro, dependiendo de la composición de la pared celular y el tipo de planta, lo que confiere al tejido vegetal diferentes niveles de elasticidad, fuerza y capacidad de elongación (O' Sullivan, 1997).

1.1.2. Hemicelulosas

Las hemicelulosas son heteropolímeros formados por monómeros de diversas hexosas y pentosas unidos por enlaces β -1,4. Suelen estar ramificados y se clasifican según los azúcares residuales mayoritarios en: xiloglucano, manano y xilano (van den Brink & de Vries, 2011).

En dicotiledóneas y monocotiledóneas no gramináceas la hemicelulosa predominante en la pared celular es el xiloglucano, cuya “columna vertebral” está compuesta por residuos de β -D-glucosa. El xiloglucano se encuentra fuertemente asociado con la celulosa y así contribuye a la integridad estructural de la pared celular. Se conocen dos tipos de xiloglucanos: tipo XXXG y tipo XXGG. El primer tipo consiste en unidades repetidas de tres residuos de D-glucopiranososa unidos por enlaces β -1,4 sustituidos con D-xilopiranososa a través de un enlace α -1,6, las cuales están separadas entre sí por un residuo de glucosa sin sustituyentes. En el segundo tipo de xiloglucanos, la estructura es

de dos residuos de glucosa sustituidos con xilosa, separados por dos residuos de glucosa sin sustituir.

En cereales y plantas leñosas la hemicelulosa predominante es el xilano. Éste tiene una columna vertebral compuesta por D-xilosas unidas mediante enlaces β -1,4 (**Fig. 5**) a la cual pueden estar unidas cadenas laterales de diferentes estructuras resultando en una gran variedad de estructuras de xilano. El xilano presente en cereales a menudo contiene grandes cantidades de L-arabinosa, en cambio, en las maderas duras, el xilano contiene mayor cantidad de ácido D-glucurónico (Scheller & Ulvskov, 2010).

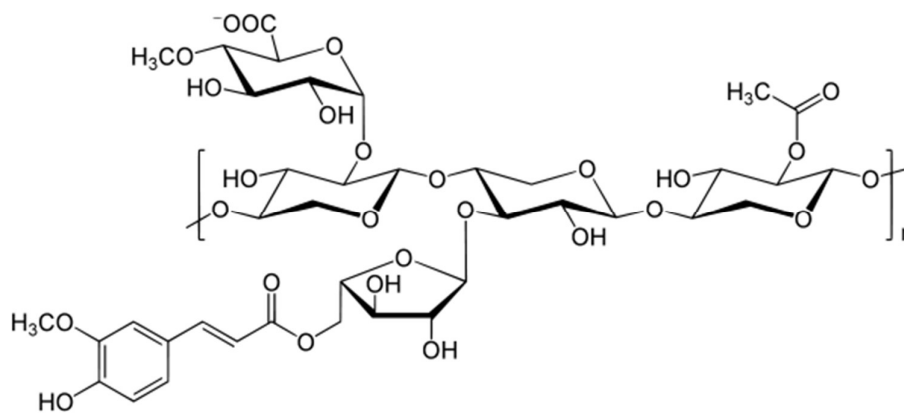


Figura 5: Estructura química del xilano.

En las paredes celulares de las gimnospermas la hemicelulosa predominante está compuesta por galactomananos y galactoglucomanos. Estos consisten en una columna vertebral de residuos de manosa unidos por enlaces β -1,4 que puede contener residuos de D-galactosa unidos por enlaces α -1,6 (Dey, 1978).

1.1.3. Pectina

La pectina compone el grupo de polisacáridos más estructuralmente complejo en la naturaleza. Se ha sugerido que juega un rol fundamental en la

función de las paredes celulares primarias y secundarias dado que la aparición de las plantas terrestres y su adaptación al crecimiento vertical está correlacionada con un incremento en la pectina de sus paredes celulares (Matsunaga *et al.*, 2004).

La pectina consiste generalmente en una columna vertebral de residuos de ácido D-galacturónico, de los cuales aproximadamente un 20% puede ser reemplazado por otros residuos. De acuerdo a la naturaleza de la composición tanto de los monómeros que forman la cadena principal como de los de las cadenas laterales, las pectinas pueden clasificarse en homogalacturonas (HGs), ramnogalacturonas I y II (RG-I y RG-II), xilogalacturona (XGA) y apiogalaturona (AP) (Mohnen, 2009). Los residuos de ramnosa pueden tener largas cadenas laterales formadas por residuos de L-arabinosa y D-galactosa, con pequeñas cantidades de D-fucosa y D-manosa, dándole una apariencia “pilosa” a la pectina (Mohnen, 2009). El polisacárido péctico más abundante es HG representando alrededor del 65% de la pectina presente en las paredes celulares de las plantas. Lo siguen RG-I (representando entre un 20-35%) y RG-II (hasta un 10%). XGA y AP son componentes minoritarios de la pectina.

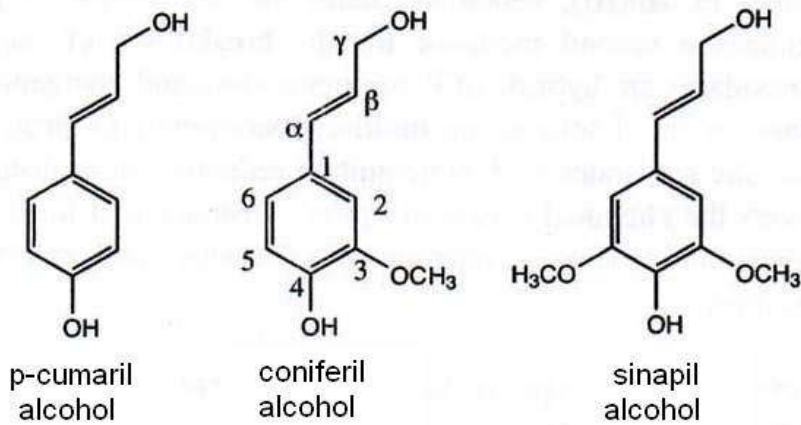
La forma en la cual los polisacáridos pécticos se unen unos a otros aún está en debate. La mayoría de los datos disponibles llevan a afirmar que HG, RG-I y RG-II se unen a través de sus columnas vertebrales. Sin embargo, también se ha sugerido que podrían estar covalentemente unidas a otros tipos de polisacáridos de la pared como xiloglucanos y xilanos. Esta hipótesis está apoyada en el hecho de que han sido hallados residuos de xilosa en algunas pectinas y en que mutaciones en genes responsables en la biosíntesis de pectina también afectan el contenido de xilano en las paredes celulares (Orfila *et al.*, 2005).

1.1.4. Lignina

La lignina es el polímero orgánico más abundante sobre la tierra, después de la celulosa. Se encuentra en las paredes de las células vegetales formando un complejo con polisacáridos como la celulosa y la hemicelulosa. Es extremadamente recalcitrante a la degradación y tiene una estructura compleja,

derivada de la unión oxidativa de monolignoles (monómeros de lignina y precursores monoméricos). Los tres precursores primarios son hidroxicinamil alcoholes: cumaril, coniferil y sinapil alcohol, los cuales difieren en el número de grupos metoxilo presentes en el anillo aromático. Las correspondientes unidades fenilpropanóicas en el polímero de lignina se conocen como p-hidrofenil (H), guayacil (G) y siringil (S), en base a las sustituciones del anillo aromático (**Fig. 6**).

Monómeros primarios de lignina (hidroxicinamil alcoholes)



Unidades estructurales correspondientes

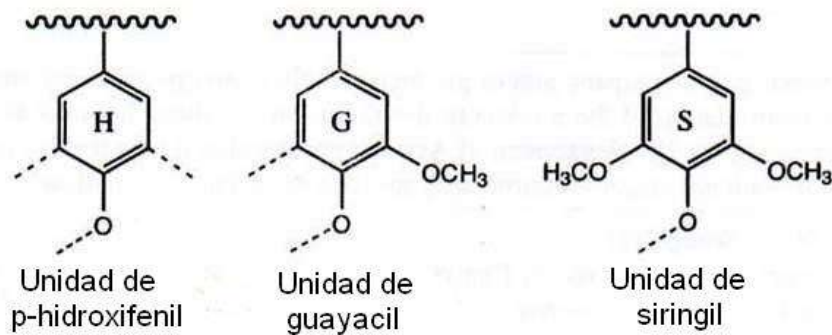


Figura 6: Monómeros primarios de la lignina y sus correspondientes unidades estructurales en el polímero. (Fuente: Wong, 2009).

Los precursores se unen por ligaduras C-C y C-O-C (Sarkanen & Hergert, 1971) formando una red compleja y de estructura variable (**Fig. 7**). Estas uniones son catalizadas por enzimas lacasa y peroxidasas (Vanholme *et al.*, 2008) que generan radicales libres en estos monómeros provocando su activación y permitiendo que se polimericen de forma azarosa. La proporción de estos precursores varía de acuerdo a la especie y a la edad de la planta. En general en angiospermas, encontramos cantidades similares de unidades G y S, con trazas de H (G/S/H=50:50:t), mientras que en gimnospermas suele haber mayor proporción de G (G/S/H= 96:t:4). En pastos (monocotiledóneas) podemos encontrar una relación G/S/H= 70:25:5 (Brunow, 2001; Fukushima, 2001; Higuchi, 2006).

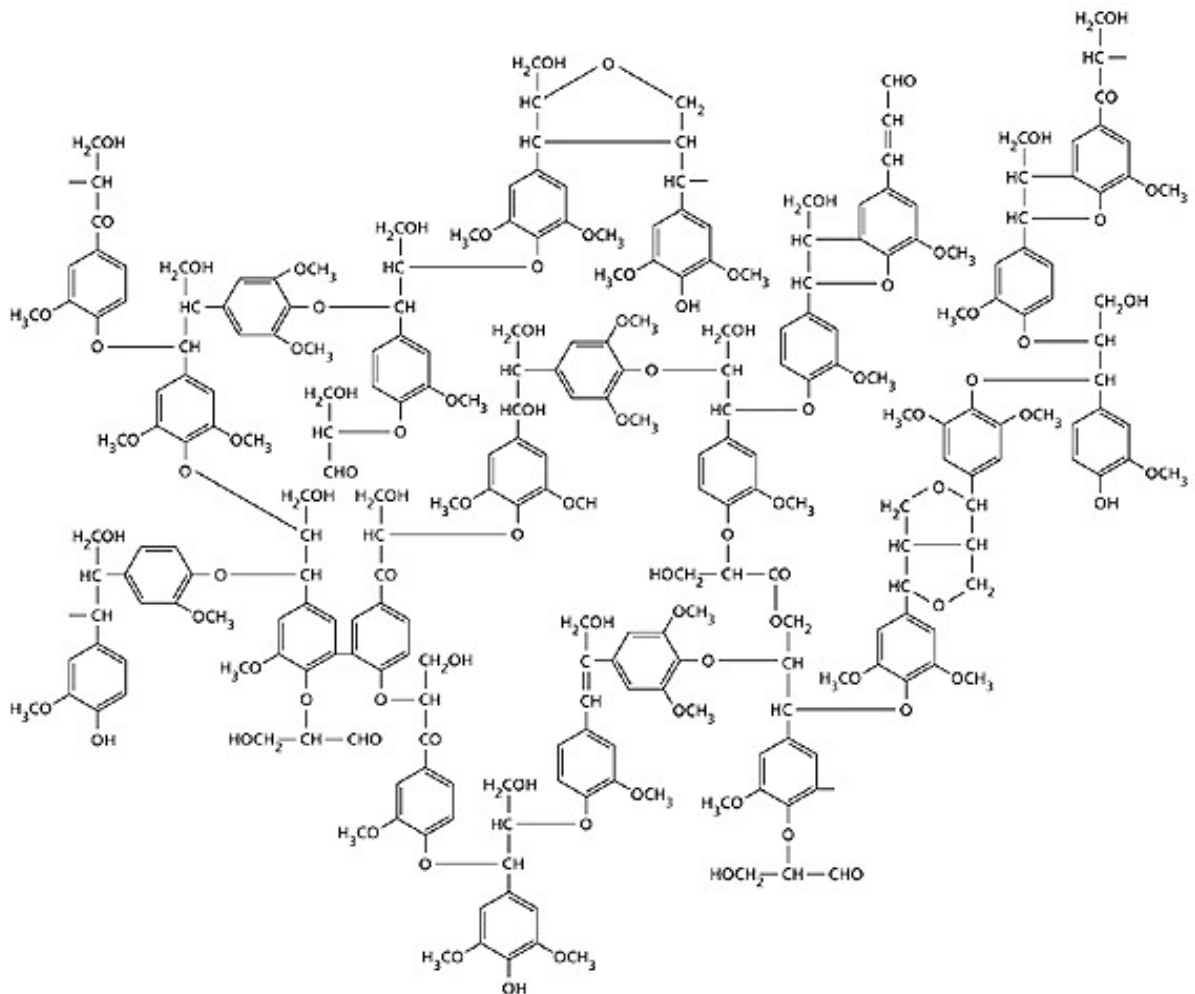


Figura 7: Estructura química de la lignina

Las reacciones de acoplamiento de un monómero al polímero en crecimiento dan origen a estructuras con uniones β , mientras que el acoplamiento de dos oligómeros/polímeros de lignina origina uniones del tipo 5-5 y 5-O-4. El acoplamiento de dos monómeros (dimerización) para originar una estructura β - β es un evento poco usual en la naturaleza, aunque ocurre frecuentemente en la síntesis de lignina sintética (**Fig. 8**) (Wong, 2009).

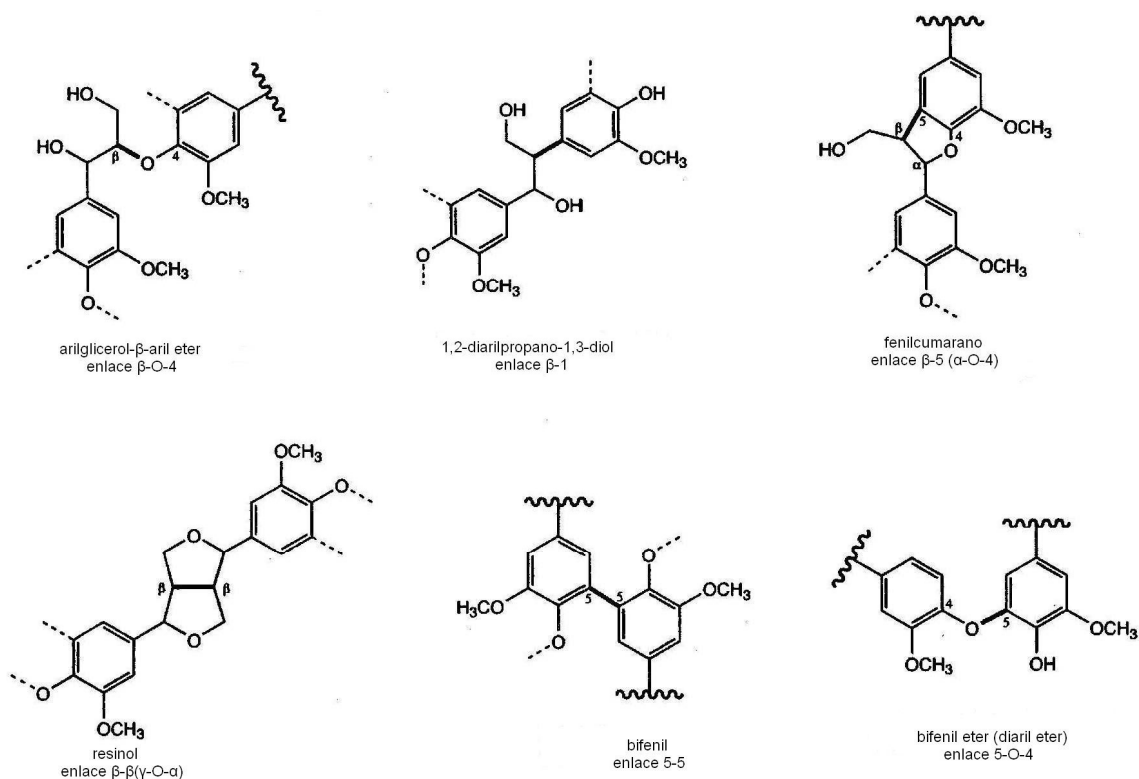


Figura 8: Principales unidades estructurales de lignina derivadas del acoplamiento de dos monómeros (Fuente: Wong, 2009).

La abundancia relativa de las diferentes uniones depende principalmente de la contribución relativa de los monómeros al proceso de polimerización durante la biosíntesis de lignina. La unión de un monolignol, por ejemplo, coniferil alcohol, a una unidad G en un oligómero o polímero de lignina en crecimiento, da origen a uniones G- β -O-4-G y G- β -5-G mientras que la unión de dos unidades G pertenecientes a dos oligómeros/polímeros originan uniones

G-5-5-G y G-4-O-5-G. Sin embargo, si la unión se produce entre un coniferil alcohol y una unidad S sólo se origina una unión G- β -O-4-S, y no G- β -5-S, porque el coniferil alcohol posee un grupo metoxi en la posición 5 (**Fig. 9**). Del mismo modo, si se unen una unidad G y una S pertenecientes a dos oligómeros o polímeros en crecimiento la unión resultante es S-4-O-5-G, pero no una unión 5-5. Dos unidades S no producen uniones (**Fig. 10**). La unión β -O-4 de un monolignol con un oligómero o polímero de lignina en crecimiento crea la unidad estructural más abundante, constituyendo aproximadamente un 50% y 80% de las unidades de fenilpropanoides en la lignina de maderas de gimnospermas y angiospermas, respectivamente (Alder, 1977). Las uniones β -O-4 pueden ser fácilmente clivadas químicamente durante el proceso de delignificación (biopulpado), mientras que las uniones C-C, estiril eter y bifenil eter son más resistentes a estos procesos. Las uniones 5-5 frecuentemente son esterificadas con un monolignol adicional por medio de una reacción intramolecular con una quinona intermediaria (Karhunen *et al.*, 1995; Argyropoulos *et al.*, 2002).

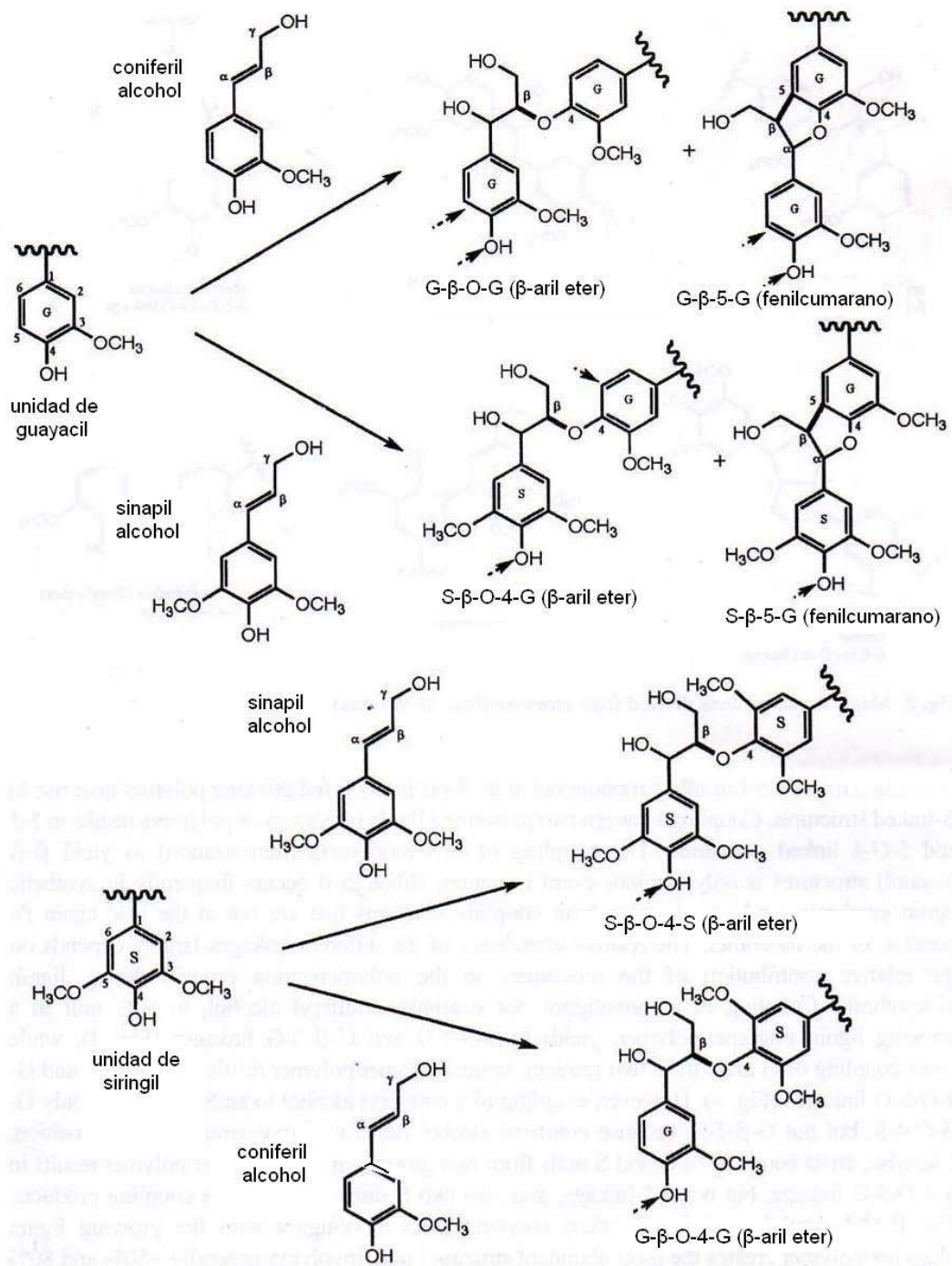


Figura 9: Estructuras y tipos de enlaces derivados de la unión de unidades estructurales de lignina a oligómeros/polímeros en crecimiento (Fuente Wong, 2009)

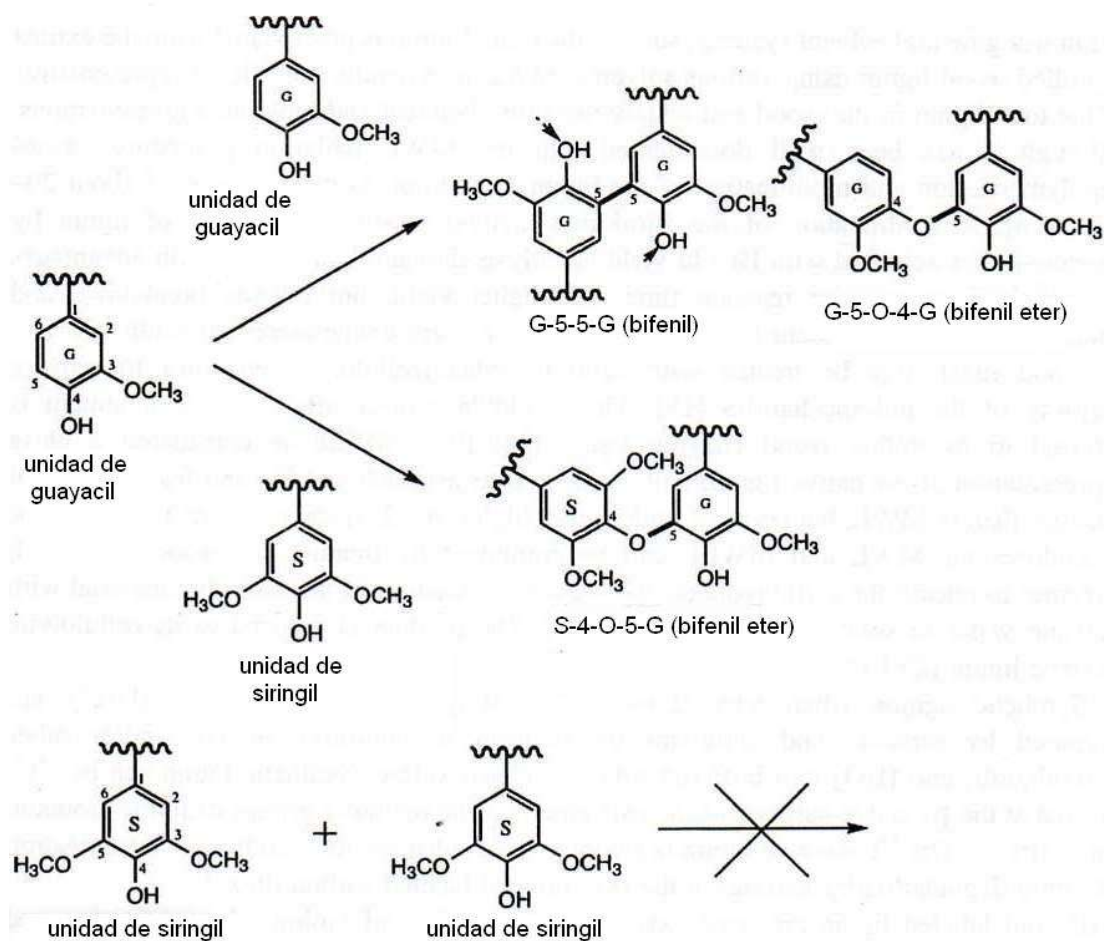


Figura 10: Unidades estructurales derivadas del acoplamiento de dos polímeros de lignina (Fuente Wong, 2009).

La biosíntesis de los monómeros de lignina es una parte de la vía de biosíntesis de fenilpropanoides, que también es responsable de la producción de una amplia gama de compuestos, incluyendo por ejemplo pigmentos flavonoides, isoflavonoides y fitoalexinas. La fenilalanina se desamina para producir ácido cinámico. Este ácido entonces se hidroxila y metila, produciendo diferentes ácidos sustituidos en el anillo aromático. Entonces se producen los tioésteres de coenzima A de los ácidos (p)-cumárico, ferúlico y sinápico mediante la acción de la hidroxicinamato:CoAligasa. Estos compuestos posteriormente se reducen mediante la cinamilo-CoA-reductasa (CCR) para producir cinamaldehydos, que finalmente se convierten en alcoholes cinamílicos mediante la cinamilalcohol-deshidrogenasa (CAD). Sólo estas dos últimas

reacciones son específicas de la biosíntesis de lignina. La liberación de los monómeros al exterior no se conoce bien, pero podría ser por secreción vesicular, difusión pasiva y o por transportadores de membrana. La adición de monómeros para crear un polímero de lignina se hace en la pared celular, con los monómeros activados y la unión final entre monómeros es independiente de la presencia de cualquier enzima. Los monómeros se activan por oxidación mediada por enzimas como lacasas y peroxidasas (Barrosy *et al.*, 2015).

1.2. Principales mecanismos de degradación de lignocelulosa por hongos xilófagos.

Los hongos que atacan madera se clasifican en tres tipos: causantes de pudrición blanca, castaña y blanda

1.2.1. Pudrición blanca

El mecanismo denominado pudrición blanca (**Fig. 11**) es el único capaz de degradar completamente la estructura de la madera debido a que es capaz de depolimerizar la lignina. Ataca tanto maderas blandas como duras y es característico de los hongos Basidiomycota, aunque también algunos Ascomycota miembros de las familias *Diatrypaceae* y *Xylariaceae* fueron reportados como causantes de este tipo de pudrición (Eriksson *et al.*, 1990; Pointing *et al.*, 2003; Luo, 2005). Actualmente se pueden distinguir dos patrones de degradación dentro del tipo de pudrición blanca: (i) delignificación simultánea y (ii) delignificación selectiva (Martínez *et al.*, 2005). Estos dos patrones no son excluyentes entre sí, sino que pueden encontrarse juntos. Muchos hongos causantes de pudrición blanca originan ambos patrones de degradación y el grado en que generan uno u otro puede variar incluso entre especies del mismo taxón (Martínez *et al.*, 2005).

La delignificación simultánea se produce principalmente en maderas duras y lleva a la degradación de la celulosa, hemicelulosa y lignina al mismo tiempo. Ha sido reportada en *T.versicolor*, *Irpex lacteus*, *Phanerochaete*

chrysosporium, *Heterobasidion annosum* y *Phlebia radiata* y en algunos Ascomycota como *Xylaria hypoxylon* entre otros hongos (Martinez *et al.*, 2005). Este tipo de ataque comienza desde el lumen de la célula y avanza hacia la laminilla media. Las enzimas responsables de catalizar esta degradación permanecen unidas a la hifa o se mantienen cerca dado que las enzimas ligninolíticas necesitan metabolitos producidos intracelularmente para su provisión de peróxido de hidrogeno. Con este patrón de ataque sólo se degradan pequeñas áreas alrededor de las hifas y por ello la delignificación simultánea suele dejar una gran proporción de la madera sin degradar. La característica anatómica distintiva es la erosión de la pared celular sobre la superficie del lumen celular.



Figura 11: Madera de álamo atacada por un hongo causante de pudrición blanca. Fuente: www.botit.botany.wisc.edu

Al contrario, en la degradación selectiva, la lignina y la hemicelulosa son degradadas antes de que el hongo ataque la celulosa. Esta forma de ataque ocurre tanto en maderas duras como blandas, y la degradación comienza en la laminilla media extendiéndose hasta la pared secundaria de la célula vegetal. Este ataque es típico de ciertas especies de Basidiomycota como *Ganoderma australe*, *Phlebia tremellosa*, *Ceriporiopsis subvermispora*, varios *Pleurotus* ssp. y *Phellinus pini* (Martinez *et al.*, 2005). El efecto anatómico más remarcable es la desfibrilación por desintegración de la laminilla media.

1.2.2. Pudrición castaña

Los hongos causantes de pudrición castaña atacan principalmente maderas blandas de coníferas y sólo degradan la celulosa y la hemicelulosa. No son capaces de degradar la lignina, aunque algunas especies pueden modificarla por medio de reacciones de demetoxilación (Eriksson *et al.*, 1990). En general se produce un primer ataque a la celulosa que debilita la madera, seguido por la degradación completa de la celulosa y la hemicelulosa. Como resultado de este proceso, la madera remanente consiste casi enteramente en lignina modificada, la cual tiene una coloración marrón-rojiza, y suele partirse en piezas con forma cúbica (**Fig. 12**). Algunos de los Basidiomycota causantes de pudrición castaña más estudiados son *Postia placenta*, *Fomes fomentarius*, *Serpula lacrymans* y *Gloeophyllum trabeum*. Estos hongos crecen principalmente en el lumen de las células de la madera y tienen un rol muy importante en los bosques de coníferas dado que contribuyen en forma significativa a la formación de humus, que puede ser utilizado por otros microorganismos (Lundell *et al.*, 2010). Este tipo de pudrición disminuye la integridad estructural de las maderas y genera grandes pérdidas de resistencia, incluso en etapas tempranas del proceso de descomposición.



Figura 12: Madera atacada por un hongo causante de pudrición marrón. Fuente: www.uspest.com

1.2.3. Pudrición blanda

Este tipo de pudrición es característica de hongos Ascomycota y se puede clasificar en dos tipos: (i) tipo 1, en la cual el hongo forma cavidades longitudinales dentro de la pared secundaria de la célula vegetal y (ii) tipo 2, en donde la pared secundaria es enteramente atacada (con remoción selectiva y localizada de la capa S2 de la pared secundaria, dejando LM y S3 intactas). Luego de ser degradada, la madera adquiere una apariencia blanda y débil, la superficie del material resultante tiene una textura esponjosa (**Fig. 13**). Aunque existen trabajos donde afirman que este tipo de pudrición sólo se produce en ambientes húmedos, actualmente se sabe que también puede ocurrir en ambientes secos. Aunque en este último caso la apariencia macroscópica de la madera es indistinguible de la de una pudrición castaña.



Figura 13: Madera ataca por un hongo causante de pudrición blanda. Fuente: www.failuremechanisms.wordpress.com

Las principales diferencias con la pudrición blanca es que en la pudrición blanda no es atacada la laminilla media y no están involucradas las ligninasas. Las únicas enzimas responsables de la degradación son celulasas y hemicelulasas (Kubicek, 2013).

1.3. Enzimas extracelulares involucradas en la degradación de materiales lignocelulósicos.

1.3.1. Enzimas celulolíticas.

La hidrólisis de la celulosa involucra la acción de tres grupos principales de enzimas: endoglucanasas (endo-1,4- β -glucanasas, EC 3.2.1.4), exoglucanasas (celobiohidrolasas (CBH), EC 3.2.1.91 y exoglicohidrolasas, EC 3.2.1.74) y β -glucosidasas (EC 3.2.1.21), las cuales actúan sinérgicamente (Eriksson & Wood, 1985) (**Fig. 14**).

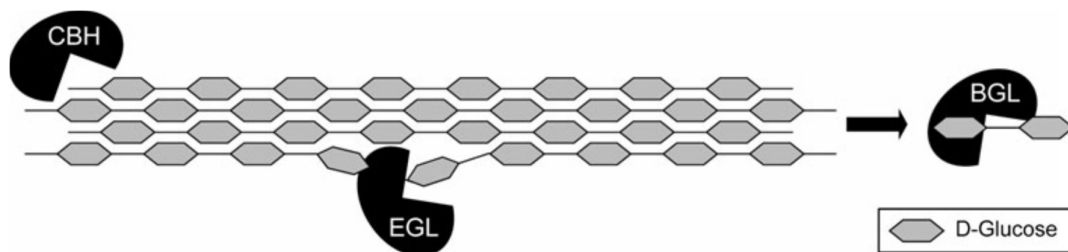


Figura 14: Esquema de la celulosa y las principales enzimas celulolíticas. BGL: β -glucosidasa, CBH: celobiohidrolasa, EGL: β -1,4-endoglucanasa.

Las celobiohidrolasas y las exoglicohidrolasas clivan la molécula de celulosa por uno de los extremos del polímero (en general el extremo no reductor) liberando una molécula de celobiosa o glucosa respectivamente, mientras que las endoglucanasas producen rupturas al azar dentro de la cadena. Este modo de ataque apunta a aumentar la eficiencia de la degradación, ya que la acción de las endoglucanasas provee mayor número de extremos libres para que actúen las exoglucanasas, de este modo, la presencia simultánea de estos dos tipos de enzimas incrementa la tasa de hidrólisis (Wood & McCrae, 1972). Como resultado se producen oligosacáridos de

diferente tamaño y celobiosa. Ésta última es hidrolizada por las β -glucosidasas liberando moléculas de glucosa (Woodward & Wiseman, 1982). Aparentemente los hongos productores de pudrición castaña no producen exoglucanasa (Highley, 1975), pero cuentan con otros mecanismos no enzimáticos que involucran la acción de H_2O_2 y Fe (II) (Coughlan & Ljungdahl, 1988; Wood & García Campayo, 1990). También se conoce la existencia de otras actividades enzimáticas auxiliares en la degradación de la celulosa con distintas funciones accesorias como la de no permitir que las uniones β -1,4-glicosídicas se vuelvan a formar luego de haber sido clivadas por la acción de las endoglucanasas o la de remoción de productos finales que puedan provocar represión catabólica o inhibición de la actividad de las enzimas principales (Bao *et al.*, 1993; Schmidhalter & Canevascini, 1993; Roy *et al.*, 1994). Dos de estas enzimas son la celobiosa deshidrogenasa (CDH, EC 1.1.99.18) y la celobiosa quinona oxidoreductasa (CQB, EC 1.1.5.1) (Bao & Renganathan, 1992; Bao *et al.*, 1993).

Uno de los hongos degradadores de celulosa más eficiente es *Trichoderma reesei*. Posee cinco β -1,4-endoglucanasas pertenecientes a las familias GH5, GH7, GH12 y GH45, dos exoglucanasas/celobiohidrolasas en las familias GH6 y GH7 y dos β -glucosidasas en las familias GH1 y GH3 (Martinez *et al.*, 2008; Kubicek *et al.*, 2011). EGI (GH7) y EGII (GH5) son las β -1,4-endoglucanasas más abundantemente producidas por *T. reesei* (Foreman *et al.*, 2003; Vlasenko *et al.*, 2010). Ambas enzimas tienen un módulo de unión a carbohidratos que aumenta fuertemente la eficiencia en la degradación de las microfibrillas de celulosa (Beckham *et al.*, 2010; Guillen *et al.*, 2010). EGIII (GH12) es expresada en menores niveles que EGI y EGII pero tiene una amplia actividad sobre celulosa, β -1,3-1,4-glucano, xiloglucano y xilano (Sprey & Bochem, 1993; Eriksson *et al.*, 2002).

Las dos exoglucanasas/celobiohidrolasas (CBHs) principales de *T. reesei*, CBHI y CBHII, pertenecen a las familias 7 y 6, respectivamente. Se considera que estas dos enzimas trabajan en forma sinérgica y tienen preferencia por el extremo reductor o no reductor, respectivamente, de la cadena de celulosa (Nutt *et al.*, 1998). Las CBHs también se consideran importantes en la hidrólisis de las regiones cristalinas de la celulosa (Liu *et al.*,

2011). Son altamente sensibles a la inhibición por producto, en particular por la celobiosa, lo cual explicaría la necesidad de una gran cantidad de CBHs para lograr una mezcla de enzimas celulolíticas fúngicas efectiva (Holtzapple *et al.*, 1990; Bezerra & Dias, 2005; Kristensen *et al.*, 2009).

Las dos β -glucosidasas conocidas de *T. reesei*, BGI y BGII, son producidas en bajos niveles (Reczey *et al.*, 1998) y están fuertemente sujetas a la inhibición por producto (Chen *et al.*, 1992). Esta característica significa un obstáculo para su utilización industrial en la sacarificación *in-vitro* de la celulosa, es por ello que las mezclas de celulasas de *T. reesei* utilizadas en la industria son a menudo suplementadas con β -glucosidasas de *Aspergillus* (Reczey *et al.*, 1998; Riou *et al.*, 1998; Decker *et al.*, 2000).

Teóricamente, estas hidrolasas son suficientes para degradar la celulosa completamente hasta glucosa, incluso la celulasas comerciales incluyen en su fórmula estas enzimas en proporciones variables. Sin embargo, la porción cristalina de la celulosa sólo es parcialmente atacada por enzimas hidrolíticas y en la práctica su degradación es lenta e incompleta. Por este motivo se postuló, ya hace algunos años, que para que ocurriera una completa degradación de la celulosa debían estar presentes otros componentes enzimáticos (Eriksson *et al.*, 1974).

Recientemente se descubrió una familia de enzimas oxidativas que juegan un papel muy importante en la degradación de polisacáridos cristalinos. Algunas de estas enzimas habían sido previamente clasificadas incorrectamente como endoglucanasas y asignadas a la familia GH61 de glucósido hidrolasas, basándose en que poseían una débil actividad endoglucanasa (Karlsson *et al.*, 2001).

Estas nuevas enzimas fueron llamadas monooxigenasas polisacárido-líticas (LPMOs), término sugerido por Horn *et al.* (2012). Las LPMOs comprenden 3 familias, aunque sólo algunos ejemplos en dos de ellas fueron caracterizados en detalle. La primera familia contiene sólo enzimas fúngicas pertenecientes a la antigua familia de glucósido hidrolasas 61 (GH61). La segunda familia, antes conocida como módulo 33 de unión a carbohidratos (CBM33), está dominada por enzimas de origen bacteriano y viral, aunque

también se han reportado en ella algunas pocas enzimas de eucariontes (el hongo *Sporisorium reilianum* y el helecho *Tectaria macrodonta*) (Carbohydrate Active Enzymes database, <http://www.cazy.org>) (Lombard *et al.*, 2014). La tercera familia se ha descrito recientemente y comparte importantes características con las dos familias citadas anteriormente. El único miembro caracterizado hasta el momento proviene de *Aspergillus oryzae* y demostró poseer actividad quitinolítica.

Las bases de datos genómicos revelan que secuencias relacionadas están muy representadas en los genomas de los Ascomycota, pero son menos comunes entre los Basidiomycota (Hemsworth *et al.*, 2014).

Actualmente, en la base de datos CAZy, las LPMOs se clasifican como: familia con actividad auxiliar 9 (AA9, anteriormente GH61), familia con actividad auxiliar 10 (AA10, anteriormente CBM33) y familia con actividad auxiliar 11 (AA11) (Cantarel *et al.*, 2009; Levasseur *et al.*, 2013; Lombard *et al.*, 2014).

En cuanto a la estructura de estas proteínas, en los últimos años se han resuelto varias de ellas pertenecientes a las familias AA9 y AA10 (Harris *et al.*, 2010; Quinlan *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012; Kolstad *et al.*, 2012; Wong *et al.*, 2012; Hemsworth *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2013; Vaaje-Forsberg *et al.*, 2014). La estructura de la enzima de *Neurospora crassa* Q7SA1 es la representante de las enzimas pertenecientes a la familia AA9. Todas las LPMOs con estructuras solucionadas hasta el momento son proteínas de dominio único, excepto una proteína de *Vibrio cholerae* inusual que contiene tres dominios.

Estas enzimas poseen una superficie plana con varios residuos aromáticos y polares que forman un “parche” de unión a celulosa. Esto se considera un rasgo característico de los LPMOs. Por otro lado, también comparten un sitio conservado de unión a cobre expuesto en esta superficie (Quinlan *et al.*, 2011).

Se ha demostrado que estas proteínas actúan sinérgicamente junto con las celulasas “clásicas” y que esta sinergia depende en gran medida del sustrato, específicamente de la accesibilidad a la celulosa cristalina y al tipo de celulosa (Hu *et al.*, 2014). En condiciones apropiadas estas enzimas realizan clivajes oxidativos en las regiones cristalinas, atacando los carbonos en

posición C1 o C4 de la molécula de celulosa (**Fig.15**). Las AA9 sólo son activas sobre celulosa y parecen ser más versátiles, en comparación con las AA10, en cuanto a cuál átomo de C es oxidado. Se ha reportado la liberación de oligómeros pares e impares por la misma enzima AA9 (Vaaje-Kolstad *et al.*, 2010).

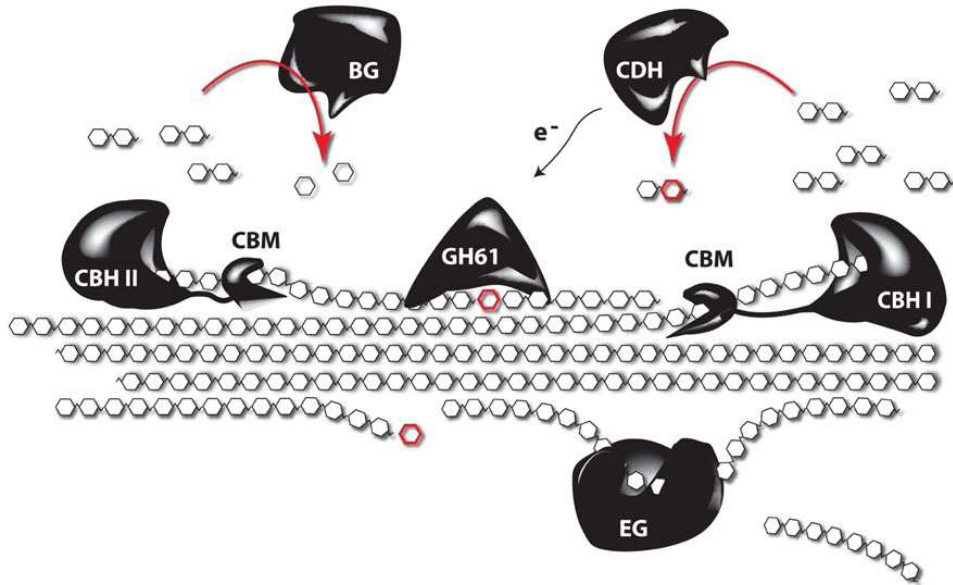


Figura 15: Función sinérgica de las diferentes enzimas encargadas en la degradación de la celulosa cristalina. La despolimerización completa de celulosas se obtiene por la acción sinérgica de varias enzimas. Las endoglucanasas (EG) clivan los enlaces internos en sitios amorfos creando nuevos extremos de la cadena. Las exocelulasas o celobiohidrolasas (CBH) clivan dos unidades de los extremos del polímero de celulosa, liberando los disacáridos (celobiosa). Existen dos tipos de CBH: las que trabajan desde el extremo reductor (CBH I), y las que trabajan desde el extremo no reductor de la celulosa (CBH II). Las β -glucosidasas (BG) hidrolizan los oligosacáridos produciendo monosacáridos. A su vez, la celobiosa deshidrogenasas (CDH) utiliza una molécula aceptora para oxidar celobiosa. Los electrones liberados pueden ser utilizados por polisacárido-monooxigenasas para despolimerizar celulosa cristalina a través de una eliminación reductora. La mayoría de las enzimas están acoplados a módulos de unión a carbohidratos (CBM) que no tienen actividad catalítica, pero asegurar la unión del dominio catalítico al polisacárido (basado en Horn *et al.*, 2012).

El análisis de los productos de reacción reveló una oxidación del extremo C1 reductor que conduce a una aldonolactona, la cual sufre posteriormente una apertura espontánea del anillo formando ácido aldónico. Esta parece ser la actividad principal de las LPMOs AA9 (Phillips *et al.*, 2011; Quinlan *et al.*, 2011). La oxidación del C4 que lleva a la producción de una 4-cetoaldosa (que es estable como su cetala) ha sido demostrada para algunas enzimas AA9, y unas pocas son capaces de oxidar ya sea el carbono en la posición C1 o C4 (Beeson *et al.*, 2012; Vu *et al.*, 2014). Se han reportado casos de enzimas AA9 capaces de oxidar en la posición C6 pero los resultados de estos estudios no son concluyentes y esta actividad no ha sido confirmada (Quinlan *et al.*, 2011; Bey *et al.*, 2013).

Por otro lado, ha sido demostrado que la actividad de las enzimas AA9 depende de un cofactor reductor que se encuentra ausente en la celulosa pura (Quinlan, 2011). Varios agentes reductores como ácido ascórbico, glutatión reducido y ácido gálico han sido utilizados en estudios *in-vitro*, aunque no ha sido establecida ninguna preferencia por parte de la enzima hacia estos donantes de electrones (Quinlan *et al.*, 2011; Westereng *et al.*, 2011; Forsberg *et al.*, 2014). Actualmente se desconoce si alguno de estos agentes reductores es activo *in-vivo*. El ácido gálico es un componente de la madera (Laks & Hemingway, 1992) y el glutatión y el ascorbato pueden ser producidos por hongos (Petrescu *et al.*, 1992; Pocsi *et al.*, 2004). Por lo que podrían ser candidatos viables a donantes de electrones. También han sido sugeridos componentes de sustratos complejos, como la lignina, como posibles donantes de electrones (Cannella *et al.*, 2012; Dimarogona *et al.*, 2012).

Además, la enzima celobiosa deshidrogenasa (CDH) al parecer también juega un papel importante en la degradación oxidativa de la celulosa. Esta enzima es secretada por muchos hongos causantes de pudrición blanca, pero sólo por pocas especies causantes de pudrición marrón (Floudas *et al.*, 2012). En estudios de expresión génica se descubrió que CDHs y AA9s son coexpresadas con frecuencia, lo que sugiere que estas enzimas podrían trabajar juntas (Wymelenberg *et al.*, 2010; Yakovlev *et al.*, 2012). Un indicio de este sinergismo se obtuvo al demostrar que una AA9 de *Thermoascus*

aurantiacus combinada con una CDH de *Hemicola insolens* aumentaban en gran medida la degradación de celulosa por parte de las celulasas “clásicas”. Incluso se encontró que una β -glucosidasa sólo contribuye a la degradación de celulosa en presencia de AA9 y CDH (Langston *et al.*, 2011). Más aún, sólo la combinación de AA9 y CDH producidas en forma heteróloga llevó a la formación de productos oxidados a partir de celulosa hinchada con ácido fosfórico, mientras que su producción resultó insignificante cuando sólo una de las dos enzimas fue añadida a la reacción (Bey *et al.*, 2013). Aún no está claro de qué modo la CDH colabora con las proteínas AA9, se ha propuesto que el dominio hemo de CDH serviría como donante de electrones para reducir el cobre unido a la enzima AA9 de cobre(II) a cobre(I), que luego se uniría a O₂ y, mediante un reordenamiento intramolecular, se formaría un intermediario superoxo-Cu(II) que atacaría a la celulosa en el carbono C1 o C4 (Phillips *et al.*, 2011). Otros autores han sugerido que se formaría un radical oxilo-Cu(II) en lugar del complejo superoxo-Cu(II) (Kim *et al.*, 2014) (**Fig. 16**).

Por otro lado, se han descubierto hace relativamente poco tiempo dos nuevas enzimas denominadas expansinas y swolleninas, implicadas en la expansión de las microfibrillas de celulosa para facilitar la entrada de otras celulasas. Las expansinas fueron descritas en primer lugar en plantas y actualmente se sabe que juegan un papel clave en la pérdida de la estructura de la pared celular vegetal durante su crecimiento, permitiendo así su extensión (McQueen-Mason *et al.*, 1992, Li *et al.*, 1993). Estas enzimas actúan rompiendo los puentes de hidrógeno existentes entre las microfibrillas de celulosa o entre las microfibrillas y otros polisacáridos de la pared celular sin que medie actividad hidrolítica alguna (McQueen-Mason y Cosgrove, 1994). También se las ha asociado con otros procesos como la maduración de frutos, formación del tubo polínico, germinación y abscisión (Li *et al.*, 2003).

Como se mencionó anteriormente, estas enzimas colaboran con otras celulasas remodelando la pared vegetal para facilitar su posterior degradación. Las expansinas aumentan la extensión y relajan la pared celular (Quiroz-Castañeda & Folch-Mallol, 2011). Recientemente Wei *et al.* (2010) reportó que

las α -expansinas actúan en forma sinérgica con pectin liasas rompiendo los puentes de hidrógeno existentes entre la pectina y los xiloglucanos.

Se han identificado cuatro subfamilias de expansinas, α -expansinas (EXPA), β -expansinas (EXPB), α -expansinas like-proteins (EXLA) y β -expansinas like-protein (EXLB). La familia EXPA incluye proteínas que participan en la elongación y relajación de la pared celular vegetal a través de un mecanismo pH dependiente. Estas proteínas participarían en procesos de desarrollo como la organogénesis y la maduración de los frutos (Cho & Cosgrove, 2002). La familia EXPB incluye un tipo relativamente conocido de expansinas denominadas Alergenos de Polen Grupo 1, que se expresan abundantemente en el polen de gramíneas y causan asma estacional. Su función biológica es debilitar las paredes celulares de las células del estigma y el estilo, permitiendo la penetración del tubo polínico (Yennawar *et al.*, 2006). Las proteínas EXPB, a diferencia de las EXPA, relajan específicamente las paredes celulares de las gramíneas, probablemente reflejando las diferencias en cuanto a la organización de estas paredes entre gramíneas y plantas dicotiledóneas (Cosgrove *et al.*, 1997). Las expansinas pertenecientes a las subfamilias EXLA y EXLB difieren en cuanto a su estructura molecular de las EXPA y EXPB, lo cual sugiere que su modo de acción sería distinto (Sampedro & Cosgrove, 2005).

Las swolleninas se han identificado más recientemente en los hongos *Trichoderma* y *Aspergillus* (Saloheimo *et al.*, 2002; Brotman *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010), estas proteínas tienen una actividad similar a las expansinas. El gen de la swollenina de *T. reesei* denominado *swo1* fue clonado y expresado en *S. cerevisiae* (Saloheimo *et al.*, 2002). Este gen codifica para una proteína que modifica la estructura de la celulosa “hinchando” regiones de la fibra de algodón sin la liberación de azúcares reductores. Otra swollenin descrita en *T. asperillum* (Brotman *et al.*, 2008) tiene un importante rol en el proceso de colonización de raíces de pepino, dado que su sobreexpresión aumenta considerablemente la tasa de colonización.

Las expansinas y las swollenina pueden ser utilizadas para mejorar la eficiencia en procesos de bioconversión de celulosa. La swollenina purificada de *Aspergillus fumigates* ha sido utilizada en combinación con otras celulasas para facilitar la sacarificación de celulosa cristalina (Avicel). Recientemente fue

clonada del Basidiomycota *Bjerkandera adusta* una nueva proteína con actividad expansina denominada “loosenin” (LOOS1), ésta es capaz de relajar la estructura de las fibras de algodón aumentando hasta 7.5 veces de liberación de azúcares reductores de las fibras de Agave tequilana (Quiroz-Castañera *et al.*, 2011). Esta nueva proteína podría tener aplicaciones en el proceso de sacarificación de sustratos naturales ya que dado su pH óptimo (pH 5) puede ser utilizada junto con celulasas y expansinas.

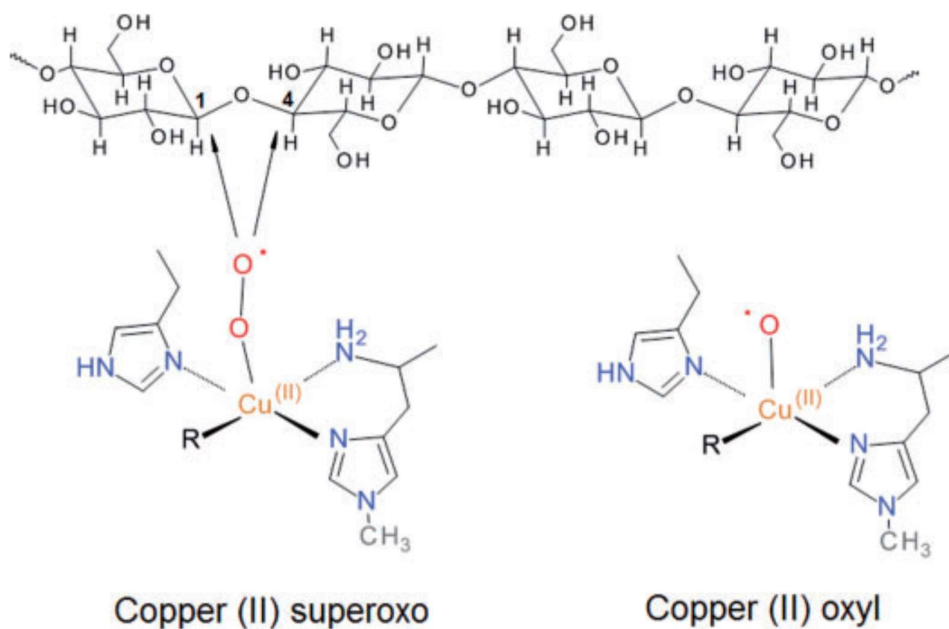


Figura 16: Especies reactivas de oxígeno propuestas generadas por enzimas LPMO. Las flechas indican los sitios de ataque a la celulosa observados para diferentes LPMOs (fuente: Morgenstern *et al.*, 2014)

1.3.2. Enzimas xilanolíticas

Como ya se mencionó anteriormente, las hemicelulosas estas compuestas por diferentes residuos con tres tipos de esqueletos principales y diferentes ramificaciones. Cada uno de los tres tipos de esqueleto principal es

hidrolizado por un grupo específico de enzimas: β -1,4-endoxilanasas y β -1,4-xilosidasas para el xilano, β -1,4-endoglucanasa y β -1,4-glucosidasas para el xiloglucano, y β -1,4-endomanasa y β -1,4-manosidasas para el manano (de Vries & Visser, 2001) (**Fig. 17**).

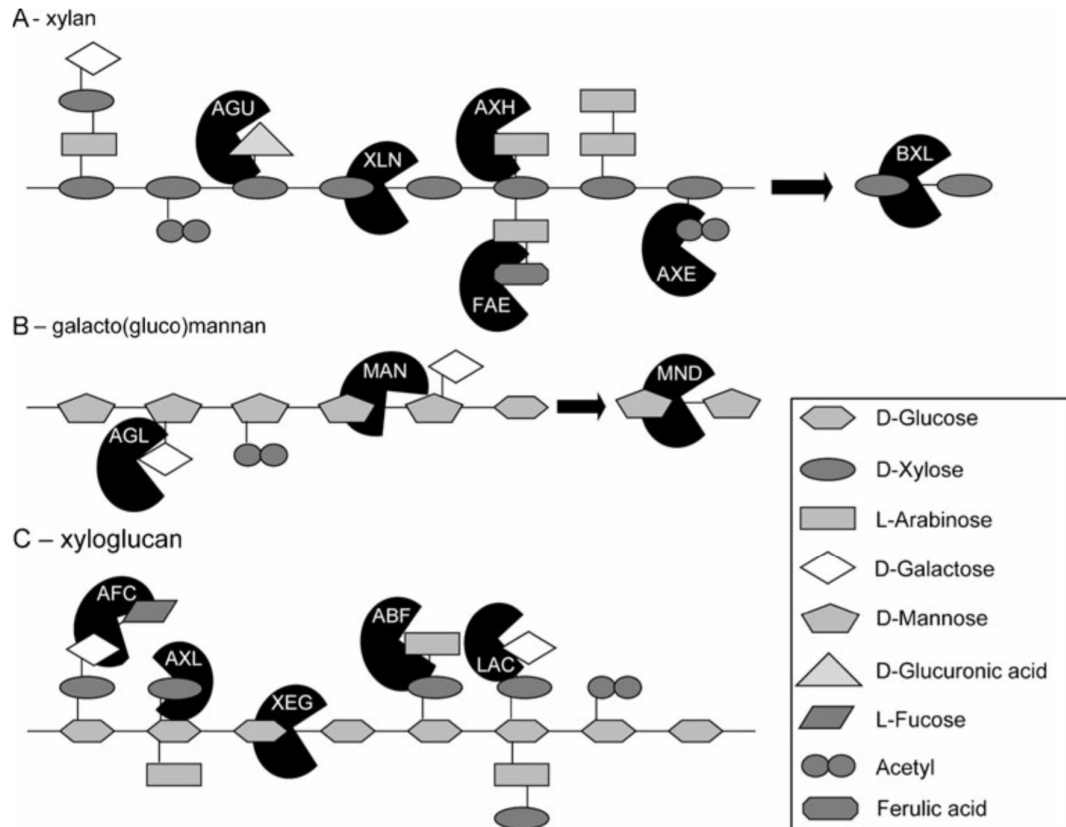


Figura 17: A-C Esquema de las estructuras de las tres hemicelulosas: xilano, xiloglucano y manano con las enzimas hemicelulolíticas. ABF α -arabinofuranosidasa, AFC α -fucosidasa, AGL α -1,4-galactosidasa, AGU α -glucuronidasa, AXE acetil (xilano) esterasa, AXH arabinoxilano α -arabinofuranohidrolasa, AXL α -xilosidasa, BXL β -1,4-xilosidasa, FAE feruloil esterasa, LAC β -1,4-galactosidasa, MAN β -1,4-endomananasa, MND β -1,4-manosidasa, XEG xiloglucano β -1,4-endoglucanasa, XLN β -1,4-endoxilanasas. Fuente: de Vries & Visser (2001).

Las β -1,4-endoxilanasas fúngicas pertenecen a las familias 10 y 11 (Polizeli *et al.*, 2005), estos dos grupos de endoxilanasas se diferencian en su especificidad de sustratos (Biely *et al.*, 1997). Las endoxilanasas de la familia GH10 en general tiene un rango de sustratos más amplio que las endoxilanasas de la familia GH11. Las primeras no sólo degradan cadenas lineales de residuos de 1,4-D-xilosa sino también esqueletos principales con un alto grado de sustituciones, y pequeños xilo-oligosacaridos (Biely *et al.*, 1997; Vardakou *et al.*, 2003; Pollet *et al.*, 2010). Por lo tanto, las endoxilanasas GH10 cumplen también un papel importante en la degradación de xilanos sustituidos.

Los xilo-oligosacaridos liberados por las endoxilanasas son degradados por β -xilosidasas. La mayoría de las β -xilosidasas fúngicas pertenecen a la familia GH3 (Mozolowki & Connerton, 2009), aunque muchas también son asignadas a la familia GH43 (por ejemplo, en *Penicillium herquei* y *A. oryzae*) (Ito *et al.*, 2003; Machida *et al.*, 2005).

Las xiloglucanasas pertenecen a las familias GH12 y GH 74 (Grishutin *et al.*, 2004). La principal diferencia entre estas familias es su retención y su mecanismo de inversión (Gilbert *et al.*, 2008). El modo específico de acción de las diferentes xiloglucanasas fue recientemente elucidado (Desmet *et al.*, 2007; Master *et al.*, 2008; Powlowski *et al.*, 2009; Yaoi *et al.*, 2009). Por ejemplo, la xiloglucanasa GH12 de *A. niger*, a diferencia de la GH74 de *T. reesei*, no cliva residuos ramificados de glucosa, sino que muestra predilección por xiloglucano-oligosacaridos que contengan más de seis residuos de glucosa con, al menos, un residuo de glucosa no ramificado (Desmet *et al.*, 2007; Master *et al.*, 2008).

Las endomananasas, involucradas en la degradación de manano, pertenecen a las familias GH5 y GH26, aunque las endomananasas fúngicas se encuentran predominantemente en GH5. Las endomananasas GH5 de *A. niger* y *T. reesei* muestran una especificidad de sustrato hacia mano-oligosacaridos con más de tres residuos de D-manosa (Tenkanen *et al.*, 1997; Do *et al.*, 2009). Las manobiosas y manotriosas liberadas son degradadas posteriormente por β -1,4-manosidasas pertenecientes a la familia 2 (Ademark *et al.*, 2001).

La L-arabinosa, un residuo común en la hemicelulosa, es clivado a partir de xiloglucanos arabino-sustituídos y arabino-xilano por α -arabinofuranosidasas y arabinoxilano arabinofuranohidrolasas. Las α -arabinofuranosidasas se encuentran principalmente dentro de las familias GH51 y GH54, aunque en algunas enzimas bifuncionales de las familias GH3 y GH43 ha sido descrita la actividad α -arabinofuranosidasa (Saha, 2000; Ravanal *et al.*, 2010).

Los residuos de D-xilosa con uniones α - son liberados del esqueleto de xiloglucano por α -xilosidasas. De las dos α -xilosidasas conocidas en *Aspergillus flavus*, Ax1I hidroliza oligosacáridos de xiloglucano y Ax1II es más activa sobre residuos de *p*-nitrofenil α -xilosa y no hidroliza xiloglucano (Yoshikawa *et al.*, 1993; 1994). Basándose en análisis genómicos dentro del género *Aspergillus*, se ha sugerido que las α -xilosidasas pertenecen a la familia GH13 (de Vries *et al.*, 2005; Bauer *et al.*, 2006).

Los residuos de L-fucosa en las ramificaciones del xiloglucano son removidos por α -fucosidasas pertenecientes a las familias GH9 y GH95. Se han identificado varias α -fucosidasas en plantas capaces de degradar xiloglucano (Minic & Jouanin, 2006; Ishimizu *et al.*, 2007; Leonard *et al.*, 2008), sin embargo sólo *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans* y *Penicillium multicolor* se han reportado como productores de una α -fucosidasa que libera residuos de L-fucosa similares a la fucosa unida al xiloglucano (Ajisaka & Shirakabe, 1992; Ajisaka *et al.*, 1998; Bauer *et al.*, 2006).

Los residuos de α -D-galactosa son liberados de la hemicelulosa por α -galactosidasas pertenecientes a las familias GH27 y GH36. Algunas de las enzimas de la familia GH27 también muestran actividad α -N-acetilgalactosaminidasa y debido a ello se ha argumentado que algunas α -galactosidasas GH27 no estarían involucradas en la degradación de la hemicelulosa (Kulik *et al.*, 2010).

Los residuos de ácido D-glucurónico provenientes del xilano son liberados por α -glucuronidasas pertenecientes a la familia GH67 y a la recientemente identificada familia GH115 (Ryabova *et al.*, 2009; Chong *et al.*, 2011). Al igual que en otras familias de enzimas degradadoras de carbohidratos, la diferencia entre ambas familias de α -glucuronidasas yace en

su especificidad de sustrato. Mientras que las α -glucuronidasas GH67 son activas sobre oligosacáridos cortos, algunas α -glucuronidasas GH115 lo son sobre el xilano polimerizado (Tenkanen & Siika-aho, 2000; Chong *et al.*, 2011). Interesantemente, las α -glucuronidasas GH67 sólo fueron encontradas en Ascomycota mientras que las α -glucuronidasas GH115 se encuentran tanto en Ascomycota como Basidiomycota (Chong *et al.*, 2011).

Los residuos de acetil de la cadena de xilano son clivados por acetilxilano esterasas pertenecientes a las familias CE 1, 4, 5 y 16 (Biely *et al.*, 2011). La presencia de estas acetilxilano esterasas es esencial para la degradación eficiente del esqueleto de xilano por las endoxilanasas. Por ejemplo, en *A. niger* sólo la presencia de la acetilxilano esterasa hace posible la degradación de madera de Abedul por parte de las tres endoxilanasas y la β -xilosidasa presentes en este hongo (Kormelink *et al.*, 1993).

Los ácidos p-cumárico y ferúlico (dos ácidos presentes en el xilano) son removidos por la acción de feruloil/p-cumaroil esterasas. La mayoría de estas esterasas aún no han sido asignadas a una familia de carbohidratoesterasas CE, sin embargo, se han reportado algunas clasificaciones de estas enzimas basándose en similitudes en su secuencia y en su especificidad de sustratos (Crepin *et al.*, 2004; Benoit *et al.*, 2008; Olivares-Hernandez *et al.*, 2010).

1.3.3. Enzimas pectinolíticas

Como se mencionó anteriormente, algunas regiones de la cadena principal de pectina pueden tener un aspecto “piloso” (debido principalmente a cadenas laterales formadas por residuos de L-arabinosa y D-galactosa). Las diferencias estructurales entre estas regiones “pilosas” y las regiones “lisas” hacen que sean necesarias distintas enzimas para su degradación. El esqueleto principal de las regiones lisas puede ser fácilmente hidrolizado por enzimas capaces de clivar el enlace entre los residuos de α -1,4-galacturonato, mientras que la hidrólisis de las regiones “pilosas” necesita de enzimas accesorias.

Dado que la unidad de construcción de la pectina es un azúcar ácido, el enlace glicosídico puede no sólo ser hidrolizado (utilizando poligalacturonasas, EC 3.2.1.15 y 3.2.1.67) sino también clivado de un modo no hidrolítico por β -eliminación por medio de pectin-liasas (EC 4.2.2.1) y pectato-liasas (EC 4.2.2.2) (Kubicek, 2013).

Degradación hidrolítica de la pectina

Las poligalacturonasas son enzimas con acción endo y exo, comprendidas dentro de la familia GH28 de las glicosil hidrolasas. Están presentes en todos los hongos, pero las mayormente estudiadas pertenecen a *A. niger* y *Rhizopus oryzae* (porque las enzimas de estos dos hongos son muy utilizadas en la industria alimenticia), y las de algunos hongos patógenos de plantas (de Vries & Visser, 2001; Lara-Márquez *et al.*, 2011), ya que la acción de estas enzimas promueve la invasión de los tejidos vegetales. También son importantes en los procesos de pudrición de frutas y verduras (Voragen & Pilnik, 1989; Bailey & Pessa, 1990).

El genoma de *A. niger* contiene siete endopoligalacturonasas, cada una de las cuales exhibe distintas propiedades cinéticas, modo de acción y sensibilidad ante la presencia de grupos metilados en la pectina. Por ejemplo, aunque la estructura de las poligalacturonasas Pgal y PgalI es similar, sólo Pgal tiene un modo de acción procesivo. Esto es debido a que contiene un sitio de unión al sustrato más estrecho y hendido con un residuo R en la posición 96, el cuál juega un rol crucial en el comportamiento procesivo ya que aporta flexibilidad y es capaz de unirse a átomos de oxígeno en varias conformaciones de ácido galacturónico. Al unirse este residuo R96 al sustrato de ácido galacturónico evita que éste se desprenda de la enzima y al mismo tiempo confiere la flexibilidad suficiente para empujar la cadena de polisacárido hacia el sitio activo (Abbott & Boraston, 2007).

A. niger tiene también cuatro exopoligalacturonasas (PgaX, PgaA, PgaB y PgaC) que difieren en sus actividades sobre homo y xilogalacturonanos.

PgxB solo actúa sobre homogalacturonano, PgxC actúa sobre ambos y PgxA actúa predominantemente sobre xilogalacturonanos (van den Brink & de Vries, 2011).

Las ramnogalacturonano hidrolasas (miembros de la familia GH28) clivan las uniones α -1,2-glicosídicas formadas entre los residuos de ácido D-galacturónico y L-ramnosa en las regiones “pilosas” del polisacárido (van den Brink & de Vries, 2011) (**Fig. 18**).

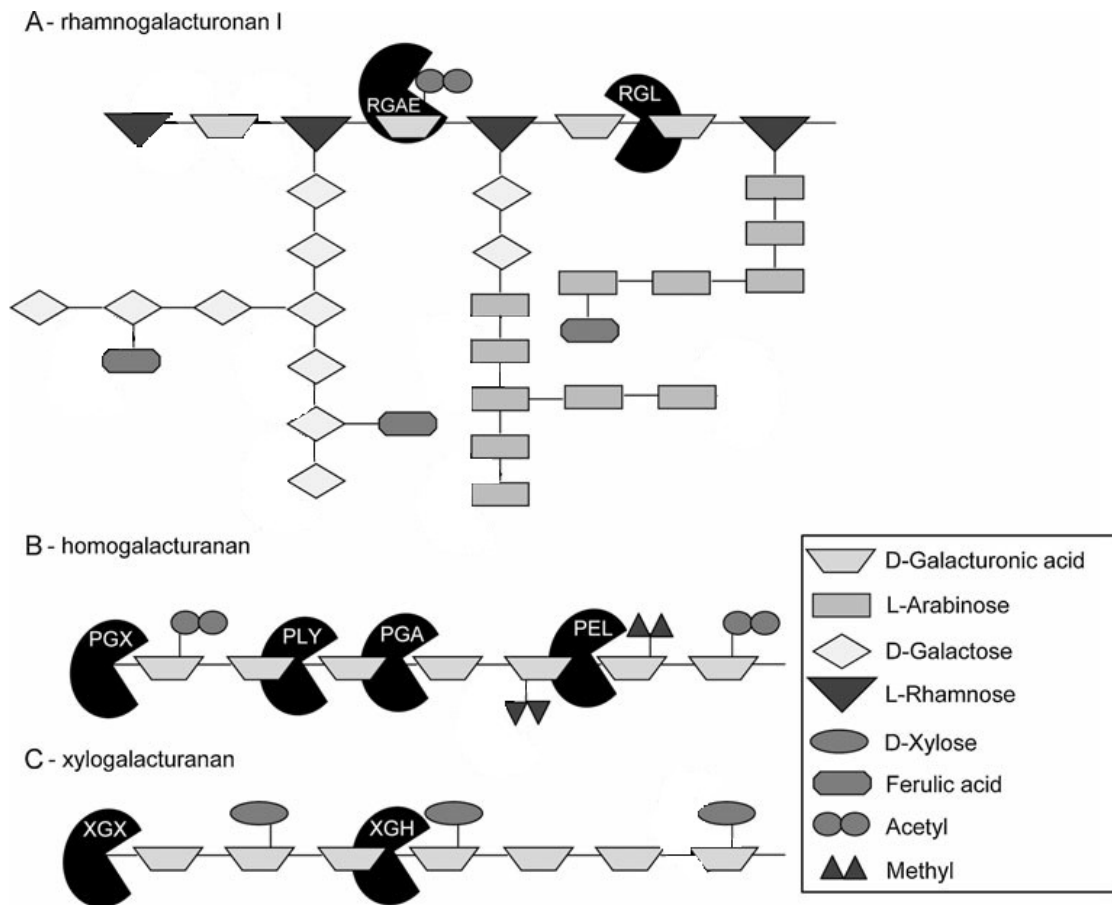


Figura 18: A-C Esquema de las estructuras de las tres pectinas, ramnogalacturonano I, homogalacturonano y xilogalacturonano, con las principales enzimas pectinolíticas. PEL pectin-liasa, PLY pectato-liasa, PGA endopoligalacturonasa, PGX exopoligalacturonasa, PME pectin- metilesterasa,

RGAE ramnogalacturonano acetilsterasa, RGL ramnogalacturonano liasa, XGH endoxilagalacturonasa, XGX exoxilagalacturonasa. Fuente: de Vries & Visser (2001).

Degradación de pectina por β -eliminación

Las polisacarido liasas (PLs; EC 4.2.2.-) son un grupo de enzimas que clivan cadenas de polisacáridos que contienen ácido urónico por medio de un mecanismo de β -eliminación, generando un residuo de ácido hexenurónico insaturado y un nuevo extremo reductor. La base de datos CAZy ha clasificado a estas enzimas en familias y subfamilias basándose en similitudes en su secuencia aminoacídica, que reflejan sus características estructurales y su diversidad (Lombard *et al.*, 2010). Las enzimas pertenecientes a la misma subfamilia mostrarían una misma especificidad por el sustrato. La base de datos PL (en CAZy) lista 21 familias. Las familias PL 1, 3 y 9 contienen pectin/pectato liasas fúngicas y la familia 11 contiene una ramnogalacturonasa liasa fúngica (Lombard *et al.*, 2010).

El esqueleto de homogalacturonanos de la pectina varía en su grado de metilación, desde altamente metilado y relativamente hidrofóbico hasta totalmente demetilado y altamente cargado. La forma altamente metilada es llamada pectina y la forma demetilada pectato. Estas dos formas son clivadas por pectin-liasas y pectato-liasas dependientes de calcio, respectivamente. Ambos tipos de enzimas rompen los enlaces α -1,4 unidos a los residuos de ácido D-galacturónico dentro de las regiones "lisas" de la pectina por medio de un mecanismo de β -eliminación (Lombard *et al.*, 2010).

La comparación entre las estructuras de pectin y pectato liasas indica que ambas descienden de una misma enzima ancestral (Mayans *et al.*, 1997; Vitali *et al.*, 1998). Sin embargo, estos dos tipos de liasas muestran importantes diferencias en su sitio activo. Estas diferencias son responsables de sus diferentes formas de unión al sustrato y del pH óptimo para su actividad: las pectin liasas atacan preferentemente sustratos fuertemente metil-esterificados

y tienen un pH óptimo de alrededor de 5.5, mientras que las pectato liasas atacan sustratos con un bajo grado de esterificación, tienen un pH óptimo de alrededor de 8.5 y necesitan Ca^{+2} para su actividad (Mayans *et al.*, 1997).

Actualmente todas las pectin-liasas caracterizadas pertenecen a la familia PL1 y todas las pectato-liasas a las familias PL1, PL3 y PL9. En *A. niger* han sido identificadas y parcialmente caracterizadas seis pectin-liasas y sólo una pectato liasa, mientras que en *A. nidulans* sólo una pectin-liasa pero 11 pectato liasas, sugiriendo que hay grandes diferencias incluso entre especies del mismo género (Coutinho *et al.*, 2009).

Las ramnogalacturonano liasas difieren sustancialmente en su estructura con pectin y pectato liasas, y clivan enlaces dentro de las regiones “pilosas” de la pectina. Este grupo de liasas pertenecen a dos familias de carbohidrato liasas, PL4 y PL11. Las liasas PL4 tienen un pH óptimo mucho mas bajo de las liasas PL11 (Jensen *et al.*, 2010). La ramnogalacturonasa liasa PL4 de *Aspergillus aculeatus* muestra una preferencia de corte en el cuarto residuo anterior al extremo reductor y resulta seriamente afectada por la presencia de grupos acetilo en el esqueleto de ramnogalacturonano (Mutter *et al.*, 1998; de Vries *et al.*, 2000), lo cual implica que actuaría en cooperación con ramnogalacturonano acetilesterasas para poder degradar eficientemente el ramnogalacturonano (van den Brink & de Vries, 2011).

Las enzimas pectinolíticas son muy utilizadas industrialmente en el procesamiento de frutas para facilitar el prensado y para ayudar a la separación del precipitado floculante por sedimentación, filtración o centrifugación en la extracción de jugo clarificado (Rombouts & Pilnik, 1978). Estas enzimas también son utilizadas en otros procesos donde la eliminación de la pectina es esencial, como la producción de vino, el procesamiento de plantas de té y café, y la maceración de tejidos vegetales (Fogarty & Kelly, 1983; Bigelis, 1991; Boccas *et al.*, 1994; Acuña-Argüelles *et al.*, 1995; Da Silva *et al.*, 1997).

1.3.4. Enzimas ligninolíticas

A diferencia de los polisacáridos presentes en las paredes celulares, la lignina es un polímero de polifenilpropano. Las uniones entre las unidades de la lignina no se deben a la remoción de agua, sino que se producen por medio de oxidaciones, las cuales dan origen a radicales libres que, posteriormente, reaccionan formando enlaces C-O o C-C (Vares, 1996; Deacon, 2005). Consecuentemente la degradación de la lignina no requiere de enzimas hidrolíticas. Debido a la naturaleza de estas uniones, la lignina es una molécula muy recalcitrante. La gran diversidad de uniones y la irregularidad en su estructura hacen que sean necesarias enzimas de baja especificidad que inician, pero no dirigen, las reacciones oxidativas en la lignina. Estas enzimas no degradan el polímero en forma ordenada removiendo unidades periféricas, sino que oxidan al mismo tiempo anillos aromáticos y cadenas laterales propanoides en el interior del polímero, incrementando la solubilidad del núcleo y liberando fragmentos de tamaño variado. Las enzimas activan la lignina para superar un umbral energético a partir del cuál comienza una fragmentación oxidativa, este proceso ha sido llamado “combustión enzimática” (Kirk & Farrel, 1987).

Los únicos organismos capaces de mineralizar totalmente la lignina hasta CO₂ y H₂O son los hongos causantes de pudrición blanca (Buswell & Odier, 1987; Kirk & Farrel, 1987). Las enzimas más populares y más extensamente estudiadas involucradas en su degradación son: lignina peroxidasa (LiP; EC 1.11.1.14), manganeso peroxidasa (MnP; EC 1.11.1.13) y lacasa (EC 1.10.3.2). Sin embargo, hoy en día se conocen muchas más peroxidases fúngicas involucradas en la oxidación de la lignina (Kubicek, 2013), entre ellas la peroxidasa versátil (VP; EC 1.11.1.16) y la peroxidasa decolorante de tintes (Dye decolorizing peroxidase EC 1.11.1.19 DyP) (Sugano, 2009; Hofrichter *et al.*, 2010).

Cada especie de hongo xilófago cuenta con un sistema enzimático para degradar lignina. En este sistema pueden estar presentes todos los componentes enzimáticos nombrados o sólo algunos, y en distintas

combinaciones dependiendo de la especie fúngica, lo cual indica que existe más de una estrategia para degradar la lignina (Hatakka, 1994).

Contribuyen a la degradación de lignina enzimas productoras de peróxido de hidrógeno necesarias para el funcionamiento de las peroxidasas como las extracelulares glioxal oxidasa (GLOX; EC 1.2.3.5) y aril alcohol oxidasa (AAO; EC 1.1.3.7) entre otras; y mecanismos radicalarios no enzimáticos. En *Pleurotus eryngii* se ha comprobado que la AAO genera peróxido de hidrógeno dentro de un sistema cíclico de oxido-reducción de compuestos aromáticos en el que también participan reductasas miceliarias. El peróxido de hidrógeno podría también participar en la degradación de la lignina a través de la generación de otras especies activas de oxígeno, como el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), produciéndose el reciclado del hierro a través del radical superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$) formado en el “redox cycling” de las quinonas (Guillén *et al.*, 1997). Asimismo, intervienen en el proceso actividades reductoras como la celobiosa-quinona oxidoreductasa (CBQ) y celobiosa dehidrogenasa (CDH: producto proteolítico de la celobiosa-quinona-oxidoreductasa) que oxidan celobiosa (a celobionolactona), celodextrinas y otros carbohidratos y reducen quinonas y los radicales fenoxilo producidos por la acción de las ligninasas. Durante la biodegradación de lignina se forman quinonas intermediarias, su reducción promovería la depolimerización como una alternativa a la polimerización. También la CDH está involucrada en la producción de peróxido de hidrógeno y reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} , produce así radicales hidroxilo en reacción tipo Fenton [y estaría involucrada en degradación de celulosa en hongos de pudrición castaña (con CDH, celobiosa, Fe^{3+} y H_2O_2 se demostró depolimerización de carboximetilcelulosa, xilano e incluso lignina sintética marcada)] (Zamocky *et al.*, 2006).

1.3.4.1. Lacasas

Las lacasas (EC 1.10.3.2) pertenecen a la familia de las enzimas multicobre. Su nombre proviene de la planta en donde fueron detectadas por primera vez: *Rhus vernicifera*, cuyo nombre vulgar en inglés es “lacquer tree”

(Wong, 2009). Son polifenoxidasas glicosiladas y catalizan la remoción de un electrón de un grupo fenólico hidroxílico acompañando la reducción de oxígeno molecular a agua y la formación de un radical fenoxi (Thurston, 1994). Normalmente oxidan sólo los compuestos de lignina que contienen grupos fenólicos libres, sin embargo, en presencia del sustrato artificial ABTS [2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)] y otros mediadores también pueden oxidar ciertos compuestos no fenólicos (Martinez *et al.*, 1994; Eggert *et al.*, 1996a; Collins & Dobson, 1997). La mayoría de las lacasas contienen cuatro átomos de cobre localizados en dos centros metálicos (Dooley *et al.*, 1979). En *Trametes hirsuta* se detectó la presencia de cobre y manganeso en una relación 3:1 (Giardina *et al.*, 2010), sin embargo, algunas lacasas “blancas” también han sido descritas, por ejemplo, POXAW1 de *Pleurotus ostreatus*, la cual contiene sólo un átomo de cobre por molécula en lugar de los cuatro usuales. Otras lacasas blancas también fueron purificadas de *Pycnoporus sanguineus*, *T. hirsuta* y *P. radiata* BP-1 1-2.

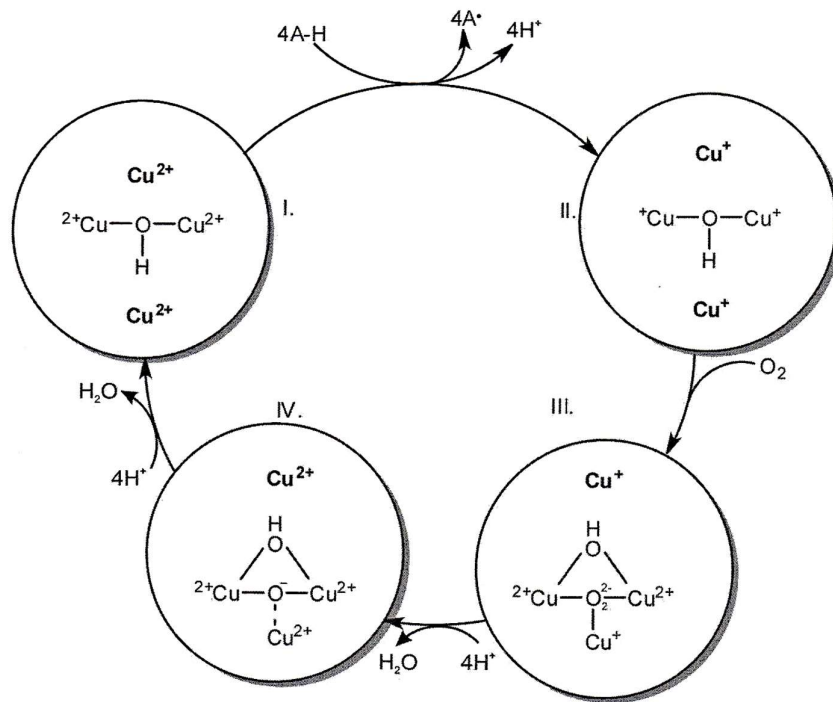


Figura 19: Ciclo catalítico de la lacasa (Fuente: Kubicek, 2013).

Las lacasas cumplen varias funciones en los hongos, incluyendo síntesis de melanina y otros pigmentos, y la formación de estructuras reproductivas como cuerpos fructíferos y conidios (Baldrian, 2006; Giardina *et al.*, 2010).

Se ha puesto en duda la función de las lacasas en la degradación de la lignina en la naturaleza (aunque sí fue ampliamente demostrada *in vitro*) debido a que estas enzimas se encuentran en casi todos los hongos, incluso en aquellos que no son capaces de degradar lignina (por ejemplo, varios Ascomycota (Baldrian, 2006). Por otro lado, algunos hongos causantes de pudrición blanca (Ej: *Pycnoporus cinnabarinus*) sólo producen lacasas y no LiP o MnP, y son degradadores eficientes de lignina (Eggert *et al.*, 1996b).

Estructura génica

La mayoría de los hongos filamentosos conocidos hasta el momento producen varias isoenzimas de lacasa, codificadas por 4, 5 o incluso hasta 8 genes (Yaver & Golightly, 1996; Yaver *et al.*, 1996; Litvintseva & Henson, 2002; Hoegger *et al.*, 2004). En *P. ostreatus* se encontraron 11 (Pezzella *et al.*, 2012) o 12 (Castanera *et al.*, 2012) genes, aunque pocos de ellos han sido aislados y caracterizados (pox1, poxc, poxa1b, poxa3, pox3, pox4 y pox5) (Larraya *et al.*, 2000; Pezzella *et al.*, 2009). Las secuencias aminoacídicas que pueden ser deducidas a partir de los 8 genes de lacasa identificados en *Coprinus cinereus* (*Coprinopsis cinerea*) muestran variaciones de entre 516-567 aminoácidos en la longitud de la proteína (Hoegger *et al.*, 2004), siendo este rango el típico para las lacasas fúngicas. Todas las lacasas contienen un motivo conservado de 10 histidinas y 1 cisteína en su sitio activo (Ducros *et al.*, 1998; Piontek *et al.*, 2002).

Según análisis filogenéticos la mayoría de las enzimas lacasa se encuentran en hongos Basidiomycota (Rodríguez *et al.*, 2008; Lettera *et al.*, 2010), aunque la filogenia de los genes de lacasa no sigue estrictamente la filogenia de las especies, lo que lleva a preguntarnos si estas enzimas evolucionaron de acuerdo al estilo de vida de la especie de hongo

correspondiente o si hay involucrado algún otro factor desconocido (Hoegger *et al.*, 2006). Las secuencias aminoacídicas de lacasas del género *Pycnoporus* muestran hasta un 95% de similitud a pesar de que las especies fueron aisladas en diferentes continentes (Uzan *et al.*, 2010) mientras que el alineamiento de secuencias aminoacídicas de lacasas de *Pleurotus* sólo mostró alrededor del 57% de similitud (Rodríguez *et al.*, 2008).

Los intrones de lacasa fueron caracterizados (Kiiskinen, 2004) y se encontró que tienen una longitud de entre 50-90 pb y se encuentran, en promedio, en número de 8-13. Interesantemente, los genes de lacasa de Ascomycota tienen un número menor de intrones (1-6) que los de Basidiomycota (hasta 19). Con un mayor número de intrones aumentan las posibles variantes de splicing alternativo, sin embargo, hasta el momento no se ha probado que exista splicing alternativo para la lacasa (Janusz *et al.*, 2013).

El genoma de *T. versicolor* fue secuenciado en el trabajo de Floudas *et al.*, 2012, junto con la secuenciación de otros 30 genomas fúngicos.

Región promotora

El estudio de las secuencias de los promotores de varias lacasas remarca la presencia de muchos elementos de respuesta (Piscitelli *et al.*, 2011). Estos elementos de respuesta regularían la transcripción de los genes de lacasa, incluyendo el número de copias de mRNA a generarse (Piscitelli *et al.*, 2011). Todas las regiones promotoras de lacasa identificadas contienen secuencias TATA necesarias para el inicio de la transcripción (Ballance, 1986; Okamoto *et al.*, 2003) y al menos un motivo CAAT, necesario para el control general de la transcripción. La posición de estos elementos difiere entre los distintos genes de lacasas fúngicas (Ballance, 1986).

Dado que la expresión de lacasas es a menudo inducida por varios factores fisiológicos, su región promotora contiene elementos que forman parte del mecanismo de respuesta ante metales (MRE – metal responsive element), xenobióticos (XRE – xenobiotic responsive element), shock térmico (HSE –

heat shock responsive element) o estrés oxidativo (ARE – antioxidant response element) (Januzs *et al.*, 2013). Es posible que la cantidad (hasta 21) y la existencia selectiva de HSE en los diferentes genes de lacasa de un mismo organismo esté determinado por sucesos evolutivos (Soden & Dobson, 2003; Levasseur *et al.*, 2010). La presencia de un MRE en la región promotora indicaría que ese organismo tiene la habilidad para responder ante metales pesados.

El sitio creA (cAMP mediated glucose repression), identificado en *A. nidulans*, interviene en el mecanismo de represión por glucosa y es ampliamente manipulado para aumentar la producción de glucosa (Strong, 2011). Tres elementos de respuesta a cAMP han sido descritos y mapeados en la región río arriba del promotor de lacasa en especies de *Trametes*, lo que sugiere que el rol del cAMP en la regulación transcripcional de lacasa es similar al de la lignin peroxidasa y manganeso peroxidasa (Gallaup *et al.*, 2002b; Xiao *et al.*, 2006).

Regulación

Teniendo en cuenta la gran cantidad de elementos de respuesta hallados en la región promotora de los genes de lacasas es fácil entender porque la transcripción de esta enzima es regulada por una gran cantidad compuestos y nutrientes, aunque en muchas ocasiones esta regulación ocurre a nivel traduccional o post-traduccional (Palmieri *et al.*, 2000; Mouso *et al.*, 2003; Lorenzo *et al.*, 2006; Dekker *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que la lacasa puede ser inducida por colorantes industriales, principalmente xilidina (Collins & Dobson, 1997; Pointing *et al.*, 2000; Min *et al.*, 2001; Elisashvili *et al.*, 2002; Revankar & Lele, 2006; Minussi *et al.*, 2007; Quaratino *et al.*, 2008), ácido ferúlico (Muñoz *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2003), 2,6-dimetoxifenol (Myasoedova *et al.*, 2008), pirogallol (Elisashvili *et al.*, 2010), determinados aminoácidos y vitaminas (Dhawan & Kuhad, 2002), compuestos aromáticos (principalmente vainillina) y metales como cobre,

manganeso y plata (Scheel *et al.*, 2000; Soden & Dobson, 2001; De la Rubia *et al.*, 2002; Galhaup *et al.*, 2002b; Jarosz-Wilkolazka *et al.*, 2002a; Baldrian, 2006, Lorenzo *et al.*, 2006; Manubens *et al.*, 2007; Zeng *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2014a), etanol (Lomascolo *et al.*, 2003) y compuestos fenólicos (Lo *et al.*, 2001; Janusz *et al.*, 2013). El veratril alcohol aumenta la producción de lacasa entre 2 y 200 veces, y el guayacol entre 2 y 232 veces dependiendo de la composición del medio de cultivo utilizado y de la especie (Hou *et al.*, 2004), aunque inhibe su expresión en *P. cinnabarinus* (Eggert *et al.*, 1996b).

De todos ellos, el cobre es el inductor más potente en la mayoría de los hongos causantes de pudrición blanca. La presencia de Cu^{2+} en una concentración de 1.5 mM en cultivos de *Trametes trogii* aumenta hasta 34 veces la actividad lacasa (Yan *et al.*, 2014a). Estudios previos demostraron que la concentración óptima de Cu^{2+} para la producción de lacasa en diferentes especies es muy variable. Las mayores actividades enzimáticas de *T. versicolor* CBS100.29 (Lorenzo *et al.*, 2006), *T. trogii* (Zeng *et al.*, 2011) y *Ganoderma* sp. (Zhuo *et al.*, 2011) fueron obtenidas con concentraciones de 3.5, 1 y 5 mM de Cu^{2+} , respectivamente. Para el caso particular de *T. versicolor*, también se reportaron recientemente otros inductores como el surfactante Tween 80 (Yan *et al.*, 2014b), TNT (2,4,6-trinitrotolueno) (Elisashvili *et al.*, 2010) y Delor 103 (una mezcla comercial de bifenilos policlorados) (Placková *et al.*, 2012). El surfactante Tween 80, además de ser buen inductor también puede actuar como fuente de carbono (Dekker *et al.*, 2007).

La inducción por compuestos aromáticos ocurre a nivel transcripcional y tiene un efecto diferencial no sólo entre hongos de distintas especies sino también en el patrón isoenzimático de un mismo organismo. En *T. versicolor*, el 1-hidroxibenzotriazol y la 2,5-xilidina activan la transcripción de los genes de lacasa *lcc*, mientras que no se observa inducción en presencia de ácido verátrico o ferúlico (Collins & Dobson, 1997). En *Trametes* sp. I-62 nueve compuestos aromáticos estructuralmente similares parecen tener diferentes efectos sobre la expresión genética de la lacasa. Los tres genes de lacasa presentes en este hongo se expresan diferencialmente en respuesta a estos compuestos, con patrones de inducción específicos para cada una de las

moléculas evaluadas (Terrón *et al.*, 2004). En el año 2006 Xiao *et al.* descubrieron tres nuevos genes de lacasa en *Trametes* sp. AH28-2: *lacA*, *lacB* y *lacC*. Diferentes compuestos aromáticos fueron capaces de inducir la producción de distintas isoenzimas de lacasa, la o-toluidina indujo la expresión de *lacA* y el 3,5-dihidroxitolueno indujo principalmente la expresión de *lacB*. El análisis de PCR en tiempo real demostró que la acumulación de transcritos de RNA de lacasa fue acompañada por un incremento en la actividad enzimática en los cultivos (Xiao *et al.*, 2006).

Como se ha mencionado anteriormente, la lacasa puede ser inducida por muchos compuestos, incluyendo algunos metales, sin embargo, un mismo ión metálico puede producir efectos contrarios en distintas especies de hongos, por ejemplo, el Mn^{+2} induce la transcripción de lacasa en *Pleurotus sajor-caju*, *Clitocybula dusenii* y *Nematoloma frowardii* (Scheel *et al.*, 2000; Soden & Dobson, 2001) pero inhibe su expresión en *C. subvermispota* (Manubens *et al.*, 2007).

Teniendo en cuenta que las lacasas (en su mayoría) contienen 4 átomos de cobre esenciales para su actividad, no es sorprendente que éste sea su inductor metálico más potente. En *T. versicolor* la mayor actividad lacasa reportada (10000 U L^{-1}) fue lograda en cultivos adicionados con 1 mM de cobre (Piscitelli *et al.*, 2011). Galhaup & Haltrich (2001) estudiaron el efecto del cobre sobre la producción de lacasa de varias especies de *Trametes*. Encontraron que aumentaba su actividad en *T. versicolor* MB 52, *T. versicolor* MB 54 y *Trametes suaveolens* MB 51, mientras que no se detectó actividad lacasa en estas mismas especies creciendo en medios sin cobre (Galhaup & Haltrich, 2001). El efecto del cobre sobre la síntesis de lacasa no sólo puede ser explicado a nivel transcripcional. También se ha demostrado que este metal en concentraciones de cobre de 1 mM disminuye la actividad proteolítica extracelular, disminuyendo la degradación de lacasa (Palmieri *et al.*, 2001).

También es posible regular la actividad lacasa, e incluso la producción diferencial de isoenzimas, por medio de la composición del medio de cultivo y las condiciones de crecimiento impuestas al hongo (Lorenzo *et al.*, 2002; Moldes *et al.*, 2004; Elisashvili *et al.*, 2008; Levin *et al.*, 2010; Shakhova *et al.*, 2011). La concentración y naturaleza de las fuentes de carbono y nitrógeno, así

como su relación en el medio de cultivo son importantes reguladores de la producción de lacasas. El efecto del nitrógeno es controversial, ya que se han reportado casos en que la actividad es incrementada en condiciones limitantes de N y casos en que ocurre lo contrario (Buswell *et al.*, 1995; Collins & Dobson, 1997; Swamy & Ramsay, 1999; Arora & Rampal, 2002; Levin *et al.*, 2010). En *P. sajor-caju* se registró una inducción diferencial a nivel transcripcional por diferentes fuentes de nitrógeno, los genes *lac2* y *lac4* resultaron positivamente inducidos mientras que no se detectó ningún efecto sobre los genes *lac1* y *lac3* (Soden & Dobson, 2001). En cuanto a las fuentes de carbono, se ha demostrado que la glucosa es eficientemente metabolizada y conduce a la producción de altos niveles de actividad lacasa (Galhaup & Haltrich, 2001). Estudios recientes en *P. ostreatus* IMI 395545 demostraron que, comparada con otras fuentes de carbono, la glucosa resultó la mejor candidata para una alta producción de lacasa (Periasamy & Palvannan, 2010). En algunos hongos se ha encontrado que la expresión de lacasa está sujeta a represión catabólica. Niveles altos de carbono (alrededor de 15 g L⁻¹) inhiben la transcripción de esta enzima en *Trametes pubescens* (Galhaup *et al.*, 2002a) y *Trametes* sp. AH28-2 (Xiao *et al.*, 2006).

El peso molecular de la mayoría de las lacasas fúngicas reportadas oscila entre los 43 y los 110 kDa (Thurston, 1994; Xiao *et al.*, 2003; Gutiérrez-Soto *et al.*, 2011; Martínez-Morales *et al.*, 2015).

Según el trabajo de Lorenzo *et al.*, (2006) en donde se realizaron cromatografías de intercambio iónico con sobrenadantes de cultivos líquidos de *T. versicolor*, fueron resueltos dos picos de actividad lacasa, denominados Lacl y Lacll basándose en el orden de elución. Estos dos picos fueron detectados en todas las condiciones de cultivo ensayadas en el trabajo, y al ser corridos en una electroforesis SDS-PAGE mostraron bandas nítidas de ~65 y ~60 KDa para Lacl y Lacll, respectivamente. Estos autores también notaron que la intensidad de las bandas dependía de la composición del medio de cultivo, lo cual se puede explicar por el hecho de que diferentes inductores afectan la proporción de las distintas isoenzimas de lacasa (Chen *et al.*, 2004; Xiao *et al.*, 2004; Terrón *et al.*, 2004; Xiao *et al.*, 2006).

Recientemente Diaz *et al.* (2010) encontraron dos picos de actividad lacasa al realizar columnas de intercambio iónico con sobrenadantes de *Coriolopsis rigida*. Las masas moleculares de estas proteínas fueron muy similares a las reportadas por Lorenzo *et al.* (2006) en *T. versicolor*, estimando ambas en alrededor de ~60 kDa por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y ~66 kDa por SDS-PAGE. En este trabajo también se demostró que estas enzimas son glicoproteínas con un 9% de contenido de carbohidratos.

Sin embargo, en el trabajo de Martínez-Morales *et al.* (2015), los autores encontraron dos isoformas de lacasa, lcc1 y lcc2, purificadas a partir de cultivos SSF de *T. versicolor*, con pesos moleculares aparentes de 60 y 100 kDa respectivamente, y sugirieron que lcc2 podría ser heterodimérica, ya que al desnaturalizar la proteína y correrla en un SDS-PAGE se reveló la presencia de dos bandas con pesos moleculares de 55.4 y 66.3 kDa, al mismo tiempo que desapareció la banda de 100 kDa. El peso molecular típico de las lacasas de distintas especies de *Trametes* varía dentro de un rango de 58 a 71 kDa (Baldrian, 2006). La mayoría de las lacasas purificadas y caracterizadas hasta el momento son monoméricas, sin embargo, existen algunas homodiméricas u oligoméricas. El genoma completo de *T. versicolor* ATCC20869 se encuentra disponible, y el análisis genómico revela la presencia de 8 genes de lacasa (<http://genome.fungalgenomics.ca>), los pesos moleculares estimados por Martínez-Morales *et al.* (2015) utilizando SDS-PAGE son consistentes con los pesos moleculares teóricos calculados para las lacasas a partir de este genoma (entre 53.28 y 66.30 kDa). En el trabajo de Gutiérrez-Soto *et al.* (2011) se purificaron dos lacasas de *Trametes máxima* con pesos moleculares de alrededor de 60-70 kDa. En otros trabajos se encontraron lacasas pertenecientes a otras especies de Basidiomycota con menor peso molecular, como en el caso de *Pleurotus sp* (~40 kDa) (More *et al.*, 2011) y *P. chrysosporium* (46,5 kDa) (Yaropolov *et al.*, 1994).

La mayoría de las lacasas fúngicas muestran un rango de actividad óptimo entre pH 3.0-4.0 y uno de temperatura de entre 40-60°C para la oxidación de compuestos fenólicos (Stoilova *et al.*, 2010). Existen diversos trabajos realizados recientemente con especies de *Trametes* y *Pleurotus*, y coinciden en que las condiciones óptimas de actividad lacasa se dan a pH 4.5,

pero existen algunas diferencias con respecto a la temperatura óptima. Para *T. versicolor* (Stoilova *et al.*, 2010), y *T. maxima* (Gutiérrez-Soto *et al.*, 2011) las temperaturas óptimas para la actividad lacasa son 45 y 50°C respectivamente. Mientras que para *Pleurotus* sp. la temperatura óptima registrada fue de 65°C (More *et al.*, 2011).

En cuanto a su termoestabilidad, la mayoría de las lacasas comienzan a perder actividad por encima de los 50°C, aunque esto depende mucho de la especie fúngica y del pH (Stoilova *et al.*, 2010; Gutiérrez-Soto *et al.*, 2011; More *et al.*, 2011). Además, en ocasiones el pH al cuál la enzima es más estable no es el mismo registrado para su actividad óptima, por ejemplo, la lacasa de *T. maxima* tiene un pH óptimo de 3 para 2,4-DMP y ABTS, y de 4.5 para siringaldazina, sin embargo, es mas estable a pH 7 al ser expuesta a 50°C (Gutiérrez-Soto *et al.*, 2011).

1.3.4.2. Lignina peroxidasa

La LiP (EC 1.11.1.14) fue descrita por primera vez en *P. chrysosporium* (Glenn *et al.*, 1983; Tien & Kirk, 1983). Se trata de una enzima con un grupo hemo como cofactor, es dependiente de H₂O₂ y se caracteriza por su alto potencial redox y su bajo pH óptimo (Tien, 1987; Gold & Alic, 1993). Tiene baja especificidad por el sustrato y por ello tiene la capacidad de reaccionar con una gran variedad de compuestos (Barr & Aust, 1994).

Su producción está regulada a nivel transcripcional por nitrógeno y carbono, aunque de manera independiente (Van der Woude *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1994). El oxígeno también influye en su regulación, aumentando la producción enzimática (Zacchi *et al.*, 2000). La purificación y caracterización de esta enzima se llevó a cabo en hongos como: *T. versicolor* (Johansson *et al.*, 1993; Johansson & Nyman, 1993), *Bjerkandera* BOS55 (ten Have *et al.*, 1998) y *Flavodon flavus* (Raghukumar *et al.*, 1999).

Como ya se mencionó, la actividad peroxidasa depende de la presencia de H₂O₂, la cual es suministrada por enzimas tales como la glioxal oxidasa y la aril alcohol oxidasa o por sistemas no enzimáticos, como las reacciones vía

Fenton. La enzima es oxidada por el 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. El compuesto deficiente en un electrón luego de la primera oxidación es llamado Compuesto II (**Fig. 20**).

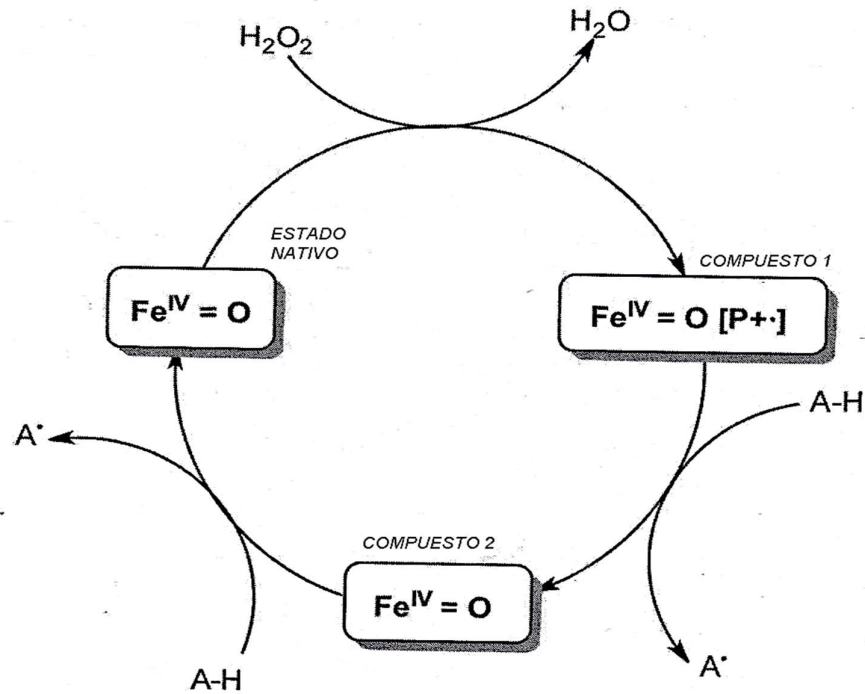


Figura 20: Ciclo catalítico de la lignina peroxidasa (Fuente: Kubicek, 2013).

La actividad enzimática de la LiP puede ser fácilmente medida utilizando veratril alcohol como sustrato, el cuál es oxidado a veratrilaldehído, produciendo un incremento en su absorbancia a 310 nm (Kersten, 1990), aunque en algunas especies de hongos no fue posible medir la actividad de esta enzima en los sobrenadantes, a pesar de que sus genes fueron detectados, esto podría deberse a que producen una proteína inactiva o a que poseen un mecanismo de regulación aún desconocido (Rajakumar *et al.*, 1996). Al parecer, en muchos de los hongos causantes de pudrición blanca no existe la enzima LiP (Hatakka, 1994; Peláez *et al.*, 1995; Tekere *et al.*, 2001a; 2001b).

Como se mencionó anteriormente, la LiP es una hemoproteína. Contiene 1 mol de protoporfirina IX de hierro por mol de proteína, su peso molecular varía entre los 38 y 46 kDa y posee puntos isoelectricos bajos (3.2-4.0). Esto último es debido a su fosforilación durante el proceso secretorio (Kuan & Tien, 1989).

La LiP muestra una estructura globular, compuesta por ocho α -hélices mayores y ocho menores, y una pequeña hoja β -plegada, conformando dos dominios unidos por cuatro puentes di-sulfuro (Gerini *et al.*, 2003). El grupo hemo está situado en la hendidura formada entre los dos dominios y es accesible desde el exterior a través de dos pequeños canales. Cada dominio posee además un ión de calcio que, según se cree, sería importante para mantener la topología del sitio activo (Wong, 2009).

Estructura génica y región promotora

Hasta la fecha se han identificado mas de 16 isoenzimas de LiP en cultivos de *T. versicolor* mientras que otras especies de hongos sólo parecen tener unas pocas (Janusz *et al.*, 2013). Análisis genéticos revelaron que cada isoforma está codificada por un diferente, pero homólogo, marco de lectura (ORF) (Kirk, 1987; Boominathan & Reddy, 1992; Bominathan *et al.*, 1993; Reddy, 1993).

Todas las LiPs están formadas por 343-345 aminoácidos con 27-28 péptidos señal para secreción (Ritch *et al.* 1991; Gold & Alic. 1993), sus genes están compuestos por 8-9 intrones de 49-78 pares de base de longitud. Seis de estos intrones se encuentran en la misma posición en todos los genes e incluso las secuencias cercanas a las uniones entre intrones y exones están conservadas (Gold & Alic, 1993). Al contrario de los intrones, la longitud de los exones es muy variable, por ejemplo, en *Trametes cervina*, oscilan en un rango de entre 5 a 240 pares de bases (Miki *et al.*, 2010). Es interesante destacar que la estructura intrones/exones en *T. cervina* es muy similar a la hallada en las

peroxidasas de *C. cinereus* (CIP), las cuales no muestran actividad ligninolítica (Miki *et al.*, 2010).

La región promotora de la LiP consiste en una secuencia TATA en la posición 66-81 antes del codón de inicio y una secuencia CAAT ubicada desde la posición -107 hasta la 228 (Holzbaur *et al.*, 1988; Zhang *et al.*, 1991; Gold & Alic, 1993).

1.3.4.3. Manganeso peroxidasa

La MnP (EC 1.11.1.13), junto con la LiP, son las peroxidasas que actúan sobre lignina mejor conocidas y ambas fueron descritas por primera vez en *P. chrysosporium* (Sundaramoorthy *et al.*, 1994). Desde su descubrimiento el interés en la MnP ha ido en aumento principalmente por su potencial aplicación en biopulpa, bioblanqueo y biorremediación. Se trata de una hemoproteína glicosilada cuyo peso molecular oscila en un rango de entre 38 a 62.5 kDa (Hofrichter, 2010) y se produce como una serie de isoenzimas codificadas por una familia de genes estrechamente relacionados. Interesantemente, sólo ha sido hallada en ciertos órdenes de Basidiomycota (Agaricales, Corticiales, Polyporales, Hymenochaetales) y hasta ahora, no se han reportado otros organismos que expresen y secreten MnP, o que contengan sus genes (Gold & Alic, 1993; Li *et al.*, 1999a; Tello *et al.*, 2000; Hilden *et al.*, 2008; Morgenstern *et al.*, 2010).

Al igual que la LiP, la MnP está regulada a nivel transcripcional (Pribnow *et al.*, 1989; Van der Woude *et al.*, 1993). En *P. chrysosporium* esta regulación puede estar dada por Mn^{+2} , H_2O_2 , etanol, 2,4-diclorofenol, O_2 y shock térmico (Godfrey *et al.*, 1990; Li *et al.* 1995). La producción de MnP también puede ser inducida por compuestos aromáticos (Gill & Arora, 2003) y manganeso (Fu *et al.*, 1997; Ziegenhagen & Hofrichter, 2000). Este último compuesto regula la expresión de MnP por medio de la activación del gen *mnp* (Brown *et al.* 1990) y además actúa como cofactor para la actividad de la proteína (Glenn *et al.*, 1986).

El ciclo catalítico de la MnP es semejante al de la LiP. Sus intermediarios de reacción también son llamados Compuesto I (CI) y Compuesto II (CII) y necesita H_2O_2 como aceptor de electrones para pasar al estado CI. El H_2O_2 proviene principalmente de la oxidación de ácido glioxílico (Urzúa *et al.*, 1998a). El Mn^{+2} actúa como donante de un electrón y es oxidado a Mn^{+3} mientras que el CI pasa a CII. La oxidación del CII ocurre de manera similar y, de esta forma, otro Mn^{+2} pasa a Mn^{+3} generando la enzima nativa (**Fig. 21**). 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 (Pérez & Jeffries, 1993; Urzúa *et al.*, 1998b).

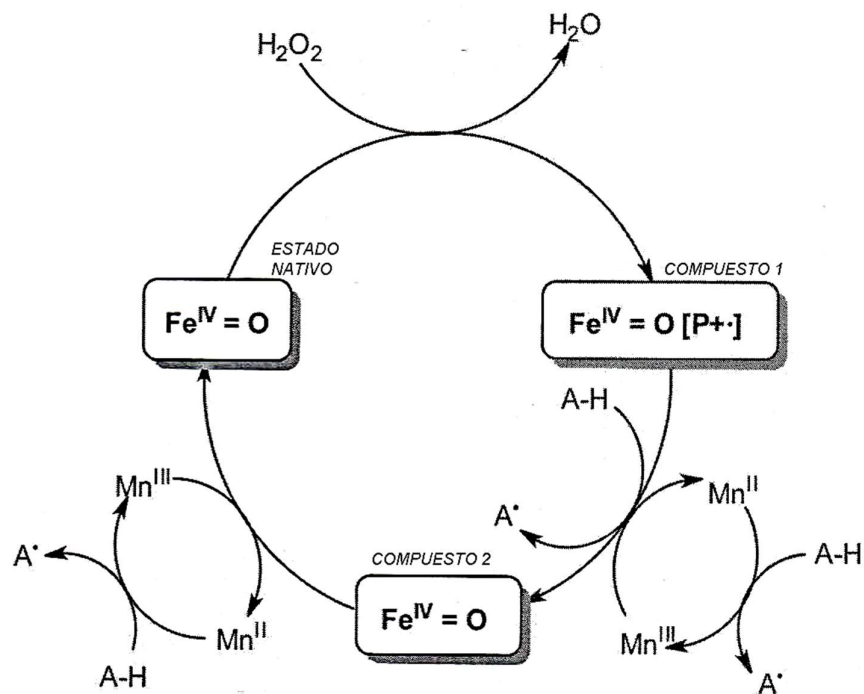


Figura 21: Ciclo catalítico de la enzima manganeso peroxidasa (Fuente: Kubicek, 2013).

La MnP es capaz de generar Mn^{+3} con poder oxidativo que difunde dentro de la madera para oxidar a la lignina a distancia de la célula fúngica.

Esto confiere una ventaja para los hongos con un mecanismo de degradación selectiva de la lignina. La MnP también es capaz de peroxidar lípidos. Esta función es muy importante para la generación de precursores del glioxalato y del oxalato (Watanabe *et al.*, 2000), y para clivar enlaces C α -C β y β -O-4 en la estructura de la lignina (Kapich *et al.*, 2005). Es interesante destacar que la MnP puede generar H₂O₂ por sí misma, en ausencia de H₂O₂ exógena, por medio de la oxidación de NADPH, glutatión o ditiotreitól. Se cree que esta actividad podría generar el H₂O₂ necesaria para iniciar el ciclo catalítico tanto de la MnP como de la LiP (Pasczynski *et al.*, 1986).

A diferencia de la LiP, la MnP es muy común en hongos causantes de pudrición blanca (Hofrichter, 2002).

Estructura génica

Se pueden encontrar varias isoformas de la MnP. En *C. (Gelatoporia) subvermispota* se han descrito hasta 11 isoformas diferentes (Lobos *et al.*, 1994; Urzua *et al.*, 1995). La proteína está compuesta por 330-370 aminoácidos y contiene un péptido líder de entre 21-29 aminoácidos (Asada *et al.*, 1995; Alic *et al.*, 1997; Lobos *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1999), así como una secuencia corta que incluye un MAF y un AAP N-terminal, conservados en todos los genes *mnp* (Li *et al.*, 1999).

Hasta el momento han sido identificadas hasta 4 familias de genes *mnp* en genomas fúngicos: 2 en *P. radiata* 79, 2 en *Dichomitus squalens*, 3 en *Phlebia* sp. MG60, 2 en *Lentinula edodes*, 4 en *P. chrysosporium*, 4 en *Phanerochaete sordida*, 1 en *Ganoderma lucidum*, 4 en *C. subvermispota* y 4 en *T. versicolor* 9522-1 (Kirk, 1981).

El análisis genético de *Physisporinus rivulosus* y *P. radiata* 79 reveló que las secuencias codificantes para MnP en ambos hongos no estaban relacionadas (Hilden *et al.*, 2005; Hakala *et al.*, 2006). También se encontraron grandes diferencias (reveladas por la estructura intron/exon) entre las familias de genes *mnp* en Corticiales, Polyporales, Hymenochaetales y Agaricales (Alic

& Gold, 1997; Giardina *et al.*, 2000; Hilden *et al.* 2005; Hakala *et al.*, 2006; Hilden *et al.*, 2008).

Región promotora

En las secuencias encontradas en el extremo 5' río arriba de los genes de MnP se hallaron sitios de unión a distintos elementos reguladores de la transcripción como SP1, AP2, HSE, MRE, CRE y XRE. Cada una de las regiones promotoras conocidas consiste en un elemento TATA río arriba del codón ATG (Pease *et al.*, 1989; Alic & Gold, 1997; Lobos *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1999b; Johansson *et al.*, 2002; Hilden *et al.*, 2005; Nagai *et al.*, 2007). Interesantemente, Cs-mnp3 presenta dos TATA boxes, en las posiciones -90 (TATAAA) y -100 (TATAA) del codón ATC (Tello *et al.*, 2000). Además, la región promotora de los genes de MnP incluye al menos un motivo CAAT (sitio de unión para los factores de transcripción) directo y puede contener varios motivos CAAT invertidos (ATTGG) río arriba del sitio de inicio de la transcripción (Li *et al.*, 1999b; Nagai *et al.*, 2007). Además de las secuencias regulatorias TATA y CAAT, se han identificado secuencias de elementos de respuesta a metales y a shock térmico. En *P. chrysosporium* se hallaron genes de MnP con secuencias MREs y HSEs inducibles por Mn⁺² y calor (Gold & Alic, 1993; Mayfield *et al.*, 1994). En cultivos de *C. subvermispota* la producción de MnP está directamente relacionada a la concentración de Mn(II) (Ruttimann *et al.*, 1992). El análisis de la primera región promotora descrita en *P. chrysosporium* reveló la presencia de 1 a 6 elementos de shock térmico, localizados dentro de las 400-1000 pb río arriba del codón ATG (Godfrey *et al.*, 1990; Mayfield *et al.*, 1994; Alic & Gold, 1997).

1.3.4.4. Peroxidasas versátiles

Las llamadas peroxidasas versátiles (VP; 1.11.1.16) son un grupo de enzimas específicas para Mn(II) (como la MnP), pero que en ausencia de Mn(II)

aún pueden oxidar sustratos fenólicos y no fenólicos al igual que la LiP. Estas enzimas han sido particularmente bien documentadas en *Bjerkandera* y *Pleurotus* ssp. (Chen *et al.*, 2010b; Taboada-Puig *et al.*, 2011; Pozdnvakova *et al.*, 2013; Taboada-Puig *et al.*, 2013).

El ciclo catalítico de la VP es idéntico al de la LiP e involucra la formación y reducción de los intermediarios Compuesto I y Compuesto II (Wong, 2009).

La VP de *P. eryngii* ha sido cristalizada y estudiada: consiste en 12 hélices estabilizadas por 4 enlaces di-sulfuro, bolsillo hemo conteniendo dos residuos de H, dos sitios de unión a Ca^{+2} , y un sitio de unión a Mn(II). Un residuo de propionato en el anillo hemo III es responsable de la fijación de Mn(II) y la transferencia de electrones del Compuesto I o el Compuesto II/Fe(IV)=0 (Ruiz-Dueñas *et al.*, 1999; Perez-Boada *et al.*, 2005). Un radical neutro identificado en el sitio W164 estaría involucrado en la oxidación de sustratos aromáticos con alto potencial redox, como el veratril alcohol (Wong *et al.*, 2009).

En los últimos años se han clonado y descrito algunas otras peroxidasas “híbridas”. En *P. radiata* ha sido descrita una enzima tipo VP “corta” que posee el sitio de unión a Mn^{+2} pero carece del triptófano expuesto (Hildén *et al.*, 2005). Debido a esto, es incapaz de oxidar veratril alcohol, pero comparte con las VPs la habilidad Mn^{+2} -independiente para oxidar fenoles, algunos colorantes y aminas (Hofrichter *et al.*, 2010).

Las secuencias disponibles hasta el momento también predicen la presencia de una enzima híbrida tipo MnP “corta” en *Trametes* ssp. y *Pleurotus* ssp. (Lundell *et al.*, 2010), y particularmente en hongos descomponedores de hojarasca como *Agaricus bisporus*, *Agrocybe praecox* y *Stropharia coronilla* (Hofrichter *et al.*, 2010).

1.3.4.5. Peroxidasas decolorantes de tintes (*Dye-decolorizing peroxidases*)

Recientemente se detectó otra familia de hemo-peroxidasas llamadas “Dye-decolorizing peroxidases” (DyP). Esta familia parece estar presente tanto en hongos como en bacterias (Sugano, 2009) y hasta ahora se han registrado

80 miembros de ellas en la base de datos PeroxiBase. Aunque sólo hay unos pocos estudios caracterizando su estructura y función, estas proteínas parecen ser enzimas bifuncionales con actividad hidrolasa y oxigenasa, además de la típica actividad peroxidasa (Sugano, 2009).

Sugano *et al.* (2007) purificaron y cristalizaron la enzima de *Thanatephorus cucumeris*. La proteína tiene una estructura terciaria única con una región hemo distal distinta a la de la mayoría de las peroxidases, y carece del residuo H que asiste a la formación del Componente I en el resto de las peroxidases. Dos residuos aminoacídicos, D y R, reemplazan a este H en las DyP.

Otras características que diferencian a esta familia del resto de las peroxidases son: un rango muy amplio de especificidad de sustrato, falta de homología con la mayoría de las demás peroxidases y capacidad de actuar a pH bajo (alrededor de 3). Oxidan todos los sustratos típicos de peroxidases pero también antraquinonas, las cuales no pueden ser atacadas por otras peroxidases. Esta propiedad les dió el nombre de “dye peroxidases” debido a que muchos colorantes sintéticos son derivados de antraquinonas (Kubicek, 2013). Interesantemente, las DyP microbianas juegan un papel clave en la degradación de la lignina (Colpa *et al.*, 2014).

1.4. Las enzimas fúngicas aplicadas a la biorremediación

Diariamente distintas industrias (papeleras, textiles, petroquímicas, etc) generan grandes cantidades de efluentes conteniendo sustancias contaminantes muy peligrosas para la salud y el medio ambiente (Nicell *et al.*, 1993; Rodriguez-Couto, 2013). Estos efluentes deben ser tratados previamente a su descarga para eliminar o disminuir el nivel de sustancias tóxicas que contienen (Karam & Nicell, 1997). Existen diversos métodos físicos y químicos para tratarlos (Singh & Kumar, 2010), aunque en los últimos años comienza a priorizarse el uso de tecnologías compatibles con el medio ambiente. La utilización de microorganismos para biorremediación es una tecnología ya

establecida, pero la mayoría de los tratamientos empleados utilizan organismos procariontes. La utilización de hongos para biorremediación es una opción muy atractiva debido a las ventajas que poseen, entre ellas, una mejor tolerancia a altas concentraciones de contaminantes con respecto a las bacterias y un sistema enzimático poderoso que es liberado al medio. Las ligninasas producidas por hongos xilofagos, particularmente los causantes de pudrición blanca, han demostrado ser herramientas muy útiles para la decoloración de efluentes (D'souza *et al.*, 2006; Raghukumar *et al.*, 2008; Pintos *et al.*, 2012). En los Basidiomycota las lacasas extracelulares son producidas en pequeñas cantidades en forma constitutiva (Leonowicz & Bollag, 1987) pero usualmente la producción de lacasa es estimulada por compuestos específicos, mayormente aromáticos o compuestos fenólicos (Gianfreda *et al.*, 1999; Elisashvili *et al.*, 2010). Al parecer la inducción por compuestos aromáticos constituye una respuesta de protección de los hongos hacia los compuestos tóxicos producidos durante la degradación de la lignina (Souza *et al.*, 2004).

Estas enzimas ligninolíticas son capaces de degradar numerosos contaminantes ambientales de diferente naturaleza química, entre ellos: hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), bifenilos policlorados (PCBs) y otros aromáticos halogenados, trinitrotolueno (TNT) y distintos explosivos nitroaromáticos, muchos tipos de pesticidas, colorantes provenientes de diferentes industrias y pentaclorofenol (Pointing, 2001). Incluso cuando se utilizan enzimas fúngicas para polimerizar los contaminantes (Nicell *et al.*, 1993), estos pueden ser luego removidos fácilmente por métodos de filtración, sedimentación o adsorción (Rabinovich *et al.*, 2004; Gianfreda *et al.*, 2006).

Dado que estas enzimas fúngicas son extracelulares, son las mejores candidatas para la biorremediación de contaminantes altamente apolares. Por ejemplo, en suelos contaminados con PHAs la biorremediación es obstaculizada seriamente por las bajas tasas de degradación de los PHAs de cinco y seis anillos. Estos PHAs tienen muy baja solubilidad en agua y a menudo están fuertemente unidos a las partículas del suelo, lo que hace que no se encuentren disponibles para la degradación bacteriana. Las enzimas de los hongos causantes de pudrición blanca son capaces de oxidar rápidamente

estos compuestos hasta productos más solubles en agua, aumentando su biodisponibilidad, lo que resulta en mayores tasas de mineralización bacteriana (Kotterman *et al.*, 1998; Gianfreda & Rao, 2004).

Por otro lado, estos hongos también pueden utilizarse para la bioadsorción de metales pesados presentes en aguas contaminadas (Levin & Forchiassin, 2007; Dhankhar & Hooda, 2011). Si se utiliza la técnica de cultivo sumergido con agitación, el hongo crece formando pellets de forma esférica de diversos tamaños, con una alta relación superficie/volumen y buenas propiedades mecánicas. Sus paredes celulares están formadas principalmente por polisacáridos, péptidos y pigmentos, que tienen una buena capacidad de unión a metales pesados. La habilidad de estos hongos para adsorber metales pesados a partir de soluciones con Cu, Cd, Cr, Ni, Pb, Hg y elementos como U y Th ha sido comprobada (Baldrian, 2003).

Existen dos estrategias para la aplicación de estos hongos en la degradación de compuestos recalcitrantes: utilizar directamente el cultivo activo o utilizar sólo las enzimas extraídas de él. La utilización de los cultivos crudos tiene un menor costo económico y la ventaja de contener proteínas y otros factores que podrían ser necesarios para la estabilidad enzimática. Por otro lado, el uso de enzimas purificadas permite una mayor independencia con respecto a la composición del efluente contaminado, que podría afectar la actividad del hongo (por ejemplo, alta salinidad), pero los procesos de extracción y purificación aumentan su costo (Moreira *et al.*, 2001).

La sobreexpresión de enzimas recombinantes en sistemas heterólogos, como levaduras y bacterias, es una forma de aumentar la producción de enzimas ligninolíticas, y mejorar su estabilidad y su actividad catalítica. La amplificación y expresión de genes en un sistema apropiado para aumentar significativamente la producción y disminuir sus costos, es una práctica actual para la producción de lacasas utilizadas en la industria del papel (Gianfreda & Rao, 2004; Ikehata *et al.*, 2004; Piscitelli *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2014b).

Las enzimas lacasas también son utilizadas en la detección de neurotransmisores como la dopamina y la norepinefrina (Couto & Herrera,

2006), y algunas de ellas degradan metabolitos fúngicos tóxicos como la aflatoxina B1 y son útiles en el campo de la microbiología de alimentos (Alberts *et al.*, 2009).

1.4.1. Degradación de colorantes industriales

El tratamiento de efluentes industriales es un campo de creciente investigación, sobre todo debido a que la legislación concerniente a la descarga de estos efluentes al medio ambiente es cada vez más estricta (Dhillon *et al.*, 2012). Las industrias farmacéuticas, textiles, cosméticas, imprentas y de teñido de telas generan grandes cantidades de efluentes conteniendo diversos colorantes industriales. La mayoría de los colorantes son tóxicos, mutagénicos y carcinogénicos, y muchos son altamente resistentes a la degradación (Pant *et al.*, 2008; Forootanfar *et al.*, 2012). Además de perjudicar al medio ambiente debido a su toxicidad, estos colorantes también obstruyen o reducen el pasaje de la luz del sol, perjudicando a los organismos fotosintéticos, lo que resulta en una disminución de los niveles de oxígeno en los ecosistemas acuáticos (Champagne & Ramsay, 2010). Según el trabajo de Vaidya & Datye en 1982 se producían a nivel mundial, más de 7.107 toneladas de colorantes por año, de las cuales aproximadamente un 10% era vertido en efluentes industriales. Datos más recientes informan una producción de alrededor de 1.500.000 anuales de toneladas de estos colorantes sintéticos (Jiang & Murmann, 2011).

Los colorantes industriales son compuestos con diferentes estructuras químicas y se pueden clasificar según su grupo cromóforo o según su aplicación (Lin & Peng, 1994). Los colorantes azo son los más utilizados en aplicaciones textiles. Su resistencia a los tratamientos biológicos se debe a sus estructuras específicas: grupos sulfónicos aromáticos y enlaces azo (Lin & Peng, 1994). Se sabe que los colorantes nunca se fijan totalmente en las telas, más del 50% de los colorantes usados son vertidos a los efluentes (Moreira *et al.*, 2004; Hessel *et al.*, 2007).

La mayoría de los procesos que se han utilizado y se usan habitualmente para decolorar y detoxificar estos efluentes no dan resultados totalmente satisfactorios, producen grandes cantidades de lodo y no son económicos (Cooper, 1995; Stephen, 1995; Dubrow *et al.*, 1996; Lourenco *et al.*, 2001; Lopez *et al.*, 2002).

Se han propuesto varias nuevas estrategias químicas y físico-químicas para tratar efluentes coloreados, incluyendo coagulación, floculación, descomposición electroquímica, degradación química oxidativa y adsorción (Gupta & Suhas, 2009). Sin embargo, estos procesos siguen presentando un alto costo y no siempre son aplicables (Robinson *et al.*, 2001; Vanhulle *et al.*, 2008). Además, la composición de estos efluentes coloreados generalmente es muy compleja y variable, lo que hace a su tratamiento particularmente difícil. Como se mencionó anteriormente, el desarrollo de bioprocesos basados en la utilización de enzimas fúngicas (particularmente lacasas) para remover colorantes de efluentes industriales ha ganado impulso, principalmente por sus ventajas económicas y el amplio rango de colorantes al que pueden ser aplicadas (Dhillon *et al.*, 2012; Sari *et al.*, 2012; Krastanov *et al.*, 2013; Rodriguez-Couto, 2013; Yan *et al.*, 2014b).

Uno de los desafíos que enfrenta el tratamiento enzimático es la inactivación de las enzimas por las características físico-químicas de estos efluentes. La actividad enzimática a menudo se ve gravemente afectada por factores como el pH, la temperatura y la concentración salina (Niebisch *et al.*, 2014). Por otro lado, el alto costo de producción de estas enzimas limita su aplicación a escala industrial (Rodriguez-Couto, 2013).

Para que el proceso de decoloración sea eficiente generalmente es necesario trabajar con diluciones del efluente (Wesenberg *et al.*, 2002; Amaral *et al.*, 2004; Sangeeta *et al.*, 2011). Según Pakshirajan & Kheria (2012), quienes trabajaron con *P. chrysosporium*, es necesario que la dilución del efluente se realice con un medio con carbono y otros nutrientes para lograr altos porcentajes de decoloración y para disminuir la DQO (Demanda Química de Oxígeno). Una dilución del efluente de 1/5 fue necesaria para evitar la inhibición del crecimiento de *Pycnoporus* sp., según el trabajo de Liu *et al.*

(2012). Yildirim *et al.* (2012) reportaron que la disminución de la DQO en un efluente de una planta textil resultó del 80% al ser diluido 1/5 con dextrosa Sabouraud, mientras que sólo disminuyó un 47% al ser diluido 1/2.

Por otro lado, pocos trabajos han intentado hasta el presente la decoloración de efluentes en condiciones no estériles. Es claro que sería mucho más simple y económico trabajar en condiciones no estériles, pero hay reportes que indican que la tasa de decoloración alcanzada en estas condiciones es menor, principalmente por la presencia de otros microorganismos contaminantes que compiten por los nutrientes (Osorio Echavarría *et al.*, 2012). Estos autores trabajaron con el anamorfo R1 de *Bjerkandera* sp. y compararon los porcentajes de decoloración alcanzados en ambas condiciones de cultivo. Al cabo de 8 días de tratamiento los niveles de decoloración resultaron del 65 y el 40% para los cultivos estériles y no estériles, respectivamente. Blanquez *et al.* (2008) demostraron que *T. versicolor* es capaz de decolorar en forma continua un efluente de una fábrica textil bajo condiciones de cultivo no estériles durante 15 días en un biorreactor de 10 L, alcanzando valores de decoloración de entre 40-60%. Aunque a partir del día 10 fueron detectadas contaminaciones bacterianas. Anastasi *et al.* (2010) reportaron la decoloración de otro efluente textil por *B. adusta* inmovilizado en un biorreactor de lecho fijo. El hongo mantuvo su eficacia de decoloración durante 4 ciclos, permaneciendo activo por un período de 70 días bajo condiciones no estériles y sin el agregado de nutrientes. Además, este tratamiento disminuyó considerablemente la DQO y la toxicidad del efluente. En este caso no fue necesario diluir el efluente, adicionar nutrientes ni controlar los parámetros químicos, lo que demuestra la aplicabilidad del sistema desarrollado. Sin embargo, otros autores critican estos resultados, argumentando que el tiempo de operación fue demasiado corto y/o a escala de laboratorio (con bajos volúmenes de efluente), como para comprobar que esta metodología pudiera funcionar a grandes escalas (Rodríguez-Couto, 2013).

Existen numerosos trabajos en los que se demuestra la capacidad de degradación y detoxificación de diferentes tipos de colorantes por parte de los hongos causantes de pudrición blanca, ya sea utilizando sólo sus enzimas o

todo el cultivo (Swamy & Ramsay, 1999; Ramsay & Nguyen, 2002; Levin *et al.*, 2004; Khlifi *et al.*, 2010; Singh & Pakshirajan, 2010; Grassi *et al.*, 2011; Dhillon *et al.*, 2012; Krastanov *et al.*, 2013) (**Tabla 1**).

La utilización de todo el cultivo (sobrenadante y células fúngicas) tiene la ventaja de que las enzimas pueden ser producidas continuamente, reemplazando a aquellas que son inactivadas por factores propios del efluente. Más aún, muchos autores sostienen que la inmovilización de estas células fúngicas en distintos soportes tiene varias ventajas sobre los sistemas con células libres, como por ejemplo, una fácil separación de las células y el sobrenadante (lo que simplifica el proceso de “downstream”) una mayor protección celular, reducción de la actividad proteasa, mayor resistencia a perturbaciones ambientales como cambios de pH o exposición a compuestos tóxicos, y la posibilidad de operar en modo continuo, o sea, utilizar varias veces las mismas células fijadas en los soportes (Shin *et al.*, 2002).

Las enzimas purificadas también pueden ser fijadas a distintos soportes para poder ser reutilizadas y para aumentar su estabilidad (Ping *et al.*, 2008; Forde *et al.*, 2010). Algunas de las técnicas utilizadas incluyen fijación de las enzimas en polímeros, encapsulación en membranas y unión covalente a soportes sólidos (Fernandez-Fernandez *et al.*, 2013). Se considera que esta última opción aporta mayor estabilidad a la enzima, dando rigidez a su estructura e impidiendo su desnaturalización (Yemul & Imae, 2005). Los soportes más utilizados últimamente son quitosano, membranas de nanofibras compuestas de quitosano/polivinilalcohol, nanopartículas magnéticas de sílica y espumas celulares silíceas mesoporadas (Fernandez-Fernandez *et al.*, 2013). Los materiales mesoporados de sílica son una de las matrices más utilizadas para la inmovilización de enzimas debido a sus propiedades específicas como resistencia hidrotérmica, estructura poroide bien ordenada y mayor área de superficie (Bautista *et al.*, 2010). La inmovilización de lacasas en particular ha sido extensamente estudiada utilizando diferentes métodos y soportes (Li *et al.*, 2013; Sanlier *et al.*, 2013).

Tabla 1: Decoloración de efluentes reales por hongos causantes de pudrición blanca.
Fuente: Rodríguez-Couto, 2013.

Hongo	Origen del efluente coloreado	Referencia
<i>Trametes versicolor</i>	Industria textil (Brasil)	Wesemberg <i>et al.</i> (2002)
<i>Trametes versicolor</i> ATCC 20869	Efluente de teñido de alfombras	Amaral <i>et al.</i> (2004)
<i>Pleurotus sajor-caju</i> CCB 020	Industria textil (Brasil)	Ramsay & Goode (2004)
<i>Pleurotus flabellatus</i>	Industria textil (Tanzania)	Kamida <i>et al.</i> (2005)
<i>Coriolus versicolor</i> RC3	Fábrica de teñido batic (Tailandia)	Nilsson <i>et al.</i> (2006)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Curtiembre (Colombia)	Blazquez <i>et al.</i> (2008)
<i>Coriolus versicolor</i> IBL-04	Industrias textiles (Arzoo, Crescent, Itmad, Megna, Ayesha) (Pakistán)	Gomez-Bertel <i>et al.</i> (2008)
<i>Bjerkandera adusta</i> MUT 2295	Tintotia Pollone, Biella (Italia)	Asgher <i>et al.</i> (2009)
<i>Bjerkandera adusta</i> MUT 3060	EURO D SRL (Italia)	Anastasi <i>et al.</i> (2010)

<i>Bjerkandera</i> sp. (anamorfo R1)	Industria textil (Colombia)	Anastasi <i>et al.</i> (2011)
<i>Trametes pubescens</i> MUT 2400	FelliColor (Italia)	Sangeeta <i>et al.</i> (2012)
<i>Pycnoporus</i> sp. SYBC-L3	Industria textil (China)	Anastasi <i>et al.</i> (2012)
<i>Ganoderma lucidum</i> MTCC 1039	Industria textil (India)	Osorio Echavarria <i>et al.</i> (2012)

La síntesis de enzimas extracelulares responsables de la decoloración en los hongos causantes de pudrición blanca está determinada por la especie, su estado de desarrollo, las características de cultivo y los inductores utilizados (Ottoni *et al.*, 2014). Sin embargo, los factores más críticos son las fuentes de carbono y nitrógeno, y la relación entre estos nutrientes (Majeau *et al.*, 2010; Piscitelli *et al.*, 2011).

De acuerdo a los resultados obtenidos en *P. chrysosporium*, condiciones limitantes de carbono y nitrógeno son necesarias para la producción de enzimas ligninolíticas en este hongo (Kirk & Farrel, 1987). Concomitantemente, la degradación del colorante rojo congo por *P. chrysosporium* resultó inhibida por altas concentraciones de nitrógeno (Tatarko & Bumpus, 1998).

Más tarde se demostró que el efecto del contenido carbono/nitrógeno en el medio de cultivo sobre la producción enzimática depende de la especie (Levin *et al.*, 2010; Janusz *et al.*, 2013). Medios con alto contenido de nitrógeno producen las mayores actividades lacasa en *L. edodes*, *Rigidoporus lignosus*, *T. pubescens* y *T. versicolor*, mientras que condiciones limitantes de nitrógeno aumentan la producción enzimática en *P. cinnabarinus*, *P. sanguineus*, y *P. radiata* (Mester & Field, 1997; Galhaup *et al.*, 2002b).

Además, la fuente de nitrógeno utilizada afectó no sólo a la cantidad de enzima lacasa producida sino también a la proporción de isoenzimas secretadas por *T. versicolor* (Moldes *et al.*, 2004). Esta proporción juega un rol muy importante en la decoloración (Moldes *et al.*, 2004; Lorenzo *et al.*, 2006).

En el trabajo de Niebsisch *et al.* (2014) se investigó el efecto de distintas fuentes de carbono y nitrógeno en la producción de enzimas implicadas en la decoloración de tinturas por *Heteroporus biennis*. La actividad decolorante varió desde 2% en medios con sacarosa hasta 95% en medios con maltosa. En los cultivos con glucosa no se registraron cambios en la actividad decolorante al variar la concentración. Los cultivos con fructosa y glicerol también lograron altos niveles de decoloración. Sin embargo, no se pudo correlacionar la producción enzimática con el crecimiento fúngico, ya que cultivos con un buen desarrollo de biomasa no siempre lograron mejores porcentajes de decoloración. En cuanto a las fuentes de nitrógeno, estos mismos autores encontraron que los mejores porcentajes de decoloración se lograron con cloruro de amonio y tartrato de amonio y los más bajos con oxalato de amonio, urea y peptona.

Yan *et al.* (2014b) estudiaron el efecto de 8 fuentes distintas de carbono sobre la producción de lacasa en una cepa de *T. trogii*. La glucosa y la fructosa resultaron ser las más adecuadas para lograr una alta producción, coincidiendo con los resultados obtenidos por Galhaup & Haltrich (2001) y Periasamy & Palvannan (2010), que sin embargo difieren de otros estudios (Zeng *et al.*, 2011) donde la sacarosa resultó la mejor fuente de carbono para la producción de lacasa en medio SSF. En cuanto a la fuente de nitrógeno, los mejores resultados se obtuvieron con una mezcla 1:1 de peptona y extracto de levadura, coincidiendo con estudios previos en donde se comprueba que las fuentes orgánicas de nitrógeno son las mejores para aumentar la producción de lacasa en *Trametes gallica*, *T. trogii* y *C. versicolor* var. *antarcticus* (Dong *et al.*, 2005; Levin *et al.*, 2010; Zeng *et al.*, 2011). Por el contrario, el extracto de levadura y la peptona resultaron en una baja producción de lacasa en *Trametes villosa* (Levin *et al.*, 2010).

Teniendo en cuenta que la enzima lacasa juega un rol preponderante en la decoloración de tinturas industriales en numerosos hongos de pudrición blanca, es importante conocer los requerimientos nutricionales de la especie fúngica con la que se está trabajando para poder confeccionar un medio de cultivo con los nutrientes óptimos para lograr una alta producción de lacasa y otras actividades enzimáticas que puedan contribuir al proceso de decoloración.

También es necesario tener en cuenta que la eficiencia de la decoloración depende de otros factores como la estructura y concentración del colorante, las enzimas utilizadas y las condiciones del sistema. Por ejemplo, el sobrenadante crudo de *T. trogii* SYBC-LZ es capaz de decolorar tintes antraquinónicos, pero sólo decolora azoicos en presencia de 1-hidroxibenzotriazol (HBT) como mediador (Zeng *et al.*, 2011).

P. chrysosporium es capaz de decolorar y mineralizar colorantes azo (los cuales normalmente no son degradados bajo condiciones aeróbicas) hasta CO₂ (Spadaro *et al.*, 1992). *T. hirsuta* reduce hasta en un 80% la toxicidad de colorantes antraquinónicos (Abadulla *et al.*, 2000) y *T. versicolor* U97 es capaz de decolorar en un 85% el colorante Remazol Brilliant Blue R (RBBR: antraceno sulfonado) en sólo 6 horas (Sari *et al.* 2012). Choi *et al.* (2014) trabajaron con 25 aislamientos de hongos causantes de pudrición blanca, incluyendo especies de *Bjerkandera*, *Ceriporia*, *Irpex*, *Perenniporia*, *Phanerochaete*, *Phlebia* y *Porostereum*. Todos ellos demostraron ser capaces de remover más del 70% de los colorantes rojo congo, Reactive Blue 4 y Orange II, los cuales incluyen en su estructura grupos diazo, antraquinona y azo, respectivamente.

En el trabajo de Ottoni *et al.* (2014) se compara la capacidad de decoloración del Reactive Black 5 (RB5), un colorante textil azo muy recalcitrante, por parte de tres cepas de *T. versicolor* en condiciones de alta salinidad NaCl 15 gL⁻¹ y pH alcalino (9.5) (condiciones usuales en los efluentes textiles) (Zilly *et al.*, 2011). Las tres cepas, MUM 04.100, MUM 94.04 y MUM 04.101, lograron porcentajes de decoloración del 100, 95 y 20%, respectivamente. Anteriormente ya habían sido reportados casos de

decoloración en condiciones de alta salinidad, aunque no tan extremas: *P. ostreatus* (CCIB2347) y *Peniophora cinerea* (CCIBT2541) fueron capaces de decolorar en un 93% un efluente textil con 10 gL⁻¹ de NaCl y a pH 8 (Moreira Neto *et al.*, 2011). Sin embargo, el NaCl inhibió la decoloración mediada por la enzima lacasa en *G. lucidum* (Zilly *et al.*, 2011), *Trametes* sp. (Manel *et al.*, 2009) y *T. trogii* (Grassi *et al.*, 2011), incluso a concentraciones 50 mM.

En el trabajo realizado por Lorenzo *et al.* (2006) con *T. versicolor* se comprobó que existe una relación entre el grado de decoloración y la relación proporcional de las dos isoenzimas Lacl y LaclI en el sobrenadante. Al parecer la isoenzima Lacl es capaz de lograr mayores porcentajes de decoloración que LaclI. Utilizando sobrenadantes con distintas relaciones proporcionales de estas dos isoenzimas, la capacidad de decoloración resultó mayor al aumentar la proporción de Lacl, a pesar de mantener constante la cantidad total de actividad lacasa. Los mismos autores demostraron una relación lineal entre la relación Lacl/LaclI y los porcentajes de decoloración alcanzados. Estos resultados hacen evidente el hecho de que la decoloración de un colorante depende en gran medida de las isoenzimas presentes en el sobrenadante utilizado, y que cada isoenzima difiere en su capacidad de decoloración. Esto es algo importante a tener en cuenta al momento de pensar en posibles inductores, ya que, como se mencionó anteriormente, se obtienen diferentes patrones isoenzimáticos dependiendo del inductor empleado.

La decoloración de un sistema acuoso coloreado no siempre es signo de detoxificación. En el trabajo realizado por Ramsay & Nguyen (2002), se verificó la toxicidad remanente de diversos colorantes textiles luego de ser tratados con cultivos de *T. versicolor*. Los resultados indicaron que la toxicidad en algunos casos disminuyó, pero en otros permaneció inalterada o incluso aumentó con respecto a la solución sin tratar. La reducción anaeróbica de colorantes del tipo azo llevada a cabo por bacterias resulta en una desaparición del color, pero al mismo tiempo, en un aumento en la toxicidad debido a la producción de aminas aromáticas (Kulla *et al.*, 1983; Dubrow *et al.*, 1996). Esto remarca la importancia de monitorear la toxicidad luego de cualquier proceso de decoloración (Kaushik & Malik, 2009; Choi *et al.*, 2013; Rodriguez-Couto, 2013).

1.4.1.1. El colorante industrial Verde de Malaquita

El verde de malaquita (VM) es un colorante del tipo trifenilmetánico utilizado principalmente en la coloración de seda, lana y cuero, y como fungicida y antiséptico en criaderos de peces (Bergwerff & Scherpenisse, 2003; Srivastava *et al.*, 2004). Es tóxico para las bacterias y células de mamíferos aún en concentraciones muy bajas (Fessard *et al.*, 1999; Manel *et al.*, 2009). La toxicidad de este colorante aumenta con el tiempo de exposición, la temperatura y la concentración. Ha sido reportado como causante de carcinogénesis, mutagénesis, fracturas cromosomales, teratogénesis y toxicidad respiratoria (Srivastava *et al.*, 2004). A pesar de que el uso de este colorante se encuentra prohibido en muchos países y no es aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos, aún se sigue utilizando dado su bajo costo, fácil manejo y eficacia (Schnick, 1988).

Debido a su toxicidad hacia la mayoría de los microorganismos, su presencia en efluentes hace difícil su biodegradación. La degradación de este colorante por métodos físicos o químicos como adsorción, precipitación química, fotólisis, oxidación química o fotodegradación es costosa y metodológicamente demandante, consume mucho tiempo y muchas veces no es efectiva (Cooper, 1995; Robinson, 2001).

Entre los hongos causantes de pudrición blanca, las especies del género *Trametes* son una de las principales fuentes de enzimas lacasas, con propiedades muy atractivas como termotolerancia y alta resistencia a pH alcalinos, acidez extrema, solventes orgánicos y metales pesados (Boonlue *et al.*, 2003; Hildén *et al.*, 2009; Grassi *et al.*, 2011; Daâssi *et al.*, 2013).

Existen numerosos trabajos en los que se citan distintas especies de *Trametes*, y a *T. versicolor* en particular, como eficientes decoloradores y degradadores de este colorante (Papinutti *et al.*, 2006; Diorio *et al.*, 2008; Maalej-Kammoun *et al.*, 2009; Manel *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2014a).

Como sucede con el resto de los colorantes industriales, la decoloración se ve afectada por factores como la temperatura, el pH y los iones metálicos presentes en el medio. Yan *et al.* (2014b) estudiaron el efecto de estos factores sobre la decoloración de VM por una cepa de *T. trogii*. Encontraron que los iones Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} y Na^{2+} (100 mM) no causaron ningún efecto significativo en la degradación del VM. El Cu^{2+} (100 mM) inhibió la decoloración, así como el Ni^{2+} (100 mM), Ca^{2+} (100 mM) y Fe^{3+} (1mM). Estudios previos ya habían demostrado que el Fe^{2+} afecta severamente la estabilidad de la enzima lacasa en *Trametes* (Rodríguez Couto *et al.*, 2005; Grassi *et al.*, 2011).

En cuanto al efecto del pH, *T. trogii* fue capaz de decolorar VM en un rango de pH muy amplio, desde 4.5 a 7, pero su óptimo se alcanzó a pH 6. La temperatura juega un papel muy importante, ya que los porcentajes de decoloración obtenidos fueron de 32.5, 29.9, 55.0, 68.7, 72.3, 80.3 y 83.1% a 30, 35, 40, 50, 60, 70 y 75°C, respectivamente. El efecto de la temperatura sobre la decoloración de VM había sido previamente reportado por Younes *et al.* (2012). También se demostró en el trabajo de Yan *et al.* (2014a) que existe una correlación entre la oxidación de ABTS y la decoloración del VM, y que no se detecta actividad MnP en el sobrenadante del cultivo, lo que indicaría que la lacasa es la principal responsable de la decoloración del VM en las condiciones evaluadas. Como ya se mencionó, la presencia de sales en el sistema suele afectar el funcionamiento de las enzimas, y por ende el proceso de decoloración. Sin embargo, la decoloración del VM por parte de esta cepa de *T. trogii* no fue seriamente afectada en presencia de 100 mM NaCl.

1.5. Co-cultivo de hongos de pudrición blanca

En la búsqueda de condiciones de cultivos óptimas para una alta producción de enzimas ligninolíticas se han ensayados muchísimas alternativas, desde distintas fuentes de C y N hasta todo tipo de posibles inductores. En la mayoría de los trabajos se demostró que el mejor inductor de

la síntesis de lacasa es el cobre, pero la utilización de este metal en procesos de biorremediación no es adecuado, debido a su toxicidad (Gaetke & Chow, 2003).

La interacción interespecífica entre hongos productores de pudrición blanca o con otros tipos de hongos o bacterias demostró promover la producción de lacasa (Savoie *et al.*, 1998; Asgher *et al.*, 2012a). Asgher (2012b) comprobó que el co-cultivo de *G. lucidum* y *P. chrysosporium* es capaz de producir enzimas lacasa, MnP y LiP y de decolorar y detoxificar un efluente de una industria textil en 3 días de tratamiento utilizando $MnSO_4$ como mediador. En el trabajo de Hiscox *et al.* (2010) se realizaron confrontamientos entre distintos hongos degradadores de madera y una cepa de *T. versicolor* y se encontró que en todos los casos se produce un aumento de la actividad lacasa en la zona de interacción de los dos hongos, aunque el incremento varía dependiendo de la identidad del competidor. En este trabajo también se encontró un incremento de la actividad MnP como consecuencia del co-cultivo, aunque en reportes previos no se habían encontrado estos resultados (Baldrian, 2004). Hay muchos otros casos reportados de incremento de actividad lacasa en condiciones de co-cultivo (Zhang, 2006; Velázquez-Cedeño, 2007). Además de degradar la lignina, la enzima lacasa participa en muchas otras funciones fisiológicas, como por ejemplo defensa ante situaciones de estrés. La interacción del hongo con otro microorganismo dispararía este mecanismo de defensa (Velázquez-Cedeño, 2007).

1.6. Preservantes de maderas

El preservante de maderas CCA (Cobre-Cromo-Arsénico) es uno de los más utilizados debido a su excelente actividad antimicrobiana y anti-termitas. Consiste en una mezcla de óxidos de cromo hexavalente (CrO_3) (47.5%), cobre divalente (CuO) (18.5%) y arsénico pentavalente (As_2O_5) (34%). Es altamente efectivo en una amplia gama de aplicaciones en exteriores (Singh & Singh, 2014). Sin embargo, al finalizar su vida útil, las maderas tratadas con este preservante representan un problema para el medio ambiente y es

necesario desarrollar procesos efectivos para su detoxificación. Una alternativa es utilizar microorganismos capaces de promover la lixiviación de metales de la madera tratada (Clausen & Smith, 1998; Kartal *et al.*, 2004). La biorremediación de maderas tratadas con CCA mediante la utilización de hongos causantes de pudrición marrón fue evaluada por Kartal *et al.* (2004) encontrando que el proceso resulta mediado por el ácido oxálico producido por los hongos, el cual incrementa la acidez del sustrato y la solubilidad de los metales. Debido a esto el pH del medio de cultivo puede llegar a valores de acidez de entre 1.8-2.0. La técnica de fermentación en estado sólido utilizando hongos causantes de pudrición marrón tolerantes al cobre es una alternativa prometedora para la biorremediación de maderas tratadas con cobre, cromo y/o arsénico (Sierra-Alvarez, 2009). En contraste, en el caso de los hongos de pudrición blanca, en general sólo trazas de ácido oxálico son detectadas en los medios de cultivo (Sierra-Alvarez, 2007). Estos hongos también son capaces de degradar otro preservante muy utilizado, la creosota, gracias a su capacidad para mineralizar hidrocarburos aromáticos policíclicos. Por todo esto, resulta interesante encontrar nuevas cepas de hongos que puedan ser utilizadas en la biorremediación o bioconversión de CCA y otros preservantes a base de metales pesados.

1.7. Perspectivas a futuro

Las investigaciones que se están llevando a cabo actualmente apuntan a optimizar el rendimiento de los procesos de biorremediación y a disminuir sus costos. Una forma de operar a escala industrial minimizando los costos es identificar y/o generar cepas de hongos y enzimas mejor adaptadas a las condiciones del proceso que se quiere llevar a cabo. En este último punto la ingeniería genética juega un rol muy importante. Otra forma de lograr mejores resultados es incrementar la eficiencia de tecnologías ya establecidas, por ejemplo, operaciones a escala industrial pueden beneficiarse con mejores técnicas de inmovilización de biomasa fúngica para la remoción de sustancias tóxicas en efluentes industriales (Singh & Singh, 2014). Otro aspecto que merece ser estudiado en mayor profundidad es el co-cultivo de varias especies

de hongos degradadores de madera para mejorar el biopulpado o para incrementar la producción de enzimas ligninolíticas para su aplicación en diferentes procesos biotecnológicos (Flores *et al.*, 2009).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

El objetivo general fue seleccionar un nuevo aislamiento perteneciente al grupo de los Trametoides de acuerdo a su capacidad de producción de enzimas ligninolíticas y decoloración de distintos tintes industriales, y optimizar las condiciones para dicha producción enzimática con miras a su aplicación en procesos de biorremediación de efluentes industriales.

2.2. Objetivos específicos

- Recolectar nuevos aislamientos de hongos nativos pertenecientes al grupo Trametes y realizar un relevamiento en placa de su capacidad de producción enzimática lignocelulolítica y de decoloración de tintes industriales.
- Evaluar la capacidad de los distintos aislamientos para crecer en medio líquido en presencia del colorante verde de malaquita y producir actividad ligninolítica lacasa.
- Corroborar mediante técnicas moleculares la identificación de los nuevos aislamientos.
- Estudiar la producción de enzimas lignocelulolíticas en un aislamiento seleccionado por su capacidad de decoloración y evaluar el efecto de distintas condiciones de cultivo sobre la producción de ligninasas.
- Comparar la producción enzimática *in-vitro* con ensayos de degradación de sustratos naturales empleando cultivos del hongo.
- Evaluar el efecto del pH y la temperatura sobre la estabilidad de la enzima lacasa. Establecer la temperatura y el pH óptimos para su actividad.
- Determinar la capacidad de degradar y detoxificar colorantes industriales, especialmente verde de malaquita.

- Evaluar el efecto del cocultivo con otro hongo causante de pudrición blanca sobre la producción ligninolítica lacasa y la decoloración de verde de malaquita.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Organismos

Se trabajó con ejemplares con características trametoides, obtenidos a partir de distintas campañas de recolección. En el laboratorio se realizó una primera selección en base a caracteres morfológicos y luego se intentaron lograr aislamientos de cada basidioma. Finalmente se obtuvieron 7 nuevos aislamientos que lograron ser identificados a nivel de especie mediante técnicas moleculares (**Tabla 2**), los cuales se compararon con un aislamiento proveniente del cepario BAFC (*T. versicolor* BAFC 4272), el cuál no había sido investigado previamente. Todas las cepas utilizadas en esta Tesis se encuentran actualmente en el cepario BAFC.

Tabla 2: Nuevos aislamientos obtenidos y analizados en cuanto a su potencial para ser aplicadas en biorremediación.

Especie	Lugar de colección	N° cepario
<i>Trametes versicolor</i>	Florida, Bs. As.	BAFC 4272
<i>T. elegans</i>	Oberá, Misiones	BAFC 4524
<i>T. hirsuta</i>	CABA	BAFC 3136
<i>T. cingulata</i>	Don Torcuato, Bs As	BAFC 3133
<i>Coriolopsis gallica</i>	CABA	BAFC 3135
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	El Palmar, Entre Ríos.	BAFC 4523
<i>T. afin. marianna</i>	Santiago del Estero	BAFC 3134
<i>C. gallica</i>	CABA	BAFC 3137

Luego de los relevamientos iniciales se continuó trabajando con la cepa de *T. versicolor* BAFC 4272.

Se utilizó *Ganoderma lucidum* E47 (University of Guelph, Canadá) para los ensayos de cocultivo, y *P. chrysosporium* BKMF 1767 (EEUU) como bioindicador para las experiencias de detoxificación del colorante verde de malaquita.

Las cepas se mantuvieron en tubos pico de flauta con medio MEA a 4°C.

3.2. Medios de cultivo

3.2.1. Medios agarizados

3.2.1.1. Medio MEA

Extracto de malta 12 gL⁻¹; Glucosa 10 gL⁻¹; Agar 20 gL⁻¹

3.2.1.2. Medio APG

Papa pelada 300 gL⁻¹ ; Glucosa 10 gL⁻¹; Agar 20 gL⁻¹

La papa cortada se hierve 30 min. en agua destilada. El caldo de papa se recupera filtrando por una gasa, se agrega la glucosa y se lleva a volumen.

3.2.1.3. Medio GA (agarizado)

Medio GA al cual se le agregó agar (20 gL⁻¹) antes de autoclavar (ver punto siguiente).

3.2.2. Medios líquidos

3.2.2.1. Medio GA

Glucosa 10 gL⁻¹; Asparagina monohidrato 4 gL⁻¹; MgSO₄·7H₂O 0.5 gL⁻¹; KH₂PO₄ 0.5 gL⁻¹; K₂HPO₄ 0.6 gL⁻¹; Tiamina 0.1 mgL⁻¹; Biotina 0.05 mgL⁻¹; Solución de micronutrientes 0.2 %

Solución de micronutrientes: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.4 mgL^{-1} ; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.09 mgL^{-1} ; H_3BO_3 0.07 mgL^{-1} ; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.02 mgL^{-1} ; FeCl_3 1 mgL^{-1} ; ZnCl_2 3.5 mgL^{-1} .

Para evaluar el efecto de distintas **fuentes de nitrógeno** sobre el crecimiento y la actividad ligninolítica, se reemplazó la asparagina del medio GA por una concentración equivalente ($\text{N } 0.75 \text{ gL}^{-1}$) de las siguientes fuentes: ácido glutámico, sulfato de amonio, peptona (10% N) o glicina. Se ajustó el pH inicial a 6.

Para evaluar las **actividades amilasa, polimetilgalacturonasa, endoglucanasa y endoxilanas**, se reemplazó la glucosa del medio GA por 10 gL^{-1} de otras fuentes de carbono, alternativamente: almidón, pectina de manzana, celulosa cristalina o xilano de avena. Se ajustó el pH inicial a 6.

Se evaluó el efecto de los **metales pesados** cobre (1 mM) (adicionado como CuSO_4) y manganeso (0.5 mM) (adicionado como MnSO_4); compuestos aromáticos: ácido ferúlico (1 mM), cumarina (1 mM), vainillina (1 mM), ácido vainílico (1 mM) y del colorante azoico xilidina ($50 \mu\text{M}$), sobre el crecimiento y la actividad ligninolítica. Dichos compuestos fueron adicionados al medio de cultivo antes de su esterilización por autoclave.

3.2.3. Fermentación en medio sólido (SSF)

Para las fermentaciones en estado sólido se utilizaron sustratos naturales. La humedad del sistema se ajustó a 75% y se esterilizó en autoclave 1 h a 121°C .

Para la curva de crecimiento se utilizó salvado de trigo (*Triticum aestivum*).

Para los ensayos de cocultivo se utilizó aserrín de álamo (*Populus* sp.).

Para los ensayos con preservantes industriales para maderas se utilizó aserrín de pino (*Pinus* sp.).

3.3. Condiciones de cultivo

Las fermentaciones en medio líquido se realizaron en Erlenmeyers de 250 mL conteniendo 40 mL de medio.

Las fermentaciones en SSF se realizaron en Erlenmeyers de 125 mL conteniendo 4 gramos de sustrato seco, que luego fue llevado a un 75% de humedad.

En el caso de los ensayos de cocultivo en placa, los inóculos se sembraron en cajas de Petri con medio MEA, en forma enfrentada, próximos al borde de la caja. Se utilizaron medios MEA y APG, agarizados.

Todos los cultivos fueron incubados a 28°C, en condiciones estáticas y de iluminación permanente.

3.4. Inóculos

En todos los casos el inóculo consistió en un taco de agar de 25 mm² cubierto con micelio, cortado del borde de una colonia de 7 días de crecimiento en medio MEA, con la excepción de los ensayos de cocultivo; para estos experimentos los medios fueron inoculados con 5% (peso húmedo) de semillas de avena (*Avena sativa*) colonizadas con la cepa correspondiente.

3.5. Procesamiento de los cultivos

3.5.1. Fermentaciones en medio líquido

Los cultivos en medios líquidos fueron cosechados y filtrados en embudo Büchner a presión reducida sobre discos de papel de filtro Whatman, y colocados en estufa a 80°C durante 48 h. El crecimiento fue estimado a través del peso seco del micelio, en los medios de cultivo que permitieron su

valoración por este método (se excluye por lo tanto el medio con celulosa cristalina).

Para evaluar el efecto de las distintas fuentes de nitrógeno sobre la producción enzimática se tomaron estérilmente muestras periódicas del sobrenadante y se cosechó luego de 21 días de incubación.

Para evaluar el efecto de las distintas fuentes de carbono sobre la producción enzimática se tomaron estérilmente muestras periódicas de sobrenadante y se cosechó al cabo de 27 días de incubación.

Para evaluar el efecto de los metales pesados y compuestos aromáticos sobre la producción enzimática se tomaron estérilmente muestras periódicas del sobrenadante y se cosechó luego de 23 días de incubación.

3.5.2. Fermentaciones en medio sólido

Los extractos provenientes de SSF se realizaron con agua destilada, utilizando 20 mL de agua por cada 4 g de peso fresco del cultivo. Se agitaron durante 20 min. con agitador magnético y se filtraron utilizando una tela de nylon. El sobrenadante fue centrifugado 10 min. a 1000 rpm.

3.5.3. Ensayos de cocultivo

Luego de 14 días de crecimiento los monocultivos fueron procesados mecánicamente con un mixer doméstico para alimentos en condiciones de esterilidad. Los cocultivos se formaron mezclando cantidades iguales de cada cultivo puro. Parte de los monocultivos procesados se utilizaron como controles para evaluar el efecto del disturbio ocasionado. Todos los cultivos (monocultivos y cocultivos) fueron incubados a 28°C durante 14 días más.

3.6. Determinaciones analíticas

3.6.1. Azúcares reductores

Se determinaron mediante el método de Somogyi y Nelson (Nelson, 1944, Somogyi, 1945) utilizando glucosa como patrón para la curva de calibración.

3.6.2. Determinación del contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina (ensayos de cocultivo)

Muestras del medio SSF (aproximadamente 500 mg) fueron secadas a 50°C y analizadas en su composición. La hemicelulosa fue determinada de acuerdo a Cheng *et al.* (2010). La lignina Klason fue cuantificada de acuerdo al método TAPPI (TAPPI method: Acid insoluble lignin in Wood and pulp T222 om-83 1983). La cantidad de celulosa fue calculada por defecto [100%-(hemicelulosa+Lignina Klason)].

3.7. Actividades enzimáticas

3.7.1. Actividad Endo- β -D-1,4-glucanasa (E.C.3.2.1.4)

Para la mezcla de reacción se utilizó 0.1 mL de sobrenadante en 0.4 mL de una solución de carboximetilcelulosa (CMC) al 0.5% en buffer acetato de sodio 50 mM, pH 4.8. Se incubó a 50°C durante 30 min. Se cuantificaron azúcares reductores liberados por el método de Somogyi-Nelson usando glucosa como standard.

3.7.2. Actividad amilasa total

Para la mezcla de reacción se utilizó 0.1 mL de sobrenadante en 0.4 mL de una solución de almidón soluble al 2% en buffer acetato de sodio 50 mM, pH 5 (Teller, 1950). Se incubó a 50°C durante 30 min. Se cuantificaron azúcares reductores liberados por el método de Somogyi-Nelson usando glucosa como standard. Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de glucosa por minuto.

3.7.3. Actividad Endo- β -D-1,4-xilanasas (E.C.3.2.1.8)

Para la mezcla de reacción se utilizó 0.1 mL de sobrenadante en 0.4 mL de una solución de xilano de avena al 0.2% en buffer acetato de sodio 50 mM, pH 4.8. Se incubó a 50°C durante 30 min. Se cuantificaron azúcares reductores liberados por el método de Somogyi-Nelson usando xilosa como standard. Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de xilosa por minuto.

3.7.4. Actividad Polimetilgalacturonasa (actividad endo y exo) (PMG)

Para la mezcla de reacción se utilizó 0.1 mL de sobrenadante en 0.4 mL de suspensión de pectina de manzana al 0.1% en buffer acetato de sodio 50 mM, pH 5.5. Se incubó a 50°C durante 30 min. Se cuantificaron azúcares reductores liberados por el método de Somogyi-Nelson usando ácido galacturónico como standard. Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de ácido galacturónico por minuto.

3.7.5. Actividad Lacasa (E.C.1.10.3.2)

Se utilizó como sustrato 2,6-dimetoxifenol (DMP) en buffer acetato de sodio 0.1 mM (pH 3.5) (Shuttleworth *et al.*, 1986), el ensayo se realizó a 30°C. Se midió el incremento en la absorbancia a 469 nm ($\epsilon_{469} = 27.5 \text{ mM cm}^{-1}$). Para cuantificar esta actividad en placas de Petri con medios agarizados se cortaron tacos de agar con micelio de 5 mm de diámetro, los cuales fueron agregados al buffer de reacción que contiene el sustrato de la enzima en una relación de 20 mg de agar mL⁻¹ de buffer de reacción. Una unidad de actividad enzimática (UE) fue definida como la cantidad de enzima requerida para oxidar 1 μmol de sustrato en 1 min.

Para detectar cualitativamente actividad lacasa en medios agarizados en caja de Petri se adicionó al medio de cultivo DMP 1mM. La actividad lacasa se revela como un halo de color naranja alrededor del borde de la colonia en crecimiento, producto de la oxidación del DMP (Fonseca *et al.*, 2010).

En el caso de los cocultivos en caja de Petri, las placas fueron incubadas con DMP 5 mM en buffer acetato de sodio, pH 3.6. La intensidad de color (producida por la oxidación del DMP) fue evaluada visualmente al cabo 5, 10 y 15 min. y se utilizó un rango arbitrario de 0 a 5 de acuerdo a Davidson *et al.* (1938) para determinar cualitativamente la actividad lacasa.

3.7.6. Actividad Manganeso peroxidasa (MnP) (E.C.1.11.1.13)

Se utilizó como sustrato rojo fenol 0.01% en buffer succinato de sodio 0.1 M, pH 4.5 y H₂O₂ 0.2 mM. La reacción fue detenida luego de 10 min de incubación a 30°C agregando 40 μL de NaOH 5 N. Las muestras fueron centrifugadas y se midió su absorbancia a 610 nm ($\epsilon_{610} = 22 \text{ mM cm}^{-1}$) (Glenn & Gold, 1985). Una unidad de actividad enzimática (UE) fue definida como la cantidad de enzima requerida para oxidar 1 μmol de sustrato en 1 min.

Para cuantificar esta actividad en cajas de Petri se utilizaron medios agarizados adicionados con cloruro de manganeso (MnCl₂·4H₂O) 1 mM. La actividad se revela como un halo de precipitado color marrón producto de la oxidación del manganeso (Jarosz-Wilkolazka *et al.*, 2002b).

3.7.7. Actividad Lignin peroxidasa (E.C.1.11.1.14)

La actividad Lignin peroxidasa (LiP) se determinó siguiendo el método de Archibald (1992), utilizando Azure B 32 μM en buffer tartrato de sodio 50 mM, pH 4.5, y H_2O_2 . Se leyó la disminución de la absorbancia a 650 nm. Una unidad enzimática (UE) fue determinada como la cantidad de enzima que causa un cambio en la absorbancia de 0.1 bajo las condiciones del ensayo.

Para revelar la actividad LiP en cajas de Petri se utilizaron medios agarizados adicionados con Azure B 50 μM y se midió el halo de degradación alrededor de la colonia en crecimiento.

3.8. Temperatura y pH optimos para la actividad lacasa

3.8.1. Temperatura óptima

Para establecer la temperatura óptima, la actividad lacasa fue medida realizando la reacción a 30, 50, 60 y 70°C utilizando 2,6-DMP como sustrato según se explicó previamente. La medición se realizó luego de que el sobrenadante permaneció en cada temperatura durante 10 min.

3.8.2. pH óptimo

Para establecer el pH óptimo la actividad enzimática fue evaluada a 30°C (temperatura óptima), a distintos pHs (3,4,5 y 6) utilizando buffer citrato-fosfato.

3.9. Ensayos de estabilidad de la enzima lacasa

3.9.1. Efecto de la temperatura

Se utilizaron sobrenadantes de 25 días de cultivo en medio GA, medio GA adicionado con cobre 1 mM, y medio GA adicionado con VM 80 μM . Estos sobrenadantes fueron incubados a diferentes temperaturas (30, 50, 60 y 70°C) y se tomaron alícuotas a diferentes intervalos de tiempo, éstas fueron enfriadas y su actividad lacasa fue determinada en condiciones estándares.

3.9.2. Efecto del pH

El sobrenadante de 25 días de cultivo en medio GA fue incubado a 30 y 70°C a diferentes pHs (3,4,5 y 6) utilizando buffer citrato-fosfato. Se tomaron alícuotas a distintos intervalos de tiempo y su actividad lacasa fue determinada en condiciones estándares.

3.10. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las separaciones electroforéticas de proteínas fueron realizadas en geles de poliacrilamida al 9% y se utilizó Novex Sharp Protein Standar (LifeTechnologies) como marcador de peso molecular. Las calles fueron sembradas con un volumen de 30 μL conteniendo una actividad lacasa equivalente (0.01 UE mL^{-1}). Luego de la corrida electroforética los geles fueron fijados en una mezcla de metanol, ácido acético y agua, en relación 1:1:1 por 5 min., luego fueron sumergidos en una solución 5 mM de DMP en buffer acetato de sodio pH 3.6 e incubados a temperatura ambiente (25°C) hasta la aparición de bandas indicadoras de actividad lacasa (de color naranja amarronado).

En el caso de los ensayos con VM se sumergió el gel en una solución del colorante 50 μM con hidroxibenzotriazol (HBT) 5 mM con el fin de evaluar la capacidad de decolorar VM de las distintas isoenzimas.

3.11. Extracción de DNA, amplificación por PCR, purificación y cuantificación.

El DNA fue extraído de los especímenes de herbario y tratado según las indicaciones del Kit UltraClean Microbial DNA Isolation (MO BIO).

Para su amplificación se utilizaron marcadores moleculares ITS1 e ITS4 (**Tabla 3**)

Tabla 3: marcadores moleculares utilizados en la secuenciación.

Primer	Secuencia	Marca
ITS1 (forward)	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	Invitrogen
ITS4 (reverse)	TCCTCCGCTTATTGATATGC	Invitrogen

Los parámetros utilizados para los ciclos de PCR fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 3 min., seguidos de 45 ciclo de desnaturalización a 94°C por 45 seg., annealing a 55 °C por 45 seg. y extensión a 72°C por 1 min., con una extensión final a 72°C durante 7 min. Los productos de PCR fueron purificados utilizando ChargeSwitch-Pro PCR Cleanup Kit (Invitrogen) y cuantificados utilizando el Kit Qubit (Life technologies). La secuenciación fue llevada a cabo por el servicio de secuenciación del departamento de Ecología, Genética y Evolución de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA) utilizando los mismos primers que en la PCR.

Con las secuencias obtenidas se realizó una búsqueda utilizando el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) disponible en la base de datos NCBI-GenBank (National Centre for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Como secuencias resultantes de esta búsqueda, sólo se consideraron aquellas de entidades taxonómicas adecuadamente determinadas y publicadas en revistas reconocidas, que presentaran el mayor porcentaje de homología. Se utilizó el programa BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.5.3 (Hall 1999), para el manejo de las secuencias.

3.12. Ensayos de decoloración de colorantes industriales

3.12.1. Colorantes industriales utilizados en los ensayos de decoloración

Los colorantes utilizados, su naturaleza química y la longitud de onda a la cuál fue medida la desaparición del color se detallan en la **Tabla 4**.

Tabla 4: Colorantes industriales utilizados.

Colorante	Tipo	Longitud de onda (nm)
Azure B	Heterocíclico	650
Indigo Carmín	Indigoide	609
RBBR	Antraquinónico	592
Verde de Malaquita	Trifenilmetánico	615
Xilidina Ponceau	Azoico	505

Para el ensayo de decoloración simultánea de colorantes se utilizó una mezcla equimolar, 10 μM de cada uno los colorantes en agua destilada estéril.

3.12.2. Degradación de colorantes industriales en medios agarizados

La capacidad de *T. versicolor* BAFC 4272 para decolorar diferentes tipos de colorantes industriales fue evaluada cualitativamente en cajas de Petri con medios MEA y GA adicionados con los 5 colorantes indicados en la **Tabla 4** en una concentración final de 50 μM . Estos medios fueron autoclavados por 20 min. a 1 atm y 121°C, con excepción del medio con Índigo Carmín. Dado que este colorante pierde su color al ser expuesto a condiciones de alta

temperatura y presión, fue adicionado en condiciones de esterilidad luego de la esterilización del medio. Las cajas fueron inoculadas e incubadas entre 21 y 28 días, dependiendo del colorante. Se registró diariamente el diámetro de la colonia y del halo de decoloración. Cajas de Petri con medio sin colorantes fueron inoculadas como control de crecimiento. Medios adicionados con colorantes pero sin inocular fueron utilizados como control de decoloración por factores abióticos.

3.12.3. Degradación de una mezcla de colorantes industriales en medio líquido adicionado con distintos inductores de la actividad lacasa.

Para evaluar la decoloración en medio líquido se agregó la mezcla equimolar de los 5 colorantes industriales (10 μM de cada uno los colorantes) a cultivos de *T. versicolor* BAFC 4272 de 9 días de crecimiento en medio GA adicionado con distintos inductores de la actividad ligninolítica [manganeso 0.5 mM (adicionado como MnSO_4), cobre 1 mM (adicionado como CuSO_4), cumarina 1 mM o vainillina 1 mM]. Para estimar el porcentaje de decoloración de la mezcla se midió la disminución de absorbancia a las 5 longitudes de onda correspondientes a cada uno de los colorantes, se graficó y calculó el área bajo la curva utilizando el programa ImageJ.

3.13. Ensayos con Verde de Malaquita

Dado que entre los colorantes ensayados en medio agarizado el VM incrementó notablemente la actividad lacasa, este colorante fue elegido para continuar con los ensayos en medio líquidos.

3.13.1. Efecto de la concentración de VM en combinación con cobre 1 mM sobre el crecimiento y las actividades lacasa y MnP en medio líquido

Distintas concentraciones de VM (5, 10, 20, 40, 80 y 160 μM) combinadas o no con cobre 1 mM, un conocido inductor de la actividad lacasa, fueron adicionadas en forma estéril a cultivos de *T. versicolor* BAFC 4272 de 11 días de crecimiento. Periódicamente se tomaron muestras de sobrenadante que fueron guardadas en freezer a -20°C hasta el momento de su utilización. Los cultivos fueron incubados durante un total de 22 días al cabo de los cuales fueron cosechados y filtrados.

3.13.2. Efecto de compuestos aromáticos, cobre y manganeso en combinación con VM sobre el crecimiento y las actividades lacasa y MnP en medio líquido

Se confeccionaron medios de cultivo GA adicionados con inductores de actividad ligninolítica [manganeso 0.5 mM (adicionado como MnSO_4), cobre 1 mM (adicionado como CuSO_4), cumarina 1 mM, vainillina 1 mM o ácido ferúlico 1 mM], Estos medios fueron inoculados con *T. versicolor* BAFC 4272 y luego de 11 días de crecimiento los cultivos fueron separados en dos lotes, uno de los cuales fue adicionado con MG 80 μM . Ambos lotes continuaron su incubación durante 11 días más. Periódicamente se tomaron muestras de los cultivos en forma estéril y se guardaron en freezer a -20°C hasta el momento de su utilización. Al cabo de 22 días los cultivos fueron cosechados y filtrados.

3.13.3. Degradación y detoxificación de VM

La degradación del VM en cultivos líquidos fue determinada espectrofotométricamente midiendo la disminución en la absorbancia a 618 nm (Papinutti & Forchiassin, 2004). La concentración remanente de VM fue calculada utilizando una curva de calibración: concentración vs. absorbancia. Para cuantificar la cantidad de VM adsorbida al micelio del hongo, éste fue colocado en una solución etanol:agua (1:1) y agitado durante 60 min.

Para los ensayos de detoxificación se utilizaron sobrenadantes de cultivos de *T. versicolor* BAFC 4272 de 11 días de crecimiento en medio GA adicionado con cobre 2 mM. Un volumen de sobrenadante equivalente a 1 UE de actividad lacasa fue agregado a soluciones 20, 100 y 400 μM de VM y llevado a un volumen total de 6 mL con buffer acetato de sodio pH 3.6 adicionado con HBT 5 mM. Se realizaron controles con buffer y sobrenadante, y con todas las concentraciones de VM en buffer sin sobrenadante. El ensayo se realizó a 30°C y la decoloración se verificó espectrofotométricamente.

Las soluciones de VM tratadas con el sobrenadante del cultivo fueron utilizadas para componer medios de cultivo líquido (GA) y medios agarizados (MEA), los cuales fueron inoculados con *P. chrysosporium*, cuyo crecimiento se cuantificó midiendo diámetro de la colonia o mediante el peso seco del micelio en el caso de cultivos en medio líquido (Papinutti & Forchiassin, 2004). Los resultados se graficaron como porcentajes tomando como referencia los controles sin VM.

Para evaluar el efecto de la temperatura sobre la degradación y detoxificación de VM se realizaron ensayos a 30°C, 40°C y 50°C. Nuevamente se utilizaron sobrenadantes de cultivos de *T. versicolor* BAFC 4272 de 11 días de crecimiento en medio GA adicionado con cobre 2 mM. Para este ensayo se prepararon tubos de reacción conteniendo volúmenes de sobrenadante con distintas actividades enzimáticas (0.1; 0.3; 0.5; 0.7; 0.9; 1.1 y 1.3 UE), combinadas con diferentes concentraciones del mediador HBT (3, 4, 5, 6, 7), y se las llevó a un volumen final de 6 mL con buffer acetato de sodio pH 3.6. Luego se les agregó VM 400 μM y se incubó 4 horas en las distintas temperaturas. La decoloración se verificó espectrofotométricamente. Al igual que los ensayos realizados previamente, se utilizó la solución decolorada para confeccionar medios de cultivos líquido (GA), que fueron inoculados con *P. chrysosporium*. El crecimiento se estimó por medio del peso seco del micelio y los resultados se graficaron como porcentajes, tomando como referencia los controles sin VM.

3.13.4. Decoloración y detoxificación de VM en condiciones de cocultivo

Para determinar la capacidad de decoloración y detoxificación del sistema *T. versicolor*/*G. lucidum* 2 g del cultivo fresco SSF fueron transferidos a Erlenmeyers de 100 mL conteniendo 30 mL de una solución 50 μ M de VM en buffer acetato a pH 3.6. La decoloración fue medida espectrofotométricamente a una longitud de onda de 618 nm. Los datos de absorbancia fueron ajustados con una ecuación de decaimiento de una fase para calcular la vida media de decoloración del VM como el tiempo necesario para reducir la absorbancia de la solución a la mitad de su valor original. Para cuantificar la cantidad de colorante adsorbido al sustrato, muestras del medio SSF fueron colocadas en un medio con etanol:agua (1:1) y agitadas por 60 min. La concentración de VM en este medio fue medida espectrofotométricamente como se describió previamente, utilizando como control el extracto obtenido al realizar el mismo procedimiento con medio SSF tratado con agua en lugar de VM.

3.14. Degradación de madera de álamo y pino

Se prepararon medios de cultivo SSF con 140 g de aserrín de álamo y 15 g de semilla de avena en Erlenmeyers de 125 mL, y se hidrataron con agua estéril o con una solución de cobre 10 mM hasta llegar a un 70% de humedad en el sistema. Tacos de madera de álamo y pino de aproximadamente 4 x 1 x 0.5 cm fueron colocados dentro de los medios autoclavados, que fueron inoculados con 5% (peso húmedo) de semilla de avena colonizada con *T. versicolor* BAFC 4272. Los cultivos se incubaron durante 1 mes, luego los bloques de madera fueron retirados y limpiados, quitando el micelio superficial. Algunas réplicas fueron secadas a 80°C para determinar su peso seco y otras guardadas en alcohol etílico hasta el momento en que les fueron realizados cortes anatómicos a mano alzada. Estos cortes se observaron en un microscopio óptico con luz transmitida y con luz ultravioleta para observar la autofluorescencia de la lignina.

Se realizaron extractos acuosos de los medios de crecimiento utilizados y se midió la actividad lacasa.

3.15. Relevamiento de hongos trametoides con características trametoides

En distintas campañas se recolectaron más de 30 hongos trametoides, de los cuales 7 lograron ser aislados con éxito. Con estos nuevos aislamientos más el aislamiento proveniente del cepario BAFC se realizaron diferentes relevamientos en cajas de Petri para evaluar su capacidad para degradar colorantes industriales y producir enzimas celulolíticas y ligninolíticas. Se utilizaron medios GA agarizados suplementados con VM 50 μM , Azure B 50 μM [para evaluar actividad lignin-peroxidasa (Archibald, 1992)] y carboximetilcelulosa (CMC) 0.1% (en este último caso no se adicionó glucosa al medio GA) [para evaluar actividad celulolítica (Hankin & Anagnostakis, 1977)], y medios MEA con dimetoxifenol (DMP) 1 mM [para evaluar actividad lacasa (Fonseca *et al.*, 2010)] y $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1mM [para evaluar actividad MnP (Jarosz-Wilkolazka *et al.*, 2002b)]. Estos compuestos fueron adicionados al medio de cultivo antes de ser autoclavados.

Se realizaron mediciones diarias del diámetro de la colonia, de los halos de decoloración en el caso de los ensayos con colorantes y de los halos de reacción en el caso de los medios adicionados con DMP y cloruro de manganeso. La actividad celulolítica fue revelada utilizando una solución de Rojo Congo 0.3% que luego fue lavada con una solución de NaCl 1N. El Rojo Congo se acompleja con el CMC, las zonas degradadas se ven decoloradas.

3.16. Ensayos con el preservante industrial para maderas CCA

El preservante industrial CCA (Cobre-Cromo-Arsénico) consiste en una mezcla de óxidos de cromo hexavalente (CrO_3) (47.5%), cobre divalente (CuO) (18.5%) y arsénico pentavalente (As_2O_5) (34%). Para evaluar la capacidad de

T. versicolor BAFC 4272 para degradar este compuesto se prepararon medios SSF con 4 g de aserrín de pino y se llevó hasta un 75% de humedad con soluciones de CCA (0.1, 0.5, 1 y 3%). Se utilizaron Erlenmeyers de 125 mL. Los cultivos fueron inoculados con 3 tacos de agar de 25 mm² por cada Erlenmeyer, y fueron incubados por 3 meses, al cabo de los cuales se cosecharon. Se calculó la pérdida de peso seco y la actividad lacasa.

También se realizaron ensayos con CCA en cajas de Petri donde se utilizaron discos de papel de filtro embebidos en soluciones de CCA en agua (0.1, 0.2, 0.4 y 0.6%) que fueron colocados encima del medio de cultivo (MEA agarizado) siguiendo el método descrito por Guillén *et al.* (2009) modificado. Los inóculos se colocaron encima de este papel y se registró periódicamente el diámetro de crecimiento de la colonia. Se utilizaron papeles de filtro embebidos en agua estéril como control.

3.17. Análisis estadísticos

Todos los resultados presentados corresponden a las medias obtenidas a partir de triplicados con una desviación estándar menor al 5%. Las diferencias entre tratamientos fueron comparadas utilizando el test no paramétrico de Kruskal-Wallis con un nivel de probabilidad del 5%.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Relevamiento de hongos con características trametoides

Como resultado de distintas campañas se colectaron más de 30 hongos con características trametoides de los cuales 7 fueron aislados en forma exitosa. Estos nuevos aislamientos fueron determinados molecularmente mediante ITS. Todos ellos resultaron especies pertenecientes al grupo *Trametes* (Ko, 2000; García-Sandoval *et al.*, 2011; Rajchenberg, 2011) y son miembros de la familia Polyporaceae (Polyporales) (**Tabla 5**)

Tabla 5: Nuevos aislamientos identificados mediante ITS.

Aislamiento	% Cobertura	E value	% Identidad	Número de acceso
<i>Corioloopsis gallica</i> BAFC 3137	81	0.0	99	KC867379.1
<i>Pycnoporus sanguineus</i> BAFC 4523	92	0.0	96	KP723552.1
<i>Trametes hirsuta</i> BAFC 3136	99	0.0	99	KU350752.1
<i>T. cingulata</i> BAFC 3133	91	0.0	99	JN645075.1
<i>T. elegans</i> BAFC 4524	100	0.0	99	KF850160.1
<i>C. gallica</i> BAFC 3135	95	0.0	99	KC867379.1
<i>T. afin. marianna</i> BAFC 3134	92	0.0	98	KC848334.1

4.1.1. Evaluación cualitativa de las actividades enzimáticas y la capacidad de decoloración.

Para evaluar la capacidad de decoloración y la presencia de actividades enzimáticas los nuevos aislamientos fueron inoculadas en placas de Petri (90

mm de diámetro) conteniendo medio MEA (20 mL por placa), suplementado con uno de 4 diferentes colorantes: verde de malaquita, Azure B, Xilidina o RBBR a una concentración de 50 μ M, o adicionadas con 2,6-dimetoxifenol (DMP) 1 mM o cloruro de manganeso ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 1 mM, para evaluar actividad lacasa y manganeso peroxidasa respectivamente. El inóculo consistió en un taco de agar de 5 mm de diámetro tomado del borde de una colonia de 7 días de crecimiento en medio MEA y la incubación se realizó a 28 °C. El diámetro de crecimiento y los halos de decoloración y/o de actividad enzimática fueron medidos periódicamente y se determinaron las correspondientes tasas (**Tabla 6**).

Las tasas de crecimiento en medio MEA resultaron muy variables, las mayores fueron registradas en *T. versicolor* BAFC 4272, *T. hirsuta* BAFC 3136 y *P. sanguineus* BAFC 4523, en estos casos las tasas de decoloración promedio y de decoloración de VM también se encontraron entre las mayores registradas. Todos los aislamientos fueron capaces de decolorar los cuatro colorantes utilizados, excepto *T. cingulata* BAFC 3133 y *T. afin. marianna* BAFC 3134, que resultaron incapaces de decolorar VM en la concentración utilizada. Las tasas de decoloración de VM resultaron mucho menores que las del resto de los colorantes por lo cual no fueron incluidas en el promedio y se informan por separado. Las mayores tasas de decoloración de VM fueron las de *T. versicolor* BAFC 4272, *C. gallica* BAFC 3135 y *P. sanguineus* BAFC 4523.

En todos los casos el halo de decoloración se originó en el centro de la colonia y fue creciendo radialmente, con excepción de las placas adicionadas con azure B, en donde la decoloración ocurrió en forma difusa y formando parches en distintas zonas, por lo cual no fue posible medir halos de decoloración. Sólo en los casos de *T. hirsuta* BAFC 3136 y *T. versicolor* BAFC 4272 se observó un halo concéntrico de decoloración de azure B similar al producido en el resto de los colorantes. La decoloración de azure B es indicativo de actividad LiP (Archibald, 1992), y este método ha sido muy utilizado, sin embargo, en los últimos años se observó que la lacasa producida por *T. trogii* BAFC 463 también es capaz de decolorarlo (Grassi *et al.*, 2011), por lo cual, sería prudente confirmar la actividad LiP con alguna otra

metodología. Coincidiendo con lo reportado por Levin *et al.*, (2004), en la mayoría de los casos el diámetro de los halos de decoloración resulto menor que el diámetro de la colonia sugiriendo que la decoloración es propia de la actividad metabólica secundaria del hongo.

Con respecto a la evaluación cualitativa de actividades ligninolíticas, todas las especies mostraron presencia de halo de degradación de DMP, sugiriendo actividad lacasa, y en todos los casos el diámetro del halo de oxidación resultó mayor que el diámetro de crecimiento de la colonia. La actividad MnP fue registrada en la mayoría de los aislamientos, con excepción de *T. afin. marianna* BAFC 3134, *C. gallica* BAFC 3137 y *T. cingulata* BAFC 3133. Al contrario de lo observado en las placas con DMP, en las placas con Mn el diámetro del halo de actividad resultó menor que el diámetro de crecimiento de la colonia.

Tabla 6: Crecimiento, decoloración y actividades ligninolíticas en placa de Petri.

Aislamiento	Actividad MnP (mm/d)		Actividad Lacasa (mm/d)		Azure B (Actividad LiP)	Actividad celulasa	Tasa decoloración (mm/d)(promedio)	Tasa decoloración	Crecimiento en MEA (mm/d)
	TC	TC Halo	TC	TC Halo	TC			VM (mm/d)	
<i>T. versicolor</i> BAFC4272	11,17	8,23	12,02	13,10	8,32	+	13,00	4,2	16,67
<i>T. afin. marianna</i> BAFC 3134	10,75	-	8,61	11,16	6,74	+	6,10	-	8,03
<i>C. gallica</i> BAFC 3137	9,08	-	10,36	12,89	7,83	+	5,80	0,9	11,07
<i>T. elegans</i> BACF 4524	9,07	7,20	9,18	10,29	9,96	+	7,40	2,3	13,16
<i>T. hirsuta</i> BAFC 3136	12,77	9,68	13,33	17,16	3,39	+	9,80	4,1	17,50
<i>P. sanguineus</i> BAFC 4523	11,87	5,12	10,83	13,50	10,38	+	9,40	2,8	16,60
<i>C. gallica</i> BAFC 3135	14,35	4,49	17,00	22,00	12,79	+	9,20	3,6	13,47
<i>T. cingulata</i> BAFC 3133	2,19	-	8,77	11,57	7,32	+	7,70	-	8,79

4.1.2. Evaluación cuantitativa del crecimiento y la producción enzimática.

Se evaluó el crecimiento y la actividad lacasa en medio líquido, y el efecto del colorante VM sobre estos parámetros. Al cabo de 27 días de cultivo sin la adición del colorante *T. afin. marianna* BAFC 3134, *T. elegans* BAFC 4524, *C. gallica* BAFC 3135 y *T. versicolor* BAFC 4272 registraron los mayores valores de peso seco del micelio (**Fig. 22**). Sin embargo, las mayores biomásas alcanzadas en medio líquido no se corresponden con las mayores tasas de crecimiento en medio agarizado. Esto puede ser explicado teniendo en cuenta que el crecimiento en ambos medios es muy diferente, sobre la superficie del medio agarizado el micelio puede crecer más laxamente y alcanzar rápidamente un diámetro determinado, o por el contrario, resultar en colonias más densas y compactas sin que se advierta un rápido aumento del diámetro de las mismas. El crecimiento en una placa de Petri, estimado a través del diámetro de la colonia, es un dato cualitativo, es más fiable utilizar como dato el peso seco del micelio producido en un medio líquido. Otro punto a tener en cuenta es que en un medio líquido el micelio se cosecha un día determinado, y al comparar la biomasa entre distintas especies puede ocurrir que estas se encuentren en distintas fases de crecimiento, si una de ellas ya está en su fase de autólisis, por ejemplo, la biomasa cosechada no será la máxima producida por ese hongo. De todas maneras, más allá de los inconvenientes para hacer una correcta comparación, el objetivo en este trabajo es encontrar nuevos aislamientos capaces de crecer rápidamente en diferentes medios, lo que sería una ventaja a la hora de utilizarlos en posibles aplicaciones biotecnológicas, sobre todo en biorremediación.

Con respecto al efecto del VM, adicionado al día 13 de cultivo, los resultados fueron muy variables. En algunos casos como *T. elegans* BAFC 4524 y *C. gallica* BAFC 3135, el VM tuvo un efecto negativo sobre la biomasa final alcanzada (medida al cabo de 14 días adicionales de cultivo), lo cual no resulta extraño teniendo en cuenta que este colorante es utilizado ampliamente como fungicida. Sin embargo, en otros casos como *P. sanguineus* BAFC 4523, *T. cingulata* BAFC 3133 y *C. gallica* BAFC 3137, en los tratamientos en los que se agregó el colorante se detectó mayor crecimiento. En el caso de *T. hirsuta* BAFC 3136 y *T. versicolor* BAFC 4272 no se registraron efectos significativos.

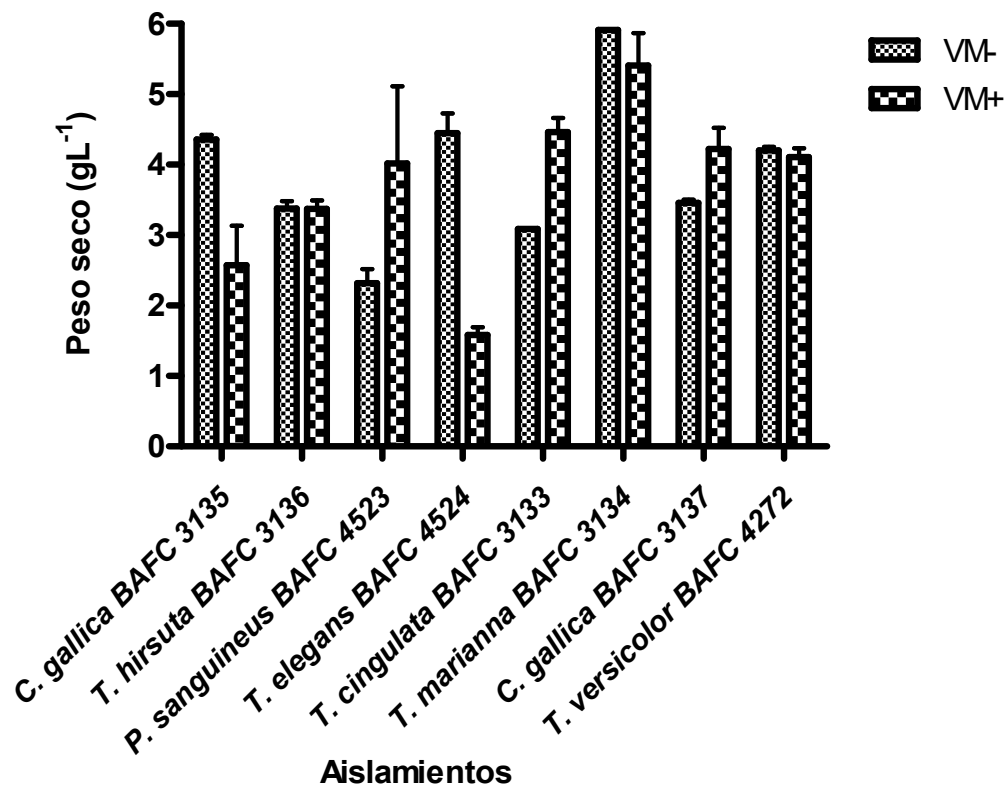
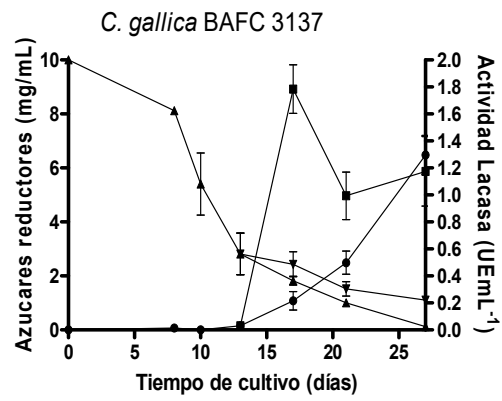
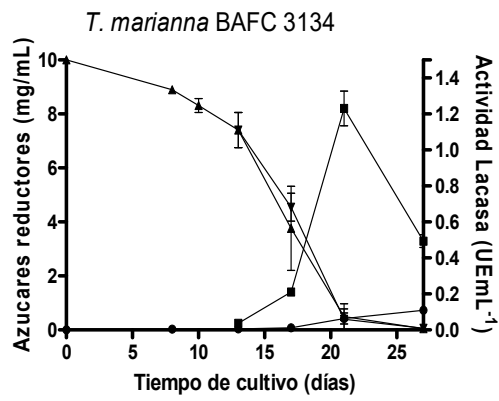
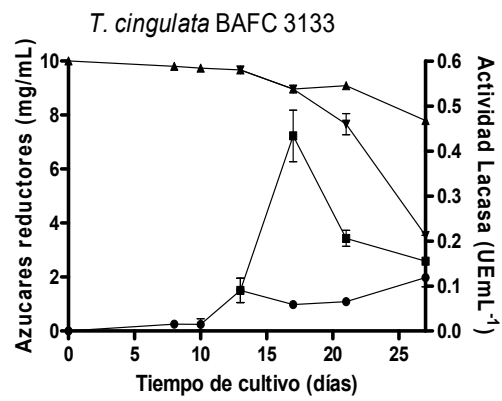
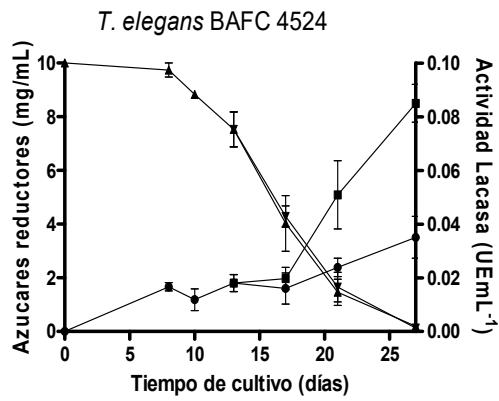
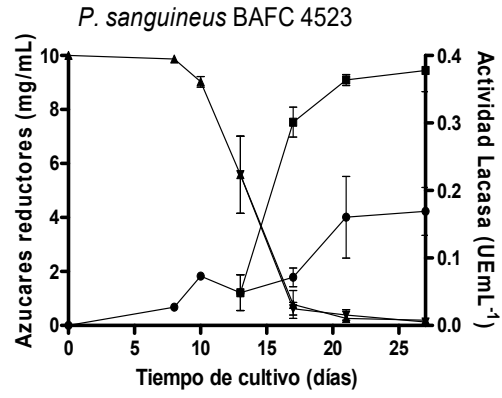
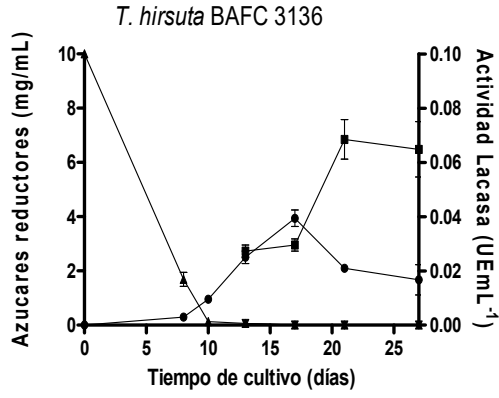


Figura 22: Efecto del colorante VM sobre el crecimiento de los nuevos aislamientos.

La adición de VM incrementó significativamente la actividad lacasa en todos los casos, en algunos de ellos como *T. cingulata* BAFC 3133, *C. gallica* BAFC 3137 y *C. gallica* BAFC 3135, se registró un pico de actividad alrededor del día 17, que luego decayó, en otros casos (*P. sanguineus* BAFC 4523, *T. elegans* BAFC 4524 y *T. versicolor* BAFC 4272) este pico no fue observado y la actividad lacasa registrada fue sostenida en el tiempo (**Fig. 23**).

En general la curva de consumo de azúcares no se vio significativamente afectada luego de la adición del colorante, excepto para *T. cingulata* BAFC 3133 y *C. gallica* BAFC 3135, cuyas curvas mostraron una mayor tasa de consumo de azúcares en comparación con los tratamientos sin VM (**Fig. 23**).

Teniendo en cuenta los objetivos de este trabajo, la idea fue encontrar aislamientos que respondan incrementando su actividad lacasa frente al estímulo del contaminante a degradar, en este caso, el colorante VM.



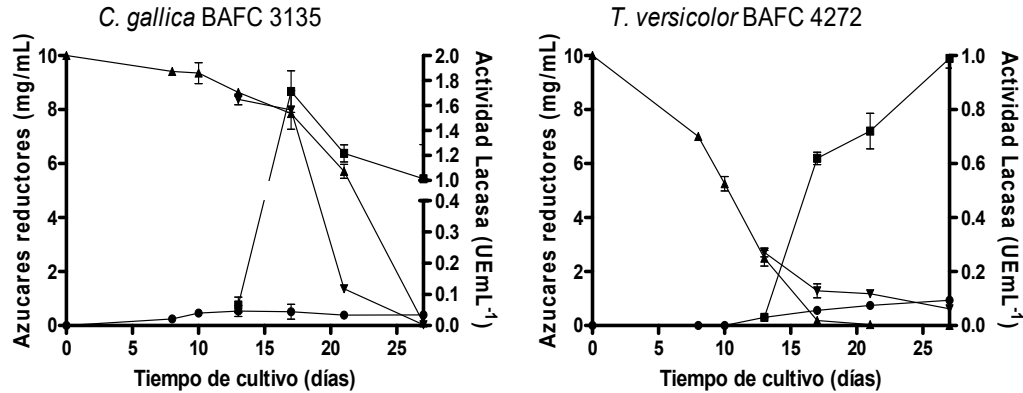


Figura 23: Curvas de consumo de azúcares y de actividad lacasa en cultivos líquidos en medio GA. ● Actividad lacasa VM-; ■ Actividad lacasa VM+; ▲ Azúcares VM-; ▼ Azúcares VM+.

Teniendo en cuenta la tasa de crecimiento, la biomasa final alcanzada, la actividad lacasa y las tasas de decoloración de colorantes químicamente diferentes (principalmente VM), se escogió a *T. versicolor* BAFC 4272 para continuar los ensayos.

4.2. Cinética de crecimiento y producción enzimática de *T. versicolor* BAFC 4272

4.2.1. Cinética de crecimiento

Se estudió la cinética de crecimiento del nuevo aislamiento de *T. versicolor* BAFC 4272 en medio líquido definido GA (**Fig. 24**).

El cultivo no mostró una fase lag correspondiente al período de adaptación a las nuevas condiciones de cultivo a pesar de haber sido transferido desde un medio agarizado MEA a un medio líquido GA, sino que comenzó a crecer inmediatamente como muestra la curva de peso seco del micelio. Los niveles de azúcares reductores disponibles en el medio de cultivo comenzaron por consumirse lentamente durante la primer semana, pero luego experimentaron una brusca caída al entrar el hongo en su fase de crecimiento exponencial, la cuál se mantuvo entre los días 7 y 15 de cultivo. A partir del día

15 se agotaron los azúcares en el medio de cultivo y el hongo entró en fase estacionaria, donde la biomasa se mantiene más o menos constante. Es también en esta etapa donde el pH del medio de cultivo, que inicialmente se encontraba en 5,5, comenzó a aumentar hasta llegar a 7,5. Este aumento podría deberse a una liberación de metabolitos secundarios, o a un aprovechamiento diferencial de los componentes del medio de cultivo. Incrementos similares en el pH del medio de cultivo, transcurrido cierto tiempo de incubación en medios con diferentes fuentes de carbono han sido reportados también en otros Basidiomycota: *H. annosum* (Johansson, 1988; Maijala *et al.*, 1995), *Schizophyllum commune* (Haltrich *et al.*, 1993), *P. chrysosporium* (Bonnarme *et al.*, 1993; Lestan *et al.*, 1994) y *T. trogii* (Levin & Forchiassin, 1998).

La biomasa máxima alcanzada fue de alrededor de 4.92 gL⁻¹ al día 30 de cultivo. No se observó la fase de autólisis debido a que el cultivo fue cosechado antes de que ésta comenzara.

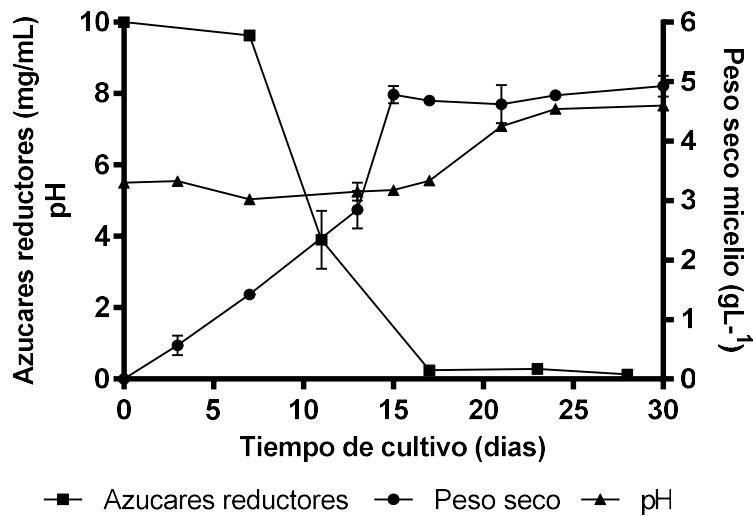


Fig. 24: Cinética de crecimiento de *T. versicolor* BAFC 4272 en medio líquido GA en condiciones de cultivo estáticas.

4.2.2. Producción de enzimas involucradas en la conversión de materiales lignocelulósicos y en la degradación del almidón por *T. versicolor* BAFC 4272

Para estudiar la cinética de crecimiento y producción de las distintas enzimas se empleó el medio sintético líquido GA en el que se utilizó asparagina (4 gL^{-1}) como fuente de nitrógeno y reemplazó la glucosa (10 gL^{-1}) como fuente de carbono, alternativamente por almidón (para amilasa), pectina de manzana (para polimetilgalacturonasa), celulosa cristalina (para endoglucanasa) y xilano de avena (para endoxilanasas). La **Fig. 25** muestra las actividades enzimáticas registradas en medio líquido GA en condiciones estáticas de crecimiento, la variación del pH a lo largo del tiempo de cultivo y la curva de peso seco del micelio.

En los cultivos con celulosa cristalina como única fuente de carbono la actividad endoglucanasa resultó extremadamente baja. Esta actividad fue registrada a partir del día 5 de cultivo alcanzando un máximo de $0.73 \text{ UE mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$ alrededor del día 20 y manteniendo esta actividad hasta el día de la cosecha. Un resultado similar se observó en *Fomes sclerodermeus* (también creciendo en medio líquido con celulosa cristalina) donde el pico de actividad endoglucanasa que alcanzó los $0.44 \text{ UE mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$ se registró repentinamente al día 10 de crecimiento y se mantuvo en los mismos niveles hasta el día 35 cuando fue cosechado (Papinutti, 2003). Sin embargo, en cultivos de *Volvariella volvacea* creciendo en medio líquido con celulosa cristalina la actividad endoglucanasa se detectó antes del cuarto día de cultivo alcanzando su máxima actividad al día 6 (Cai *et al.*, 1999).

El pH en el medio de cultivo se mantuvo casi constante (entre pH 5.5-6) a lo largo de todo el experimento.

No se determinó el crecimiento del hongo en el medio con celulosa cristalina ya que no es posible evaluarlo midiendo peso seco dada la naturaleza insoluble del sustrato utilizado. No fue posible entonces relacionar la cinética de crecimiento fúngico con la de producción de endoglucanasa. Ensayos futuros evaluando el contenido de quitina para cuantificar el crecimiento fúngico en

este medio, permitirán profundizar estudios relacionados con la producción de enzimas celulolíticas.

T. versicolor BAFC 4272 creciendo en el medio de cultivo con xilano alcanzó una biomasa de 0.525 gL^{-1} , al día 10 de cultivo, que se mantuvo más o menos constante hasta el día de la cosecha, sugiriendo que el hongo se encontraba entonces en su fase de crecimiento estacionaria. El pH se mantuvo constante a lo largo del tiempo.

Está demostrado que la xilobiosa y el xilano son inductores específicos de xilanasas (Hrmova *et al.*, 1986; Coughlan & Hazlewood, 1993), por ello se utilizó xilano para valorar la actividad endoxilanasas. La actividad endoxilanasas en *T. versicolor* BAFC 4272 se registró tempranamente y al cabo de 6 días de cultivo alcanzó su pico máximo ($0.021 \text{ UE mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), luego esta actividad disminuyó aproximadamente un 20 % y se mantuvo constante hasta el día de la cosecha. Estos resultados coinciden con los hallados por Shah & Madamwar (2005) en *Aspergillus foetidus* MTCC 4898, en este caso la producción de xilanasas comenzó el segundo día de cultivo alcanzando un pico máximo de actividad ($0.023 \text{ UE mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) al cuarto día y luego decayó. En cultivos con *Aspergillus awamorii* utilizando un sustrato a base de orujo de uvas la actividad xilanasas se detectó a partir del primer día de cultivo alcanzando los máximos niveles entre los días 1-2 y decayendo rápidamente luego del tercer día, coincidiendo con el agotamiento de los azúcares reductores presentes en el medio (Botella *et al.*, 2007). En el trabajo de Royer & Nakas (1989) se detectó actividad xilanasas en cultivos de *Trichoderma longibrachiatum* antes de las 24 h de crecimiento. Esta disminución de la actividad luego de su máximo podría deberse a una represión catabólica por el sustrato (Kadowaki *et al.*, 1997; Archana & Satyanarayana, 1997; Kermnický & Biely, 1998). El fenómeno observado del incremento repentino y el subsecuente descenso de actividad a lo largo del tiempo de cultivo ha sido reportado en *Aspergillus sydowii* MG-49 (Ghosh *et al.*, 1993) y en *Streptomyces* sp. CH-M-035 (Flores *et al.*, 1996). Sin embargo, otros autores afirman que la actividad xilanasas usualmente se expresa al final de la fase exponencial de crecimiento (Kulkarni *et al.*, 1999), En el trabajo de Levin & Forchiassin (1998) en *T. trogii* la actividad endoxilanasas fue baja durante los primeros días de cultivo y sus máximos

valores fueron registrados entre los días 13 y 15, un poco antes del pico de máxima biomasa, luego la actividad disminuyó abruptamente.

Está comprobado que la actividad xilanasa suele estar ligada a la actividad celulasa, algunos hongos filamentosos producen mayores niveles de xilanasa al ser cultivados con pulpa de madera en lugar de xilano puro (Royer & Nakas, 1989; Saddler *et al.*, 1985) y la producción de celulasas en *T. reesei* QM9414 disminuye al ser retirado el xilano de la pulpa de la madera (Hrmova *et al.*, 1986). Otros autores comprobaron que algunas mutaciones que afectan a la actividad celulasa a menudo también afectan a la actividad xilanasa (Nevalainen & Palva, 1978; Montenecourt *et al.*, 1981). Estos resultados son esperables dado que la hemicelulosa y la celulosa están íntimamente ligadas en la biomasa vegetal. En los resultados obtenidos con *T. versicolor* BAFC 4272 podríamos ver una relación entre la actividad celulasa y la actividad xilanasa teniendo en cuenta que ambas comienzan a ser registradas entre el quinto y sexto día de cultivo, aunque, como se mencionó anteriormente, no se encuentran valores significativos de actividad xilanasa durante los 25 días de cultivo registrados. Contrariamente a los resultados hallados, *T. longibrachiatum* produce altos niveles de xilanasas y relativamente bajos niveles de celulasas cuando es cultivado en sustratos lignocelulósicos (Royer & Nakas, 1989; 1990). En estos trabajos no sólo se muestra que la actividad xilanasa alcanza niveles mas altos, sino que además comienza a expresarse antes que la actividad celulasa.

La actividad polimetilgalacturonasa, en los cultivos con pectina de manzana como única fuente de carbono, fue registrada, al igual que la actividad xilanasa, desde el primer día de cultivo, lo que sugiere que se trataría de enzimas constitutivas y la presencia del sustrato en el medio aumentaría su producción. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Ramos *et al.* (2010), en cuyo trabajo se midieron actividades pectinolíticas en distintas cepas de *Collectotrichum truncatum*, y en todas ellas la actividad se registró desde el primer día de cultivo. Según Blais *et al.* (1992) las pectinasas constitutivas son producidas en bajas cantidades por el hongo y su síntesis se incrementa luego de una inducción con el sustrato específico. La pectina no puede ingresar a las células del hongo, pero sí los productos de bajo peso molecular derivados de

su hidrólisis, como por ejemplo, el ácido galacturónico, éste entraría a la célula y actuaría como inductor (Cooper, 1983). Los máximos valores de actividad polimetilgalacturonasa ($0.109 \text{ UE mL}^{-1}\text{min}^{-1}$) se observaron entre los días 7 y 13 de cultivo, y resultaron comparables a los obtenidos con *C. truncatum* creciendo en medio líquido adicionado con pectina (Ramos *et al.*, 2010). Este pico de actividad coincidió temporalmente con el pico de máxima biomasa alcanzada (0.482 gL^{-1}) al día 7 de cultivo. Según Ramos *et al.* (2010) los picos de actividad polimetilgalacturonasa y poligalacturonasa preceden al día de máximo crecimiento, el cuál es registrado entre el día 10 y 15 de cultivo, mientras que la actividad pectin liasa suele registrarse al mismo tiempo o después. Esto también fue observado por Martins *et al.* (2002), con *T. aurantiacus*, el pico de actividad polimetilgalacturonasa se observó entre los días 2 y 4 de cultivo en todos los medios que ensayaron, mientras que el pico de actividad pectin liasa ocurrió entre los días 8 y 10 de cultivo. Estos autores sugieren una inducción secuencial de estas enzimas, lo cual ya había sido reportado previamente (Leone *et al.*, 1987; Acuña-Argüelles *et al.*, 1995; Fonseca & Said, 1995; Hugouveix-Cotte-Pattal *et al.*, 1996).

En trabajos realizados con *Colletotrichum lindemuthianum* (Wijesundera *et al.*, 1984) y *Rhizoctonia solanii* (Lisker *et al.*, 1975) también se observó el pico de actividad polimetilgalacturonasa previo al pico de actividad pectin liasa, e incluso en otros hongos (*Fusarium oxysporum* f. sp *melonis* y *Botrytis cinerea*) se reportó el pico de actividad polimetilgalacturonasa durante la fase de crecimiento mientras que la máxima actividad pectin liasa fue registrada en la fase de autólisis (Martínez *et al.*, 1988; Martínez *et al.*, 1991). La inducción secuencial de estas enzimas puede ser explicada en base al rol que juegan en la invasión de tejidos vegetales por organismos, las polimetilgalacturonas están implicadas principalmente en la invasión inicial del tejido vegetal mientras que las pectin liasas lo están en la fase posterior de necrosis (Herbert *et al.*, 2004).

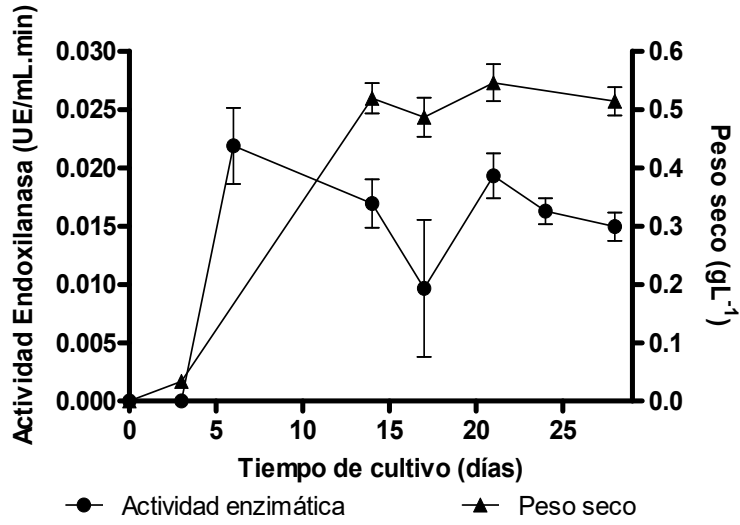
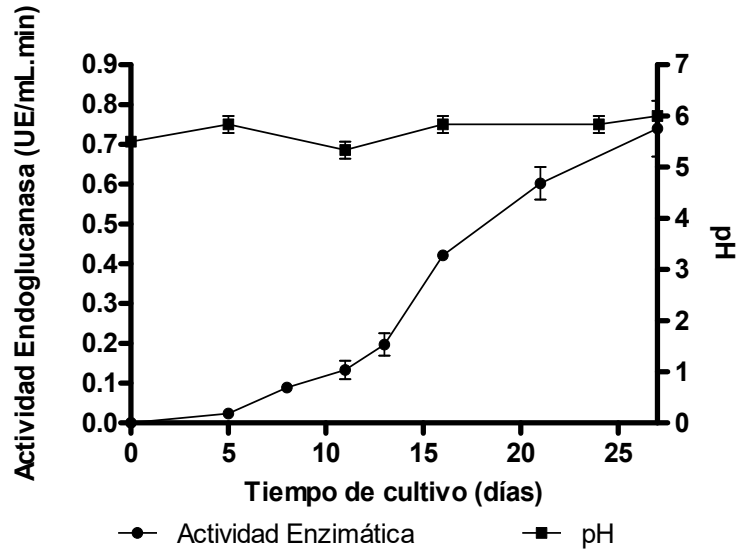
En estos cultivos la biomasa de *T. versicolor* BAFC 4272 se mantuvo más o menos constante a partir del día 11 y la actividad polimetilgalacturonasa disminuyó lentamente.

El pH en el medio se mantuvo entre pH 5.5 y pH 6.5 durante todo el tiempo de cultivo.

En los cultivos con almidón soluble como fuente de carbono la actividad amilasa se detectó a partir del día 8 de crecimiento, alcanzando un máximo al día 13 ($0.092 \text{ UE mL}^{-1}\text{min}^{-1}$).

Observando la curva de peso seco se puede ver que durante la primera semana de cultivo el hongo se encontraba en su fase lag. A partir del día 8 su biomasa comenzó a aumentar, pero alrededor del día 12 de cultivo este crecimiento se detuvo, quedando en una fase estacionaria en coincidencia con el aumento en la actividad amilasa.

El pH se mantuvo con muy pocas variaciones a lo largo de tiempo de cultivo, oscilando entre 5 y 6.



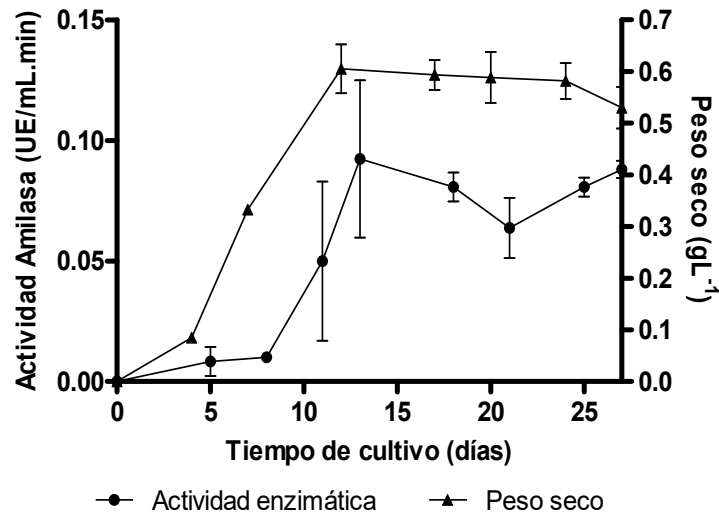
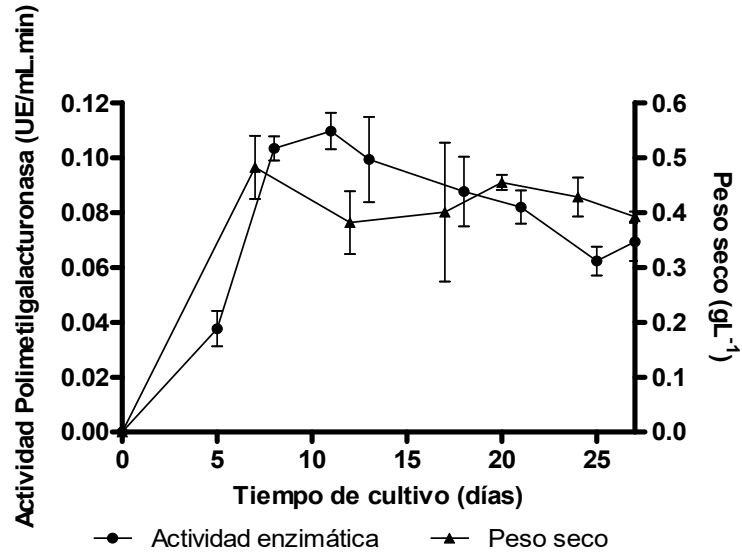


Figura 25: Curvas de peso seco y actividades enzimáticas endoglucanasa, endoxilanasas, amilasa y polimetilgalacturonasa de *T. versicolor* BAFC 4272 creciendo en medio líquido GA modificado con distintas fuentes de carbono, en condiciones estáticas. No se presentan datos de peso seco en los cultivos con celulosa cristalina (curva de actividad endoglucanasa) debido a que no corresponde estimar su crecimiento con el método utilizado. Dado que el comportamiento de las curvas de pH resultó muy similar en todos los cultivos sólo se muestra en el primer gráfico (endoglucanasas).

4.2.3. Actividades ligninolíticas lacasa y MnP

Con respecto a las enzimas ligninolíticas, la única actividad registrada en las condiciones de cultivo ensayadas fue la actividad lacasa, la cual comenzó alrededor del día 11 de cultivo, cuando los niveles de azúcares disponibles en el medio se encontraban por debajo del 0.2% (**Fig. 26**). Esta actividad aumentó durante la fase de crecimiento secundario y llegó a un máximo de 0.221 UE mL⁻¹ al día 30 de cultivo, el día de cosecha. Debido a esto, no podemos descartar que de haberse continuado con el período de cultivo pudieran registrarse títulos mayores de actividad lacasa bajo estas condiciones. Este resultado es esperable, ya que la producción de enzimas ligninolíticas ocurre en la fase secundaria de crecimiento como respuesta a la falta de nutrientes del medio (Boominathan & Reddy, 1992), y coincide con lo verificado previamente en *P. chrysosporium* y otros Basidiomycota causantes de pudrición blanca estudiados (Kelley & Reddy, 1986; de Jong *et al.*, 1994; Peláez *et al.*, 1995). Ocasionalmente la producción de lacasa por hongos de pudrición blanca se detectó también durante el metabolismo primario, aunque se incrementa su producción durante la fase de metabolismo secundario (Buswell *et al.*, 1995; Eggert *et al.*, 1996b; Levin *et al.*, 2002).

No se detectó actividad MnP durante el período evaluado, probablemente debido a que las condiciones de cultivo ensayadas no son las adecuadas para su producción. Tampoco se registró actividad LiP. Sin embargo, está comprobado que *T. versicolor* es capaz de producir diferentes enzimas modificadoras de lignina y que cada una de ellas contribuye de manera diferente a su degradación. Entre estas enzimas se encuentran MnPs, LiPs, lacasas y oxidasas generadoras de peróxido (Hatakka, 1994). Por otro lado, peroxidasas decolorantes de tintes (Dye decolorizing peroxidases, DyPs) -un grupo recientemente descubierto de hemoperoxidasas- y versátil peroxidasa también son secretadas por *T. versicolor* (Carabajal *et al.*, 2013).

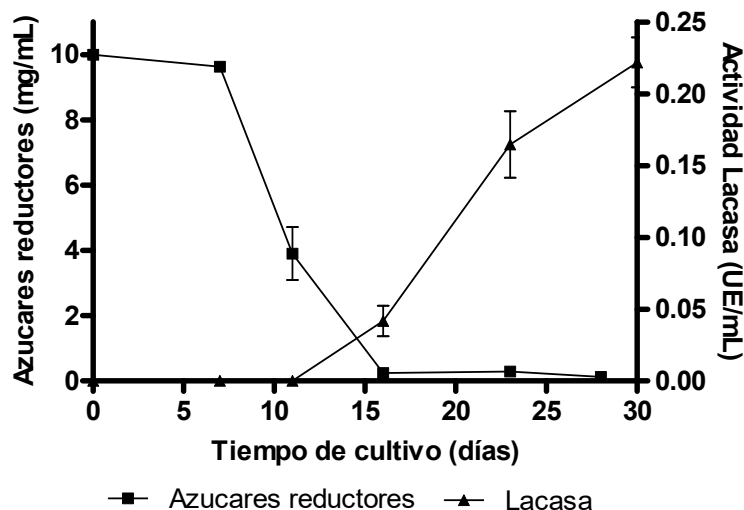


Figura 26: Curvas de azúcares reductores y actividad lacasa de *T. versicolor* BAFC 4272 creciendo en medio líquido GA en condiciones estáticas de crecimiento.

4.2.4. Efecto de distintas fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento y las actividades ligninolíticas

En la **Fig. 27** se muestran las curvas de consumo de azúcares reductores obtenidas en cultivos de *T. versicolor* BAFC 4272 creciendo con diferentes fuentes de nitrógeno. Estas curvas permiten inferir la velocidad de crecimiento del hongo en presencia de distintas fuentes nitrogenadas. La peptona de carne resulta ser la fuente de nitrógeno más fácilmente asimilable por el hongo y por ello su crecimiento es rápido, no parece registrarse una fase lag de adecuación al medio, y los azúcares comienzan a consumirse inmediatamente, agotándose al día 11 de cultivo y alcanzado al final del ensayo una biomasa de 4.77 gL^{-1} (peso seco), resultando la mayor obtenida entre los tratamientos (**Fig. 28**).

En todos los cultivos adicionados con las fuentes de nitrógeno restantes se registró una fase de adecuación al medio, más corta para el caso de la asparagina, el glutámico y el sulfato de amonio (7 días) y de más larga duración en el caso de la glicina. La asparagina y el ácido glutámico también parecen ser buenas fuentes de nitrógeno para este hongo ya que los azúcares

reductores son consumidos en un lapso de 15-17 días, aunque la biomasa final alcanzada con estas fuentes de nitrógeno (3.92 y 3.08 gL⁻¹ de peso seco respectivamente) no supera la lograda utilizando glicina (4.48 gL⁻¹) como fuente nitrogenada. Resultados similares fueron obtenidos con otras especies de *Trametes* en el trabajo de Levin *et al.* (2010), en donde se ensayaron distintas fuentes de nitrógeno para estudiar su efecto sobre el crecimiento y la producción enzimática de tres hongos, entre ellos *T. trogii* y *T. villosa*. Para ambas especies, las fuentes nitrogenadas que les permitieron alcanzar mayor crecimiento fueron el ácido glutámico, la asparagina y la peptona.

Los cultivos con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno crecieron muy poco, sólo 1.12 gL⁻¹ de peso seco final, y esto se ve reflejado en la curva de consumo de azúcares reductores, donde se observa que los azúcares se consumen muy lentamente y al cabo de 21 días aún queda alrededor del 50% disponible.

Teniendo en cuenta las curvas de consumo de azúcares reductores y con el objetivo de evitar que los cultivos entren en la fase de autólisis, se decidió cosecharlos a los 21 días de crecimiento, ya que en ese momento está a punto de agotarse el azúcar disponible en la mayoría de los tratamientos (excepto en el medio con sulfato de amonio). La **Fig. 28** muestra los valores de peso seco obtenidos al cabo de 21 días de cultivo utilizando como base un medio GA en el que la fuente de nitrógeno (asparagina) fue reemplazada por fuentes alternativas.

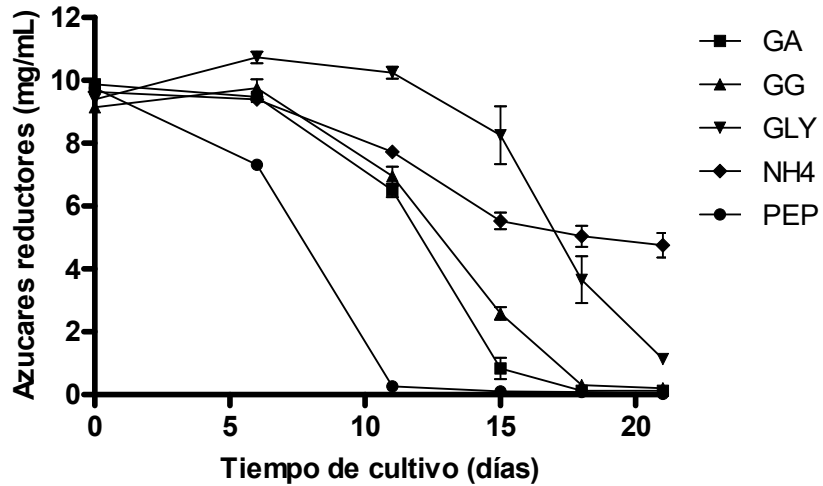


Figura 27: Curvas de consumo de azúcares reductores obtenidas en medio GA en el que la asparagina fue reemplazada por distintas fuentes de nitrógeno en cultivos de *T. versicolor* BAFC 4272, creciendo en condiciones estáticas.

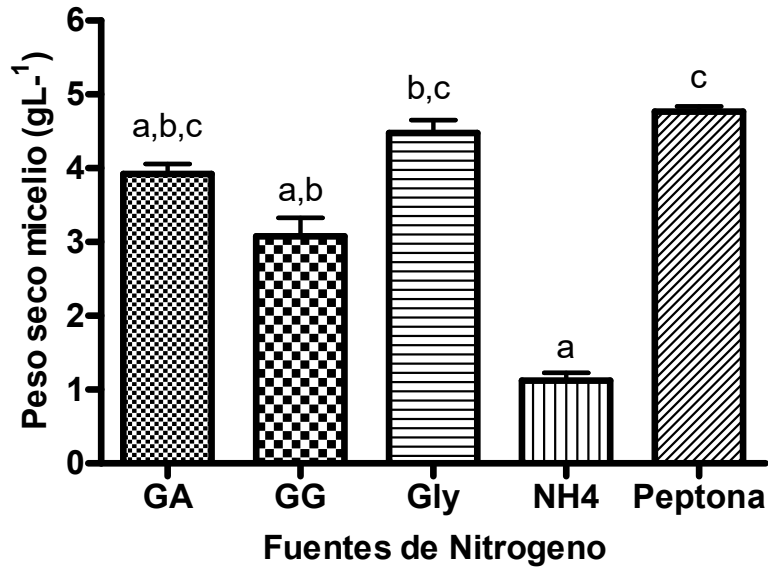


Figura 28: Efecto de distintas fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento de *T. versicolor* BAFC 4272 en medio líquido GA en el que la asparagina fue reemplazada por distintas fuentes de nitrógeno. El cultivo se realizó en condiciones estáticas de crecimiento. Las medias que comparten una letra en común no son significativamente diferentes.

Está comprobado que tanto la cantidad como la naturaleza de la fuente nitrogenada ejercen una gran influencia en la producción de enzimas ligninolíticas (Hatvani & Mecs, 2002). El efecto de la fuente de nitrógeno utilizada sobre la producción de enzima lacasa ha sido estudiada en muchos hongos causantes de pudrición blanca (Dong *et al.*, 2005; Mikiashvili *et al.*, 2006). En *T. versicolor* este factor no sólo afecta la cantidad de enzima producida sino también la proporción de isoenzimas secretadas (Moldes *et al.*, 2004). El efecto del nitrógeno es muy variable dependiendo de la especie fúngica: medios de cultivo con altas cantidades de nitrógeno aumentan considerablemente la producción de enzimas ligninolíticas en *L. edodes*, *R. lignonus*, *T. pubescens*, *T. trogii*, y *T. versicolor*, mientras que condiciones de nitrógeno limitantes favorecen la producción de estas enzimas en *P. chrysosporium*, *P. cinnabarinus*, *P. sanguineus* y *P. radiata* (Leatham & Kirk, 1983; Mester & Field, 1997; Galhaup *et al.*, 2002a; Levin *et al.*, 2002). Tekere *et al.* (2001a) demostraron que algunas especies de *Trametes* como *Trametes cingulata*, *Trametes elegans* y *Trametes pocas* producen importantes actividades de MnP en medios que contienen altos niveles de carbono y bajos de nitrógeno. *T. versicolor* produce mayor cantidad de MnP en medios con alto contenido tanto de nitrógeno como de carbono. Condiciones de cultivo estáticas y bajas concentraciones de nitrógeno favorecen la producción de enzimas ligninolíticas en *T. gallica* (Sun *et al.*, 2004).

En los tratamientos con ácido glutámico y sulfato de amonio se registraron los máximos valores tanto de actividad lacasa (0.58 y 0.943 UE mL⁻¹ respectivamente), como de actividad MnP (0.025 y 0.069 UE mL⁻¹ respectivamente) (**Fig. 29**). El ácido glutámico también resultó ser la fuente de nitrógeno óptima para la producción de lacasa y MnP por *T. trogii* y *T. villosa* (Levin *et al.*, 2010). En cultivos de *T. versicolor* creciendo en SSF con cáscara de mandarina, el (NH₄)₂SO₄ y la peptona resultaron ser las mejores fuentes nitrogenadas para aumentar la actividad lacasa (hasta cuatro veces más que el control) (Elisashvili *et al.*, 2008). En los tratamientos con asparagina, glicina y peptona la actividad lacasa no superó las 0.1 UE mL⁻¹ (0.0829, 0.0358 y 0.0902 UE mL⁻¹, respectivamente), mientras que la actividad MnP alcanzó valores de 0.063, 0.093 y 0.007 UE mL⁻¹ respectivamente para los tratamientos antes

mencionados. Estudios previos indican que las fuentes de nitrógeno orgánico como la peptona generalmente aumentan no sólo la producción de lacasa en *T. gallica* (Dong *et al.*, 2005), *T. pubescens* (Galhaup *et al.*, 2002a) y *P. ostreatus* (Mikiashvili *et al.*, 2006), sino también la producción de MnP por *B. adusta*, *Bjerkandera* sp. BOS55, *L. edodes*, *P. ostreatus*, *P. chrysosporium* (Kaal *et al.*, 1995) y *C. versicolor* var. *antarcticus* (Levin *et al.*, 2010). Llamativamente, la peptona no resultó ser una fuente de nitrógeno adecuada para la producción de enzimas ligninolíticas por *T. versicolor* BAFC 4272 (Fig. 6), en cambio, si lo fue el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Estos resultados coinciden con los de Elisashvili *et al.* (2008), según los cuales el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ es una de las mejores fuentes de nitrógeno para la producción de lacasa en cultivos en fermentación en estado sólido de *P. ostreatus* 2191, *Coriolopsis polyzona* 38443 y *T. versicolor* IBB 897.

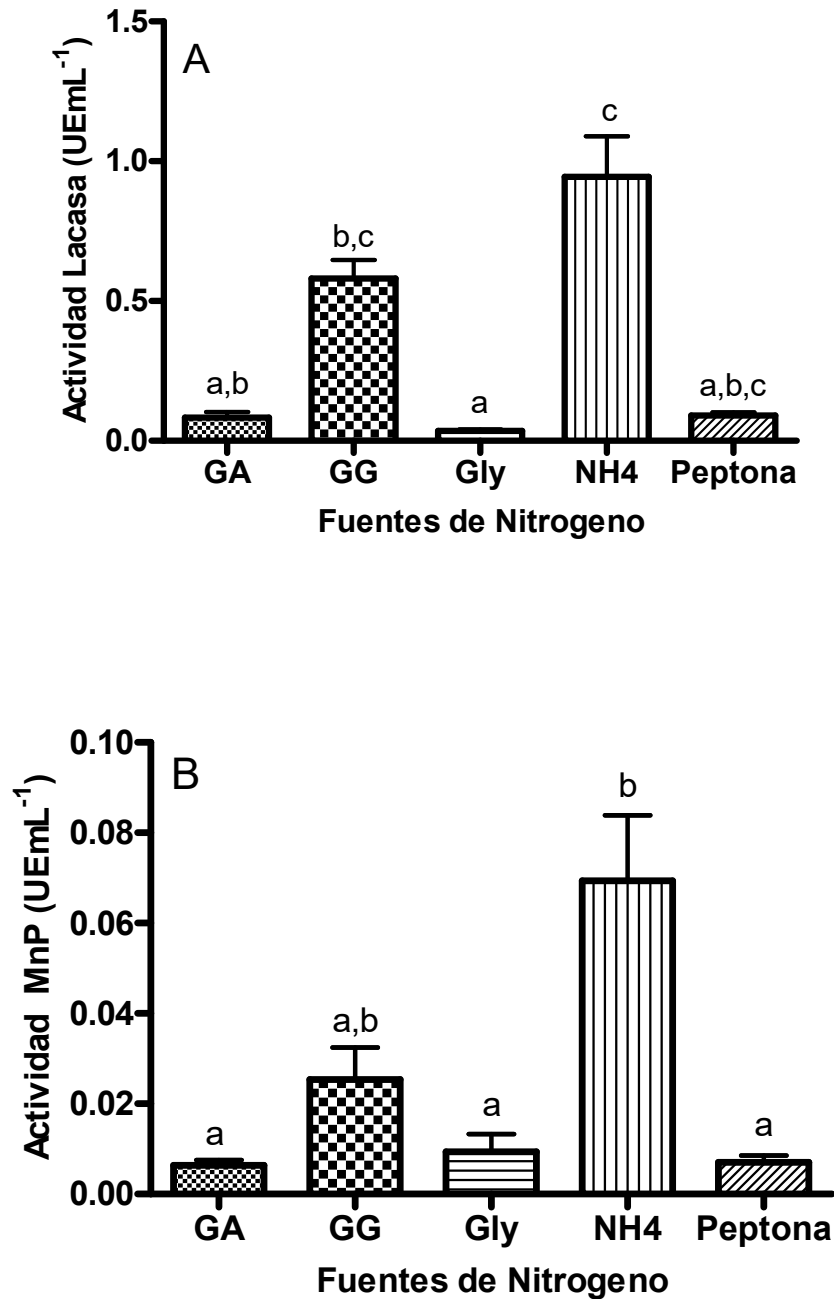


Figura 29: Efecto de distintas fuentes nitrogenadas sobre las actividades lacasa (A) y MnP (B) de *T. versicolor* BAFC 4272 creciendo en medio líquido GA en el que la asparagina fue reemplazada por distintas fuentes de nitrógeno en condiciones estáticas. Las medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

4.2.5. Efecto de inductores aromáticos sobre el crecimiento y las actividades ligninolíticas

Los cultivos en medio líquido GA sin la adición de compuestos aromáticos (control) y los adicionados con xilidina, mostraron mayor tasa de consumo de azúcares reductores, agotándolos completamente al día 16 de crecimiento (**Fig. 30**). Sin embargo, los pesos secos en estos cultivos al cabo de 24 días de crecimiento resultaron ser los menores registrados (**Fig. 31**). Esto puede deberse a que, al haber consumido rápidamente la fuente de carbono disponible, estos cultivos entraron en su fase de autólisis antes que el resto.

Los mayores crecimientos se alcanzaron en los cultivos adicionados con ácido vainílico, ácido ferúlico y vainillina (6.03, 5.55 y 5.54 gL⁻¹ respectivamente) y sus tasas de consumo de azúcares se ubicaron en valores intermedios con respecto al resto de los tratamientos.

Los cultivos adicionados con cumarina mostraron la menor tasa de consumo de azúcares, aunque lograron una biomasa comparable a la del resto de los cultivos (4.82 gL⁻¹).

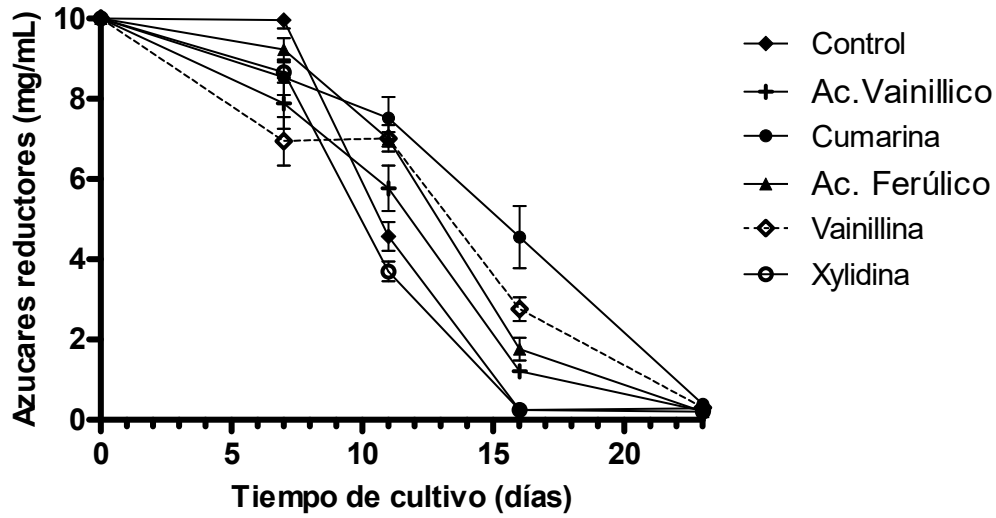


Figura 30: Curvas de consumo de glucosa en cultivos de *T. versicolor* BAFC 4272 creciendo en medio líquido GA adicionado con diferentes inductores de actividad ligninolítica.

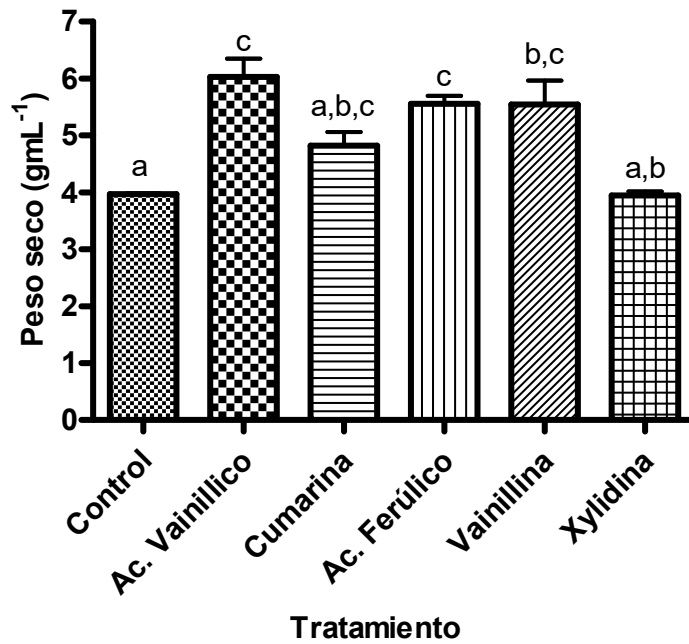


Figura 31: Peso seco alcanzado por *T. versicolor* BAFC 4272 al cabo de 23 días de cultivo en medio líquido GA adicionado con diferentes inductores de actividad ligninolítica. Las medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

Compuestos fenólicos y aromáticos relacionados estructuralmente con la lignina se adicionan rutinariamente a medios de cultivo de hongos con el fin de incrementar la producción de enzimas ligninolíticas (Piscitelli *et al.*, 2011). Al parecer el consecuente aumento en la actividad lacasa se debe a una respuesta defensiva del hongo, ya que al degradar la lignina se producen compuestos potencialmente tóxicos. Estas enzimas son capaces de catalizar la polimerización de estos compuestos reduciendo así el estrés oxidativo causado por los radicales libres originados a partir de la reacción de estas moléculas (Thurston, 1994; de Souza *et al.*, 2004; Hou *et al.*, 2004). Compuestos fenólicos como el ácido ferúlico, ácido gálico, ácido caféico y ácido siríngico han demostrado ser potenciales inductores de la producción de lacasa en *T. versicolor* (Lee *et al.*, 1999; Unal & Pazarlioglu, 2011).

Además de la estructura molecular y la concentración (Xiao *et al.*, 2004), el efecto de estos compuestos inductores depende del momento en que son agregados al cultivo (Shuttleworth *et al.*, 1986). Por ejemplo, en cultivos de *Pleurotus pulmonarius* y *Botryosphaeria rhodina* la inducción es mas eficiente cuando el compuesto es agregado junto con el inóculo (de Souza *et al.*, 2004; Dekker *et al.*, 2007), mientras que en cultivos de *P. ostreatus*, *R. lignosus* y *Trametes modesta* el compuesto es mas efectivo si se adiciona luego de 2-5 días para evitar la inhibición del crecimiento del hongo (Nyanhongo *et al.*, 2002; Vanhulle *et al.*, 2007).

En la **Fig. 32** se pueden ver las curvas de actividad lacasa obtenidas por la adición de diferentes compuestos aromáticos al medio de cultivo. Estos fueron agregados al momento de confeccionar los medios. Con ninguno de los compuestos ensayados se alcanzó un alto valor de actividad, el máximo obtenido fue de 0.419 UE mL⁻¹ en los cultivos con ácido ferúlico y el mínimo fue de 0.054 UE mL⁻¹ para los que contenían cumarina. En este último caso la actividad se comenzó a registrar recién a partir de los 15 días de crecimiento. Para el resto de los cultivos los títulos de lacasa en orden decreciente resultaron ser de 0.401, 0.314, 0.164 y 0.155 UE mL⁻¹, para vainillina, ácido vainílico, control (medio GA sin la adición de aromáticos) y xilidina, respectivamente. Es decir, que el ácido ferúlico, la vainillina y el ácido vainílico incrementaron la actividad lacasa entre 2-3 veces con respecto al control. Esta

actividad fue detectada a partir del quinto día de cultivo, con la excepción del control y de los cultivos con xilidina, cuyas actividades comenzaron a registrarse a partir del día 11. Estos resultados coinciden con los hallados por de Sousa *et al.* (2004) en cuyo trabajo ensayaron 15 compuestos fenólicos diferentes en *P. pulmonarius*, de los cuales el ácido ferúlico y la vainillina produjeron los mayores títulos de lacasa, mientras que la xilidina no produjo ningún efecto significativo. El ácido ferúlico también aumentó la actividad lacasa entre 2-3 veces en *P. ostreatus* (Hou *et al.*, 2004) e incluso la presencia de este ácido en cultivos de *P. ostreatus* ATCC MYA-2306 se ha demostrado que altera el patrón de producción isoenzimático (Palmieri *et al.*, 2000). La producción de numerosas isoformas de lacasa por un mismo hongo debido a la adición de diferentes inductores ha sido demostrada (Castanera *et al.*, 2012). Estos inductores afectan la expresión de los genes de lacasa a nivel transcripcional (Piscitelli *et al.*, 2011). En otro trabajo con *V. volvacea* se descubrió que la cantidad de transcritos de *lcc1* era regulada diferencialmente por varios compuestos aromáticos, mientras que los transcritos de *lcc4* no resultaban afectados por estas mismas moléculas (Chen *et al.*, 2004). En *Trametes* sp. 162 nueve compuestos aromáticos estructuralmente relacionados parecen ejercer distintos efectos sobre la expresión de genes de lacasa. Estos genes se expresaron diferencialmente en respuesta a estos compuestos, con diferentes patrones, específicos para cada molécula (Terrón *et al.*, 2004). Sin embargo, la actividad lacasa en el cultivo fúngico no necesariamente se correspondió con su nivel de expresión génica (Terrón *et al.*, 2004).

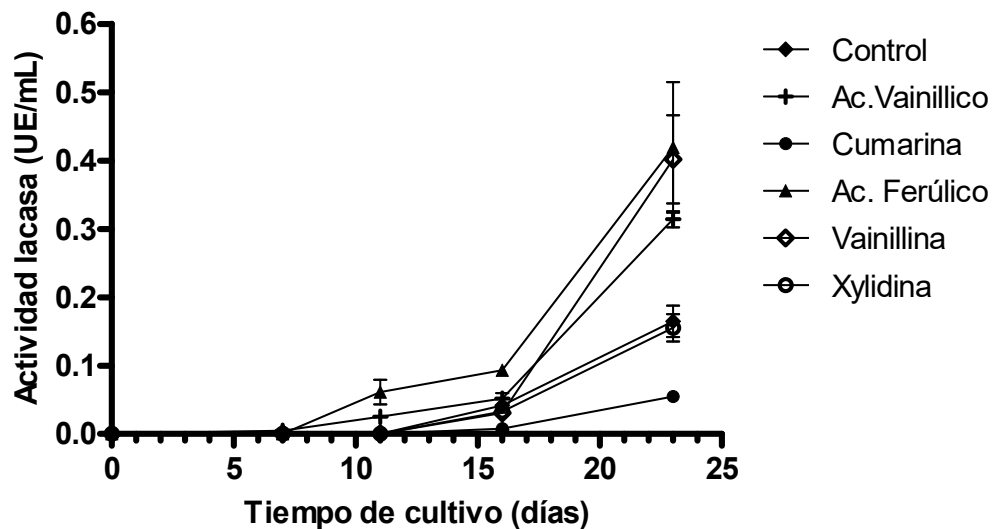


Figura 32: Efecto de distintos compuestos aromáticos sobre la actividad lacasa de *T. versicolor* BAFC 4272 creciendo en medio GA en condiciones estáticas.

A partir de los sobrenadantes obtenidos de cultivos adicionados con distintos compuestos aromáticos se separaron electroforéticamente las isoenzimas de lacasa, utilizando un gel de poliacrilamida con SDS. Los geles fueron revelados con 2,6-dimetoxifenol para evidenciar la actividad lacasa (Arana-Cuenca *et al.*, 2004). Como se observa en la **Fig. 33** el patrón isoenzimático varió dependiendo de la sustancia con la que se adicionó el medio de cultivo. Diferentes inductores aromáticos con distintos grupos sustituyentes pueden estimular la síntesis de distintas isoenzimas lacasa (Xiao *et al.*, 2006) Con ácido vainillico, ácido ferúlico y vainillina se obtuvieron patrones idénticos, con cuatro bandas correspondientes a cuatro isoenzimas lacasa de aproximadamente 116, 87, 72 y 35 kDa. Como se mencionó anteriormente, estos tres compuestos tienen estructuras químicas muy similares y con ellos también se obtuvieron las mayores actividades lacasa. En los tratamientos con cumarina sólo se observó la banda de 35 kDa, y en los tratamientos con xilidina y licor negro se observaron las dos bandas de 116 y 35 kDa. Existen registros de isoformas de lacasa de *Trametes* sp. que desaparecen ante la presencia de compuestos aromáticos (Xiao *et al.*, 2006). En el control (sin aromáticos) se observaron las bandas de 116, 72 y 35 kDa.

La banda de menor peso molecular aparece en todos los tratamientos, concordando con los resultados obtenidos por Malignani (2007) con *C. versicolor* var. *antarticus*. Los pesos moleculares de las isoenzimas reveladas se encuentran dentro del rango esperado. Electroforesis de filtrados de *T. trogii* creciendo en el mismo medio utilizado para *T. versicolor* BAFC 4272 pero suplementado con cobre, revelaron dos bandas de 38 y 60 kDa (Levin *et al.*, 2002). En el trabajo de Martínez-Morales *et al.* (2015) se detectaron dos isoformas de lacasa en *T. versicolor* con pesos moleculares aparentes de 60 y 100 kDa. Actualmente se sabe que muchas de estas proteínas son homodiméricas o oligoméricas (Martínez-Morales *et al.*, 2015). Por ejemplo, el hongo causante de pudrición blanca *Phellinus ribis* produce una lacasa dimérica, formada por dos subunidades de 76 kDa (Min *et al.*, 2001). En el caso de *F. sclerodermeus*, se encontraron dos isoenzimas lacasa de aproximadamente 67 kDa (Papinutti, 2003). La capacidad de un compuesto aromático para inducir la producción de enzima lacasa está relacionada con la cantidad, ubicación u orientación de secuencias de XREs (Xenobiotic Response Elements) halladas en la región regulatoria del correspondiente gen. En el trabajo de Xiao *et al.* (2004) la isoenzima LacA de *Trametes* sp. AH28-2 es inducida por todos los compuestos aromáticos ensayados mientras que LacB es inducida por guayacol y 3,5-dihidroxitolueno, y esto responde a que existen siete secuencias consenso de XREs en el promotor de LacA y sólo dos en el promotor de LacB. Es más, LacC es prácticamente indetectable en presencia de compuestos aromáticos, lo cual puede atribuirse a que la secuencia XREs está solapada con la TATA box en el promotor. En *T. pubescens* no se encontraron XREs en la región promotora del gen de lacasa, concordando con la ausencia de inducción transcripcional de esta enzima ante la presencia de sustancias aromáticas (Galhaup *et al.*, 2002b).

Revankar & Lele, 2006; Meza *et al.*, 2007; Xavier *et al.*, 2007; Xin & Geng, 2010), sin embargo, no se observaron diferencias en la actividad lacasa entre este tratamiento (0.155 UE mL⁻¹) y el control (0.164 UE mL⁻¹). Existen reportes previos en donde la adición de xilidina al medio de cultivo no indujo actividad lacasa en *Cerrena unicolor* y *G. lucidum* (Elisashvili *et al.*, 2010), ni en *P. pulmonaris* (de Souza *et al.*, 2004). En el trabajo de Collins & Dobson (1997) se reporta una cepa de *T. versicolor* cuya actividad lacasa es inducida a nivel transcripcional por xilidina, mientras que no se registra inducción por ácido ferúlico.

No se detectaron niveles apreciables de actividad MnP ni LiP en ninguno de los tratamientos ensayados. Esto concuerda con lo reportado en el trabajo de Elisashvili *et al.* (2010), en el cuál algunos compuestos aromáticos comúnmente utilizados para incrementar la producción de lacasa en *T. versicolor* y *G. lucidum* no ejercieron ningún efecto sobre la síntesis de MnP.

En base a lo expuesto, se puede afirmar que existe una gran diversidad de respuestas hacia estos inductores enzimáticos, dependiendo de la fisiología fúngica, la genética e incluso las características ecológicas (Myasoedova *et al.*, 2008). Y, considerando que un mismo compuesto puede actuar como inductor o represor dependiendo de la especie y la enzima testada, no es posible establecer un compuesto fenólico/aromático que pueda ser utilizado universalmente como inductor enzimático.

4.2.6. Efecto del cobre y el manganeso sobre el crecimiento y las actividades ligninolíticas

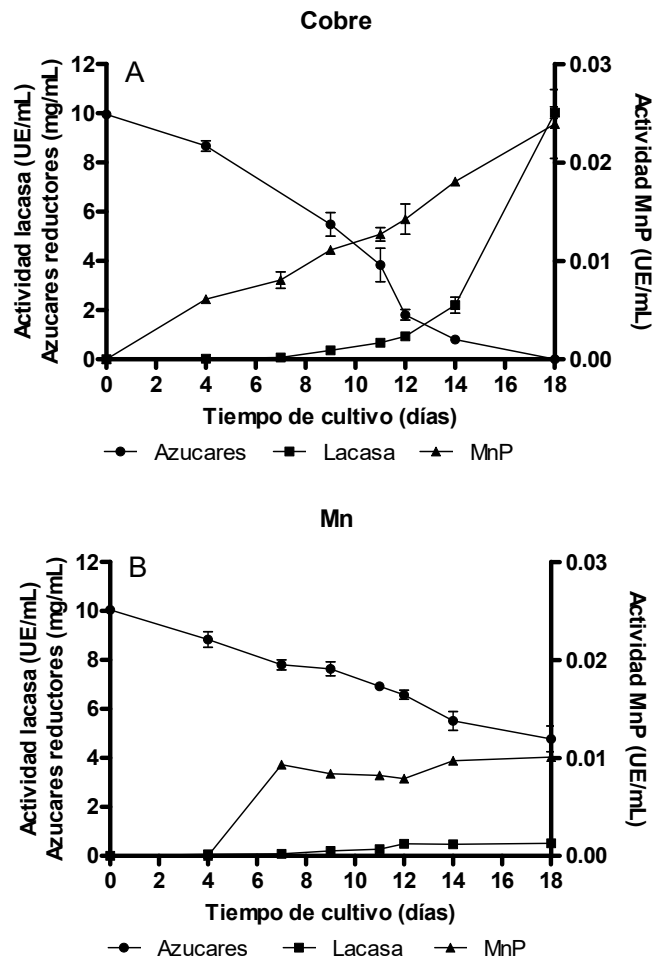
La regulación de la expresión de lacasa por metales ha sido muy estudiada en hongos (Giardina *et al.*, 1999; Galhaup *et al.*, 2002b; Faraco *et al.*, 2003; Alvarez *et al.*, 2009; Saparrat *et al.*, 2010). Altos títulos de actividad lacasa en *T. versicolor* 290 (2.500 UE L⁻¹) fueron logrados en cultivos creciendo en presencia de Cu²⁺ 400 µM (Collins & Dobson, 1997). Otras cepas de *Trametes* alcanzaron valores de actividad lacasa de 9.000 (*T. versicolor* MB 52), 10.000 (*T. versicolor* MB 54) y 7.000 (*Trametes suaveolens*) UE L⁻¹, con la

adición de Cu^{2+} 1mM al medio de cultivo, mientras que ninguna de ellas produjo actividad lacasa en ausencia de este inductor (Galhaup & Haltrich, 2001). Lorenzo *et al.* (2006) estudiaron el efecto del cobre sobre la producción de lacasa en *T. versicolor* CBS100.29 y obtuvieron los máximos valores (alrededor de 8.000 UE L⁻¹) suplementando el medio con Cu^{+2} 3.5 mM. En un trabajo mas reciente se alcanzaron valores de mas de 15.000 UE L⁻¹ de actividad lacasa en una cepa de *Trametes* sp. 48424 creciendo en presencia de Cu^{2+} 1 mM (Fan *et al.*, 2010). La adición de cobre al medio de cultivo de *T. versicolor* BAFC 4272 incrementó la actividad lacasa 150 veces, con respecto al medio sin el agregado del inductor (67 UE L⁻¹), alcanzando títulos de 10.000 UE L⁻¹ a los 18 días de cultivo (**Fig. 34.A**). Estos cultivos también mostraron una actividad MnP de 24 UE L⁻¹, el doble que la registrada en cultivos adicionados con Mn^{+2} (**Fig. 34.B**). Está comprobado que la regulación de la producción de lacasa por cobre ocurre a nivel transcripcional (Collins & Dobson, 1997; Fonseca *et al.*, 2010; Piscitelli *et al.*, 2011) pero el cobre no sólo afecta la actividad lacasa a este nivel, también se ha demostrado que concentraciones 1 mM de este metal disminuyen la actividad proteolítica extracelular, interfiriendo con la degradación de la lacasa (Palmieri *et al.*, 2001).

Otros metales que han sido reportados como moduladores de la transcripción de la enzima lacasa son la plata (Ag^+) y el manganeso (Mn^{+2}) (Soden & Dobson 2001; Manubens *et al.*, 2007). Sin embargo, sus efectos dependen de la especie con la que se está trabajando. Está demostrado que inducen la transcripción de lacasa en *P. sajor-caju*, *Clitocybula dusenii* y *N. frowardii* (Scheel *et al.*, 2000; Soden & Dobson, 2001), pero inhiben su expresión en *C. subvermispora* (Manubens *et al.*, 2007). En el caso de *T. versicolor* BAFC 4272 la adición de Mn^{+2} produjo un leve incremento de la actividad lacasa (7 veces más que en el control) alcanzando las 520 UE L⁻¹, sin embargo, no mostró una fuerte inducción la actividad MnP (10 UE L⁻¹), la cual resultó ser aún menor que la obtenida en los cultivos adicionados con Cu^{+2} (24 UE L⁻¹).

En los cultivos realizados con medio GA sin la adición de estos metales no se registró ninguna actividad MnP (**Fig. 34.C**). Cabe destacar que el crecimiento del hongo en el medio adicionado con Mn^{+2} resultó ser más lento

que en los otros tratamientos, como se puede observar en las curvas de consumo de azúcares (**Fig. 34**). La biomasa alcanzada en estos cultivos también resultó ser menor (**Fig. 35**). Los metales pesados son conocidos inhibidores de muchas enzimas involucradas tanto en metabolismo primario como secundario, y pueden afectar el crecimiento fúngico (Baldrian, 2003). En cambio, no se detectaron diferencias significativas entre las biomazas alcanzadas en los tratamientos con cobre (1 mM) y el control, así como entre las respectivas curvas de consumo de azúcares. Al parecer el agregado de este metal, a la concentración utilizada, no inhibe el crecimiento de este nuevo aislamiento.



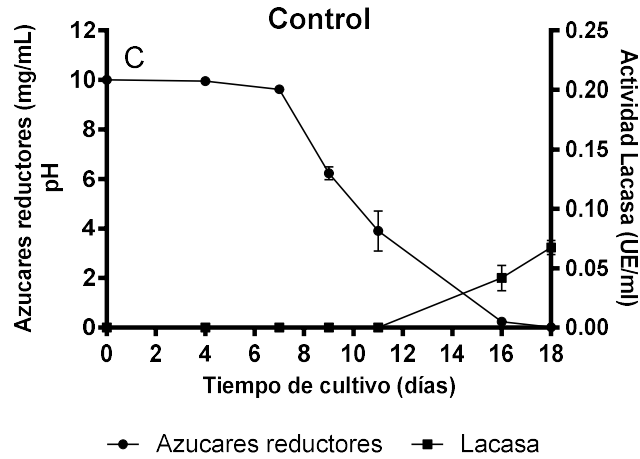


Figura 34: Curvas de consumo de azúcares reductores y actividades lacasa y MnP en cultivos de *T. versicolor* BAFC 4272 creciendo en medio líquido GA adicionado con cobre (A), manganeso (B) y sin agregados (C). En este último no se encontró actividad MnP.

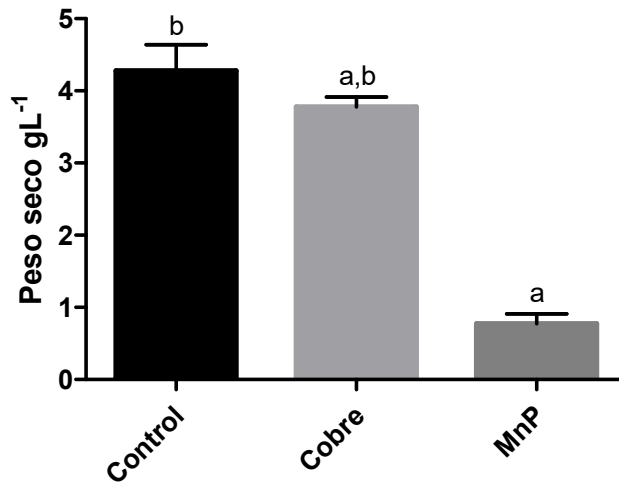


Figura 35: Efecto de la adición de cobre y manganeso sobre la biomasa de *T. versicolor* BAFC 4272 al cabo de 18 días de cultivo. Las medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

4.2.7. Ensayos de actividad y estabilidad enzimática

Una de las características deseables en una enzima con potencial uso en biotecnología es su termoestabilidad. Las enzimas termoestables en general tienen mayor resistencia a sustancias químicas desnaturizantes y a altos niveles de alcalinidad o acidez (Haki & Rakshit, 2003); además, debido a que trabajan a altas temperaturas, las reacciones suelen ser más rápidas y menos susceptibles a contaminaciones microbianas (Li *et al.*, 2005). La estabilidad térmica de las lacasas varía significativamente dependiendo de la temperatura de crecimiento del organismo del que se las obtiene. Las lacasas más termoestables fueron aisladas de bacterias, mientras que las obtenidas a partir de hongos suelen perder rápidamente su actividad por encima de los 60°C (Baldrian, 2006). La termoestabilidad de las lacasas de *T. versicolor* varía notoriamente, incluso entre las isoenzimas obtenidas a partir de un mismo organismo. En el trabajo de Koschorreck *et al.* (2008) se realizó una caracterización comparativa de las 4 isoenzimas de lacasa de *T. versicolor* 3086, la isoenzima Tv-Lcc β retuvo un 62% de su actividad luego de 20 min. a 70°C, mientras que Tv-Lcc δ perdió por completo su actividad al cabo de 20 min a 50°C.

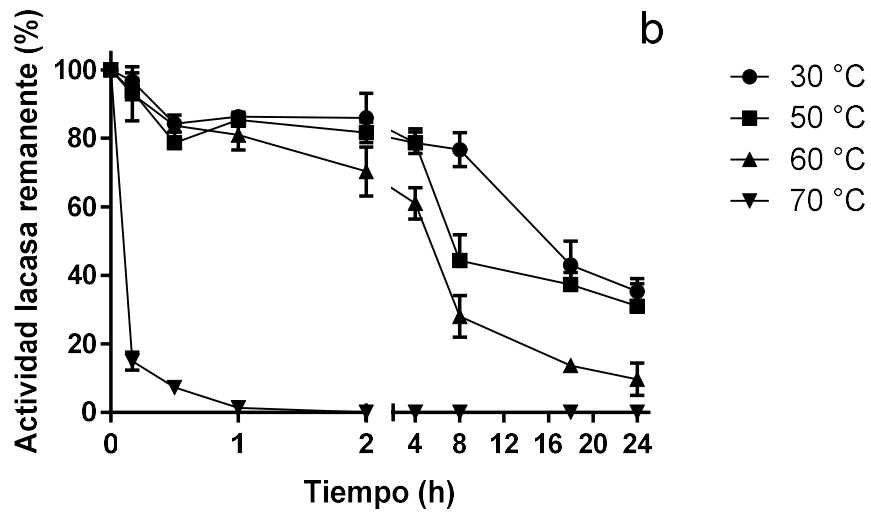
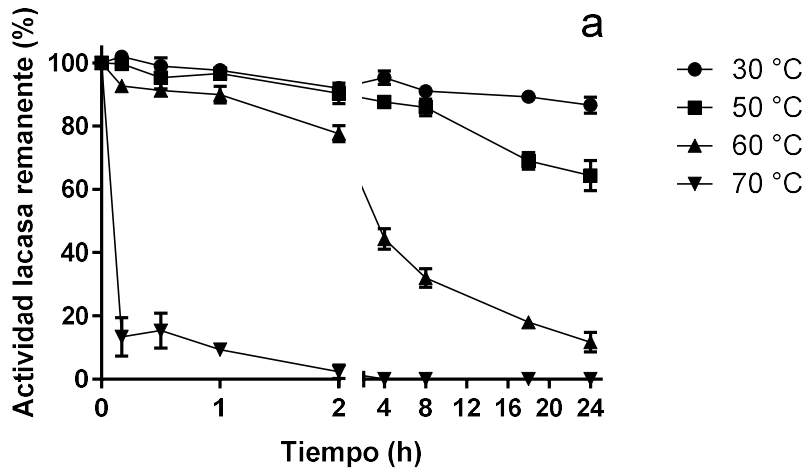
En el presente trabajo el ensayo de termoestabilidad se realizó con el sobrenadante crudo de *T. versicolor* BACF 4272, el cual fue incubado a temperaturas de entre 30-70°C (**Fig. 36**). La enzima demostró una mayor estabilidad a 30°C, conservando un 87% de su actividad luego de 24 h. También demostró buena estabilidad a 50°C manteniendo un 87% de su actividad al cabo de 8 h, aunque esta actividad disminuyó luego hasta un 64% al cabo de 24 h. A 60°C la enzima mantuvo un 77% de su actividad al cabo de 2 h de incubación, pero luego esta actividad disminuyó rápidamente hasta un 11% a las 24 h. A 70°C la enzima perdió un 87% de su actividad en tan sólo 10 min. y resultó completamente inactiva al cabo de 2 h.

Estos resultados concuerdan con los hallados en *T. pubescens* BM89, cuya lacasa conservó un 50% de su actividad al cabo de 1,5 h y 3,7 min. a 60 y 70°C respectivamente (Galhaup *et al.*, 2002). En otros aislamientos de

Trametes sp. se reportaron lacasas con gran estabilidad térmica a 60 y 75°C (Xiao *et al.*, 2003; Tong *et al.*, 2007).

Dado que el sobrenadante crudo de un cultivo puede contener proteasas y otros compuestos capaces de interferir con la estabilidad de las enzimas, se suelen utilizar diferentes compuestos para incrementar la estabilidad de la lacasa en el crudo de cultivo como el glicerol (Costa *et al.*, 2002) y el manitol (Baptista *et al.*, 2000). Además, la pérdida de cobre también está descrita como un factor importante para la estabilidad de esta enzima, y las altas temperaturas provocarían la liberación de estos iones, causando también el desacople de las subunidades enzimáticas (Koroleva *et al.*, 2001). Es por ello que el ensayo de termoestabilidad también fue realizado con sobrenadante de cultivos adicionados con cobre (1 mM) (**Fig. 36b**). En estos últimos la caída de actividad a 70°C fue más brusca con respecto a la registrada en sobrenadantes sin la adición de este metal, la enzima perdió un 93% de su actividad luego de 10 min. y ya no se registró actividad alguna al cabo de 1 h. La actividad enzimática a 30, 50 y 60°C luego de 2 h no registró diferencias significativas con respecto al sobrenadante sin adicionar, pero luego disminuyó rápidamente conservando solo un 35, 31 y 9% de su actividad al cabo de 24 h a 30, 50 y 60°C respectivamente. En este caso, la adición de cobre al medio de cultivo no parece favorecer la estabilidad de la enzima, contrariamente a los resultados hallados por Papinutti *et al.* (2008) donde el agregado de CuSO₄ 1.25 mM a los sobrenadantes crudos de *F. sclerodermeus* permitió que la enzima mantenga un 81% de actividad contra un 57% en cultivos sin este agregado.

Por otro lado, también resultó interesante investigar el posible efecto del colorante VM sobre la estabilidad enzimática, teniendo en cuenta que en procesos de biorremediación de efluentes la enzima debe trabajar en presencia del colorante. En los sobrenadantes adicionados con VM la actividad lacasa decreció también rápidamente con respecto a los cultivos crecidos en medio GA sin adicionar. En estas condiciones la enzima perdió un 97% de actividad al cabo de 10 min de incubación a 70°C, y conservó un 35, 28 y 5% de actividad luego de 24 h a 30, 50 y 60°C respectivamente.



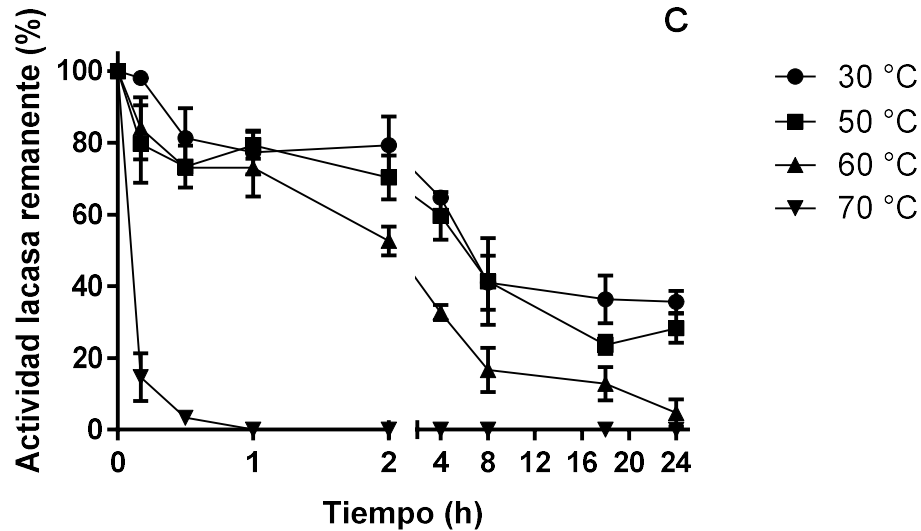


Figura 36: Termoestabilidad de la enzima lacasa de *T. versicolor* BACF 4272 proveniente de cultivos en medio GA (a), medio GA + Cobre (b) y medio GA + VM (c), a diferentes temperaturas: 30, 50, 60 y 70 °C.

La mayoría de las lacasas fúngicas poseen una actividad óptima a una temperatura dentro del rango 40-60°C y a un pH de entre 3 y 4 (Stoilova *et al.*, 2010). Según la bibliografía, algunas de las temperaturas óptimas de las lacasas del género *Trametes* son 45°C para *T. versicolor* 1A (Stoilova *et al.*, 2010), 55°C para *T. versicolor* (Li *et al.*, 2014a), 60°C para *Trametes* sp. (Daassi *et al.*, 2013) y 50°C para *T. trogii* (Levin *et al.*, 2002; Khlifi *et al.*, 2010). La temperatura óptima puede variar incluso entre las isoenzimas de lacasa pertenecientes a un mismo organismo. Las cuatro isoenzimas de *T. versicolor* 3086 mostraron temperaturas de 75, 80, 60 y 45°C para Lcc α , Lcc β , Lcc γ y Lcc δ , respectivamente (Koschorreck *et al.*, 2008). La lacasa de *T. versicolor* 4272 demostró tener una actividad óptima en un rango de temperaturas de entre 30 y 50°C (**Fig. 37a**), aunque a 60°C aún mantuvo una actividad del 92%. Esta actividad, sin embargo, disminuyó drásticamente a 70°C (13,3%). Esta caída abrupta de la actividad a 70°C fue registrada previamente en otras cepas de *Trametes* (Maalej-Kammoun *et al.*, 2009; Daassi *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014a), aunque, por otro lado, también se encontraron casos en que la enzima

conservó hasta un 76% de actividad o incluso registró una actividad óptima a esa temperatura (Levin *et al.*, 2002; Khlifi *et al.*, 2010).

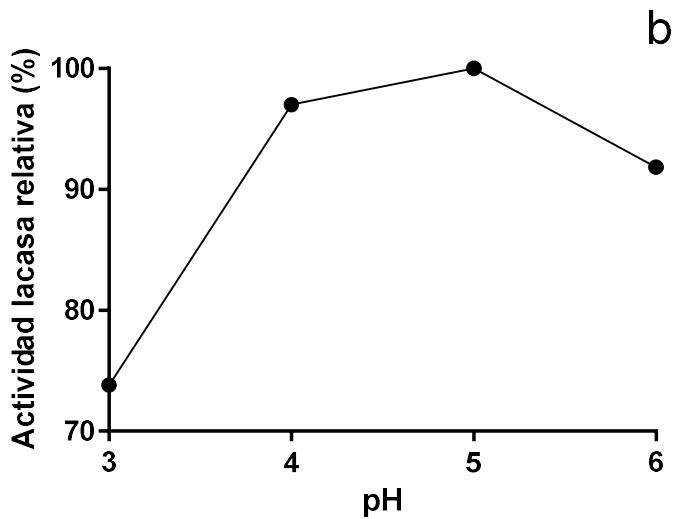
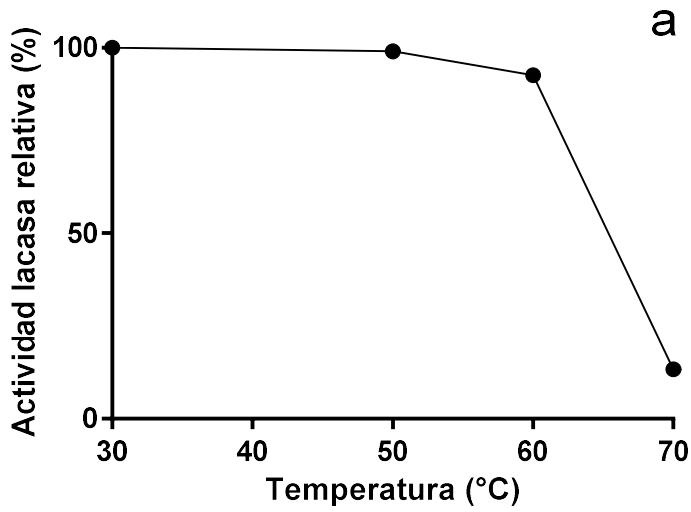


Fig 37: Efectos de la temperatura (a) y el pH (b) Sobre la actividad lacasa de *T. versicolor* BAFC 4272.

Para estudiar el efecto del pH sobre la actividad lacasa se utilizó buffer citrato-fosfato ajustado a diferentes pHs. Las lacasas fúngicas a menudo

poseen un pH óptimo ácido el cuál se corresponde con las condiciones de su medio ambiente natural (Garzillo *et al.*, 2001), algunos ejemplos son *T. hirsuta* (Haibo *et al.*, 2009), *Clitocybe maxima* (Zhang *et al.*, 2010), *Paraconiothyrium variabile* (Forootanfar *et al.*, 2011), *T. trogii* (Zouari-Mechichi *et al.*, 2006) y *Pycnoporus coccineus* (Jaouani *et al.*, 2005).

El pH óptimo para la lacasa de *T. versicolor* BAFC 4272 se registró entre 4 y 5 (**Fig. 37b**). Otros pHs óptimos registrados para *Trametes* fueron 4.5 (Stoilova *et al.*, 2010), 2 (Li *et al.*, 2014a), 5 (Khelifi *et al.*, 2010), 4 (Zouari-Mechichi *et al.*, 2006) y pH 3.4 (Levin *et al.*, 2002).

Según el trabajo de Koschorreck *et al.* (2008) los pHs óptimos para las isoenzimas de lacasa recombinantes de *T. versicolor* fueron de 1.9, 2.3, 3.1 y 3.1 para Lcc α , Lcc β , Lcc γ y Lcc δ , respectivamente.

Para evaluar la estabilidad enzimática a distintos pHs se utilizó un rango de pHs de entre 3-6 (**Fig. 38**). El ensayo se realizó a dos temperaturas 30 y 70°C. La lacasa de este nuevo aislamiento de *T. versicolor* BAFC 4272 resultó ser más estable a pH 5 (utilizando 2,6-DMP para su medición). Durante las 24 h del ensayo su actividad disminuyó un 8% a pH 5 y un 13% a pH 4. La mayor pérdida de estabilidad fue registrada a pH 3, la enzima perdió más del 50% de su actividad al cabo de 24 h a este pH.

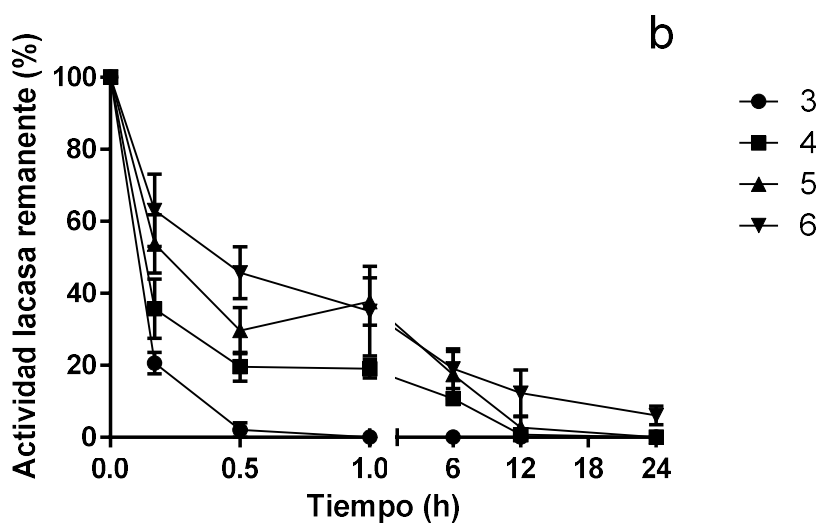
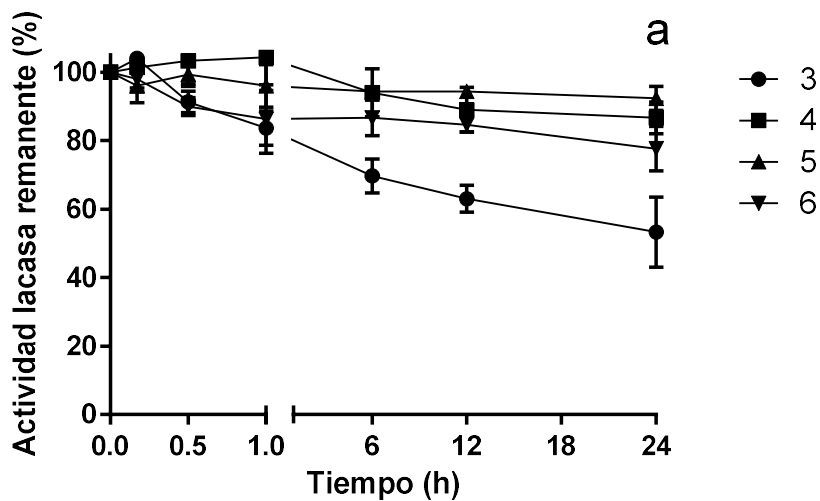


Figura 38: Efecto del pH sobre la actividad lacasa de *T. versicolor* BAFC 4272. (a) Ensayo realizado a 30°C, (b) Ensayo realizado a 70°C.

Una enzima puede ser más estable en condiciones diferentes a las de su actividad óptima (Chakroun *et al.*, 2010). Casos de estabilidad enzimática de lacasas a pH diferentes al de su actividad óptima fueron reportados previamente en *Melanocarpus albomyces*, *P. ostreatus*, *P. eryngii* y *Trichoderma atroviride* (Chakroun *et al.*, 2010). Sin embargo, en el caso de *T. versicolor* BAFC 4272 el pH al cual la enzima es más estable coincide con el

pH de su actividad óptima (pH 5). Del mismo modo, presenta una mayor estabilidad térmica entre 30-50°C, coincidiendo también con las temperaturas óptimas para su actividad.

En definitiva, la actividad lacasa en sobrenadantes crudos de cultivos de *T. versicolor* BAFC 4272 exhibe propiedades catalíticas comparables a otras lacasas con respecto a su temperatura y pH óptimos, y demuestra ser muy estable a temperaturas de hasta 60°C y a pHs entre 3-5. La estabilidad enzimática frente a altas temperaturas, es un criterio deseable para su comercialización y posterior aplicación biotecnológica.

4.3. Colorantes industriales

4.3.1 Degradación de colorantes industriales y actividades enzimáticas en medios agarizados

Se utilizaron colorantes con distintas estructuras químicas y que (con excepción del Índigo Carmín) normalmente resultan difíciles de degradar biológicamente sin la ayuda de mediadores. El nuevo aislamiento de *T. versicolor* BAFC 4272 fue capaz de crecer y decolorar todos los colorantes ensayados, tanto en medio GA como en medio MEA (**Tabla 7**). En todos los casos las velocidades de decoloración observadas fueron menores o iguales a las velocidades de crecimiento, corroborando el hecho de que la decoloración es una actividad metabólica secundaria que ocurre en las zonas más viejas del micelio (Chiu *et al.*, 1998). Al comparar ambos medios de cultivo encontramos que, con excepción del colorante verde de malaquita (VM), las velocidades de crecimiento obtenidas en medio complejo MEA son mayores que en medio sintético GA, incluso para el control. Las mayores velocidades de crecimiento y decoloración se registraron en medio MEA con los colorantes Xilidina y Remazol Brilliant Blue R (RBBR), aunque no superaron las tasas de crecimiento correspondientes al control. Otras cepas de *T. versicolor* se han reportado previamente como capaces de crecer y decolorar Xilidina y RBBR,

aunque en general se lograron mayores porcentajes de decoloración con RBBR (Champagne & Ramsay, 2005; Levin *et al.*, 2010). En el trabajo de Zeng *et al.* (2011) se compararon la decoloración de colorantes azoicos (como la Xilidina) y antraquinónicos (como el RBBR), y se encontró que con estos últimos se alcanzaron mayores porcentajes de decoloración, al ser tratados con un crudo enzimático de *T. troglia* SYBC-LZ.

Se ha sugerido que la capacidad para decolorar Xilidina podría utilizarse para relevar cualitativamente actividades ligninolíticas, dado que en muchos casos los hongos incapaces de decolorar Poly R-478 tampoco decoloran Xilidina (Levin *et al.*, 2004).

Las menores tasas de crecimiento y decoloración fueron obtenidas con VM y Azure B. En el caso del Azure B en medio MEA, además de un halo alrededor de la colonia, también se observó decoloración en forma difusa en distintas zonas de la caja de Petri. En medio GA la decoloración no comenzó sino hasta el día 13 de cultivo y lo hizo en forma de parches decolorados difusamente. Este colorante heterocíclico es uno de los más recalcitrantes y suele ser muy resistente a la degradación por enzimas fúngicas, sin embargo, se han visto casos en los cuales puede ser decolorado aún sin la ayuda de mediadores alcanzando un 14% de decoloración en 24 h (Levin *et al.*, 2010; Grassi *et al.*, 2011). En general las cepas capaces de degradarlo son también capaces de degradar la mayoría de los colorantes industriales (Levin *et al.*, 2004; 2010).

Como ya se mencionó en la sección M y M, el VM es un colorante del tipo trifenilmetánico, muy difícil de degradar debido a su compleja estructura aromática (Daneshvar *et al.*, 2007; Chen & Ting, 2015), a pesar de ello, en las placas adicionadas con este colorante, el nuevo aislamiento fue capaz de crecer y decolorar aún en ausencia de mediadores, aunque las tasas de crecimiento y decoloración fueron las más bajas registradas. Esto concuerda con lo observado en el trabajo de Levin *et al.* (2004). Sin embargo, la capacidad de degradar este compuesto depende mucho de las condiciones en las que se realiza el experimento, ya que posteriores ensayos realizados con este mismo aislamiento creciendo en otros medios de cultivo (medios líquidos) demostraron que la cepa en estudio es capaz de decolorar rápida y

eficientemente el VM, probablemente debido también a la mayor accesibilidad de las enzimas fúngicas al colorante. Soluciones de VM 80 μ M pierden un 50% de su absorbancia en solo 2 h de tratamiento sin la ayuda de ningún mediador. Existen numerosos trabajos en los que distintas cepas de *T. versicolor* u otras especies del género *Trametes* son capaces de degradar eficientemente el VM y otros colorantes del tipo trifenilmetánico como Azul de Bromofenol, Cristal Violeta y Acid Red (Maalej- Kammoun *et al.*, 2009; Grassi *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2014a; 2014b).

No se reportaron las tasas de decoloración del colorante Índigo Carmín ya que el mismo perdió su coloración al ser autoclavado, sin embargo, en muchas ocasiones la pérdida de color no indica pérdida de toxicidad (Ramsay & Nguyen, 2002), y por lo tanto, la tasa de crecimiento y la producción enzimática se midieron de igual manera que en las placas adicionadas con el resto de los colorantes.

Las actividades lacasa, MnP y LiP fueron medidas en el medio agarizado (ver M y M). Como se puede observar en la **Tabla 7**, la adición de los colorantes a los medios de cultivo resultó en un aumento de la actividad lacasa con respecto al control en casi todos los casos (excepto con Azure B y RBBR en medio MEA), pero ninguno de ellos estimuló la actividad MnP, que siempre resultó ser mayor en el control. Se intentó medir la actividad LiP por oxidación de Azure B pero no fue posible detectarla, a pesar de que el aislamiento fue capaz de decolorar este colorante en ambos medios de cultivo. Según el trabajo de Archibald (1992) la degradación de Azure B es un signo de actividad LiP, pero posteriormente se demostró la degradación de este colorante por lacasa purificada de *T. trogii* (Grassi *et al.*, 2011).

A pesar de que se conoce que *T. versicolor* es capaz de secretar los tres tipos principales de enzimas ligninolíticas (lacasas, MnP y LiP), en la mayoría de los trabajos se encuentra que las lacasas son mayoritarias, de hecho, actualmente el género *Trametes* se asocia principalmente a la producción de estas enzimas (Dhillon *et al.*, 2012; Aydinoglu & Sargin, 2013; Nguyen *et al.*, 2014; Ottoni *et al.*, 2014). En el trabajo de Zeng *et al.* (2011) se demostró que la principal enzima involucrada en la decoloración de varios colorantes azoicos y antraquinónicos es la lacasa, y que la decoloración puede verse afectada o

incluso totalmente inhibida al utilizar conocidos inhibidores de la actividad lacasa, como cisteína y NaN_3 (Johannes & Majcherczyk, 2000).

Las diferencias en las actividades enzimáticas entre ambos medios de cultivo se deben probablemente a que la producción de enzimas ligninolíticas está fuertemente regulada, entre otros factores, por los nutrientes, como por ejemplo la concentración de nitrógeno (Hatvani & Mécs, 2002; Zeng *et al.*, 2011), y el pH (Papinutti *et al.*, 2006).

En estos ensayos en placa no se encontró una correlación positiva entre las tasas de decoloración y las actividades enzimáticas, en oposición a lo verificado en otros trabajos (Champagne & Ramsay, 2005; Papinutti *et al.*, 2006; Diorio *et al.*, 2008). Los cultivos crecidos con VM mostraron las menores tasas de crecimiento y decoloración, pero también las mayores actividades lacasa. En base a esto, este colorante fue seleccionado para realizar ensayos posteriores a fin de estudiar su efecto como inductor de enzimas ligninolíticas en el nuevo aislamiento de *T. versicolor* BAFC 4272.

Tabla 7: Tasas de crecimiento y decoloración en medios MEA y GA incubados a 28°C, y actividades lacasa y MnP medidas en zonas decoloradas. Los datos son el promedio de tres replicas independientes. * Decolorado al momento de inocular. ** La decoloración comenzó el día 13 en forma de parches en toda la superficie de la caja de Petri.

Medio de cultivo	Colorante	Tasa de crecimiento (cm/día)	Tasa de decoloración (cm/día)	Actividad Lacasa (UE/placa)	Actividad MnP (UE/placa)
MEA	Azure B	1.25	0.81	0.476	0.084
	Xilidina	1.52	1.34	0.925	0.090
	RBBR	1.46	1.37	0.404	0.150
	Indigo	1.50	*	1.170	0.062
	VM	0.42	0.42	1.774	0.118
	Control	2.00		0.640	0.360
GA	Azure B	0.85	**	B	B
	Xilidina	1.43	1.23	0.380	0.259
	RBBR	1.39	1.31	0.861	0.209
	Indigo	1.35	*	0.514	0.317
	VM	0.65	0.65	1.581	0.231
	Control	1.70		1.002	0.600

4.3.2. Efecto del agregado de una mezcla de colorantes industriales a cultivos en medio líquido adicionados con distintos inductores de actividad lacasa.

Debido a que en los efluentes industriales suelen encontrarse varios tipos de colorantes al mismo tiempo, se evaluó la capacidad de *T. versicolor* BAFC 4272 para degradarlos simultáneamente. Para ello se utilizaron cultivos en medio GA adicionados con distintos inductores escogidos a raíz de los resultados obtenidos en los ensayos de inducción de actividad lacasa. Se seleccionaron dos compuestos aromáticos: vainillina (buen inductor) y cumarina (escasa inducción), y dos metales: Cu⁺² (buen inductor) y Mn⁺²

(escasa inducción), con el fin de relacionar la actividad lacasa con la capacidad de decoloración.

El agregado de esta mezcla de cinco colorantes industriales produjo un aumento de actividad lacasa únicamente en los cultivos adicionados con vainillina y no afectó significativamente la curva de actividad de los cultivos restantes (**Fig. 39**). En los cultivos con vainillina se registró el mayor porcentaje de decoloración luego de 48 h de tratamiento. En el resto de los tratamientos también se alcanzaron buenos porcentajes de decoloración: 86, 75, 58 y 51% para vainillina, cumarina, control y Cu^{+2} respectivamente (**Fig. 40**). En los cultivos adicionados con Mn^{+2} la coloración de la muestra aumentó en lugar de disminuir luego del agregado de la mezcla de colorantes, es por ello que no figura el porcentaje de decoloración de este tratamiento en la Fig. 40.

El hecho de que un sobrenadante enzimático pueda utilizarse sin procesamiento previo es una ventaja a la hora de evaluar la potencialidad de una cepa para su utilización en el tratamiento de efluentes coloreados, ya que significa una reducción en el costo del proceso.

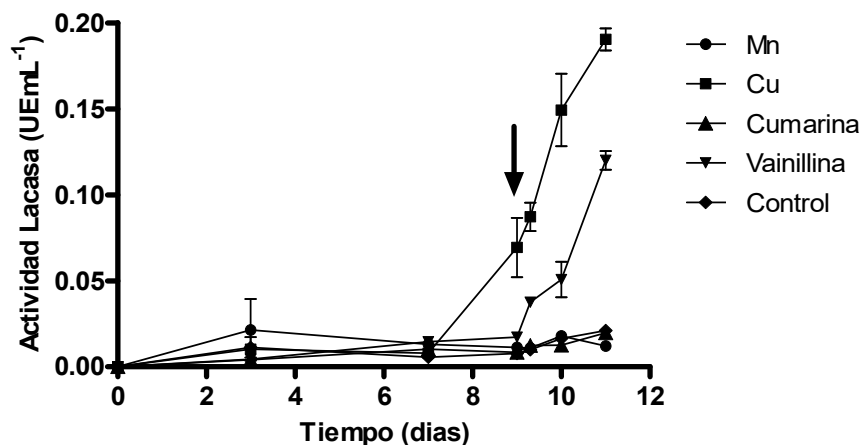


Figura 39: Efecto del agregado de una mezcla de 5 colorantes industriales sobre la actividad lacasa en cultivos en medio GA adicionados con distintos inductores. La flecha indica el momento del agregado de la mezcla de colorantes.

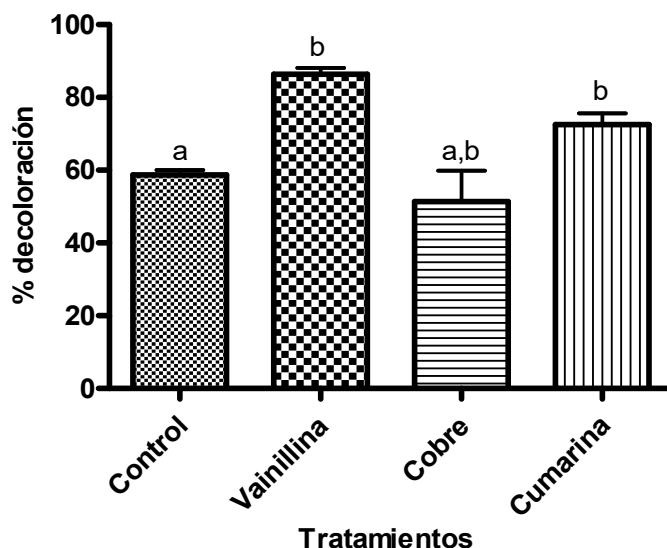


Figura 40: Porcentajes estimados de decoloración de la mezcla de colorantes al cabo de 48 h de tratamiento. No se presentan datos del tratamiento con Mn debido a que su absorbancia al cabo de 48 h aumentó en lugar de disminuir. Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

4.4. Ensayos con el colorante industrial verde de malaquita

Como se mencionó anteriormente el colorante VM trifenilmetánico es altamente tóxico, aunque sin embargo muy utilizado. Entre otros usos se encuentran el teñido industrial de telas, coloreado de cerámicas, papel, y como agente antifúngico y antiparasitario en piscicultura (Srivastava *et al.*, 2004).

Para estudiar el efecto del colorante VM sobre el crecimiento y la actividad lacasa de este nuevo aislamiento de *T. versicolor* BAFC 4272 se realizaron distintos ensayos. En todos ellos la adición del colorante se efectuó al día 11 de cultivo. Se eligió este momento teniendo en cuenta las curvas de crecimiento y consumo de azúcares realizadas previamente. La intención fue agregar el colorante en la etapa de crecimiento exponencial, cuando la tasa de consumo de azúcares es máxima y el hongo se encuentra metabólicamente preparado para la producción de enzimas lignocelulolíticas.

Como se muestra en la **Fig. 41**, la adición de VM al cabo de 11 días de crecimiento no afectó la curva de consumo de azúcares reductores. El

crecimiento de los cultivos de *T. versicolor* BAFC 4272 en medio GA con VM no registró diferencias significativas con respecto al control sin VM al utilizar concentraciones de entre 5-40 μM del colorante. Con concentraciones de 80 y 160 μM la biomasa alcanzada resultó sólo un 25% menor que la de los controles (**Fig. 42**). Generalmente el VM adicionado en los medios de cultivo produce un retraso en el crecimiento fúngico (Levin *et al.*, 2004). Se ha reportado que *F. sclerodermeus* creciendo en medio con VM necesita 50 días para alcanzar una biomasa comparable a la que logra en 18 días en medio sin VM, y que el crecimiento de *P. chrysosporium* se ve afectado a una concentración 4 μM del colorante en medio líquido (Papinutti & Forchassin, 2004; Papinutti *et al.*, 2006; Maalej-Kammoun *et al.*, 2009).

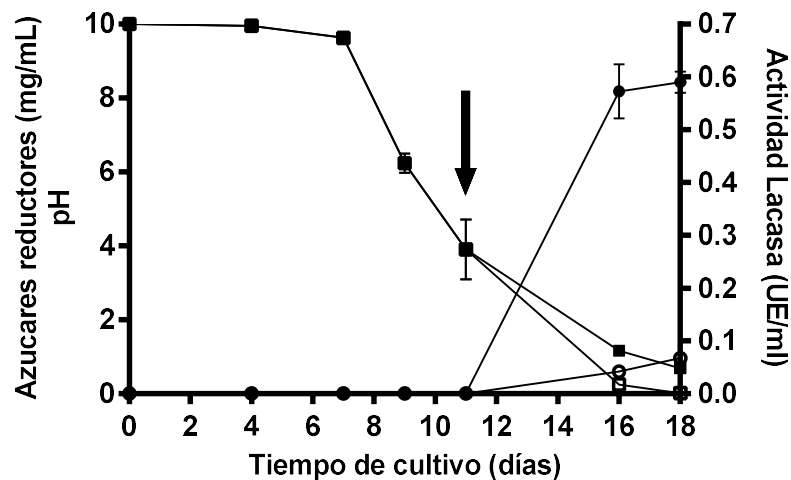


Figura 41: Curvas de consumo de glucosa y actividad lacasa de *T. versicolor* en medio líquido GA a 28°C bajo condiciones estáticas. El VM fue adicionado luego de 11 días de crecimiento (flecha). Consumo de glucosa en cultivos control (□) y en cultivos con VM (■); actividad lacasa en cultivos control (○) y en cultivos con VM (●).

El hecho de que este colorante fungicida no haya afectado el crecimiento de este nuevo aislamiento de *T. versicolor* BAFC 4272, utilizando concentraciones de hasta 40 μM , es muy importante teniendo en cuenta la posibilidad de una aplicación biotecnológica en biorremediación, ya que uno de

los problemas que presenta el uso de hongos causantes de pudrición blanca es la colonización y supervivencia en el sustrato contaminado. La capacidad de un microorganismo de crecer directamente en el medio acuoso a decolorar es una característica muy deseable a la hora de buscar nuevas cepas con potencial para su uso en biorremediación.

Por otro lado, la adición de este colorante a cultivos de *T. versicolor* BAFC 4272 creciendo en medio GA produjo un aumento en la actividad lacasa: cultivos sin VM mostraron una producción máxima de lacasa de 67 UE L⁻¹ mientras que en presencia de este colorante alcanzaron un máximo de 590 UE L⁻¹ (**Fig. 1**). En otros casos la adición de este colorante no produjo ningún efecto sobre la actividad lacasa, por ejemplo, en *F. sclerodermeus* (Papinutti & Forchiassin, 2004).

4.4.1. Efecto de la concentración de VM en combinación con cobre sobre el crecimiento y las actividades lacasa y MnP

Como se mencionó anteriormente, la adición de VM no afectó significativamente el crecimiento alcanzado por *T. versicolor* BAFC 4272, utilizando concentraciones de hasta 40 µM. Al día de la cosecha los cultivos con las concentraciones más altas de VM (80 y 160 µM) alcanzan una biomasa menor con respecto al resto de los tratamientos, pero esto podría deberse a una variación en la cinética de crecimiento con una fase lag más prolongada provocada por el incremento en la concentración del colorante. El cobre tiene un efecto negativo sobre el crecimiento de este hongo, el control con cobre alcanza un 63% de biomasa con respecto al control sin este metal. De todos modos, debemos también considerar que el incremento en la concentración de cobre en el medio afecta la cinética de crecimiento del cultivo. En coincidencia con los resultados previos, la biomasa alcanzada por todos los tratamientos combinados con VM y cobre también resultó comparable a la alcanzada por el control con cobre; por lo tanto, el agregado de VM no ejercería un efecto negativo significativo sobre el crecimiento de esta cepa de *T. versicolor* (**Fig 42**).

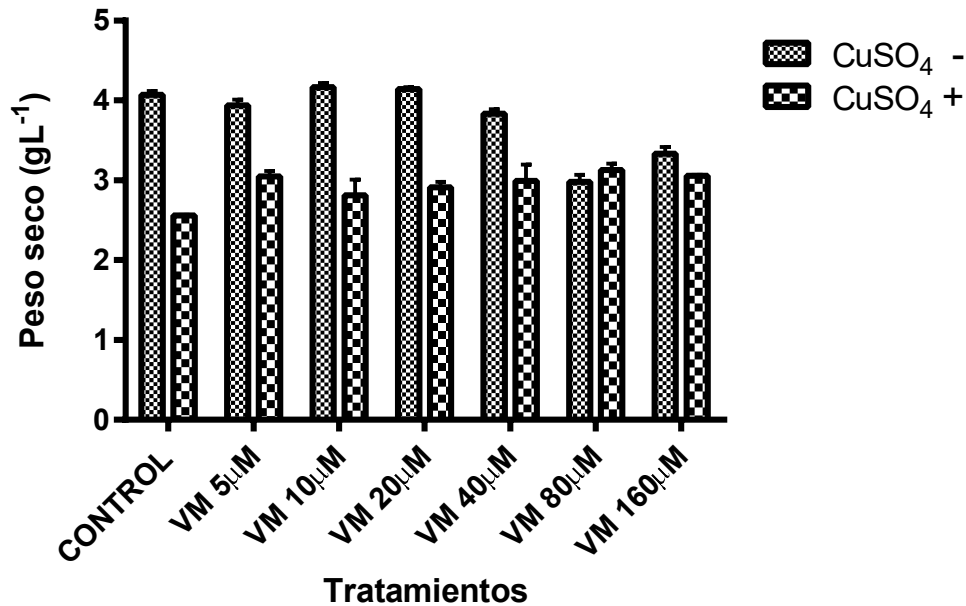


Figura 42: Efecto del cobre sobre el crecimiento de *T. versicolor* en medio de cultivo GA adicionado con distintas concentraciones de VM.

Teniendo en cuenta el resultado obtenido con VM 50 μM , se probó el efecto de concentraciones menores y mayores, combinadas con la adición de CuSO_4 1mM (**Fig. 43**). La adición de cantidades crecientes de VM, hasta una concentración de 80 μM inclusive, produjo un aumento en la actividad lacasa con respecto al control. Sin embargo, a una concentración de 160 μM esta actividad disminuyó debido al efecto tóxico de este fungicida que interfiere probablemente en el metabolismo fúngico. Cuando se adicionó CuSO_4 1 mM conjuntamente con el VM, se registraron valores mayores de actividad lacasa, aunque es probable que esto se deba más al efecto del cobre que a la combinación de ambos factores, dado que en el control sin VM el cobre también produjo un fuerte aumento de la actividad. El cobre es un factor clave en la actividad lacasa en hongos. Estudios previos demostraron que la concentración óptima de este metal para la inducción de actividad lacasa en distintas especies de *Trametes* varía a lo largo de un amplio rango. Las más altas actividades lacasa para *T. versicolor* CBS 100.29 (Lorenzo *et al.*, 2006), *T.*

trogii (Zeng *et al.*, 2011) y *T. versicolor* 290 (Collins & Dobson, 1997) fueron obtenidas con concentraciones de cobre 3.5, 1 y 0.4 mM, respectivamente.

En el tratamiento con VM 160 μ M con cobre se registraron altos títulos de actividad lacasa a pesar del efecto tóxico del VM, esto se puede explicar teniendo en cuenta que el cobre ejerce su efecto sobre las enzimas ya producidas y liberadas al medio de cultivo. Se ha demostrado que concentraciones 1 mM de este metal disminuyen la actividad proteolítica extracelular, interfiriendo con la degradación de la enzima (Palmieri *et al.*, 2001). O sea, que a pesar de que el VM pueda estar interfiriendo en el metabolismo del hongo y en la producción enzimática, el cobre estaría de alguna manera contrarrestando ese efecto, incluso a nivel transcripcional. La inducción de enzima lacasa por colorantes ya ha sido comprobada con la xilidina (Meza *et al.*, 2007; Xavier *et al.*, 2007; Xin & Geng, 2010). En el trabajo de Collins & Dobson (1997) se reportó una cepa de *T. versicolor* cuya actividad lacasa resultó inducida a nivel transcripcional por la xilidina.

Con la adición de VM 40-80 μ M se alcanzó una actividad lacasa comparable a la obtenida con CuSO_4 1 mM (**Fig 43**).

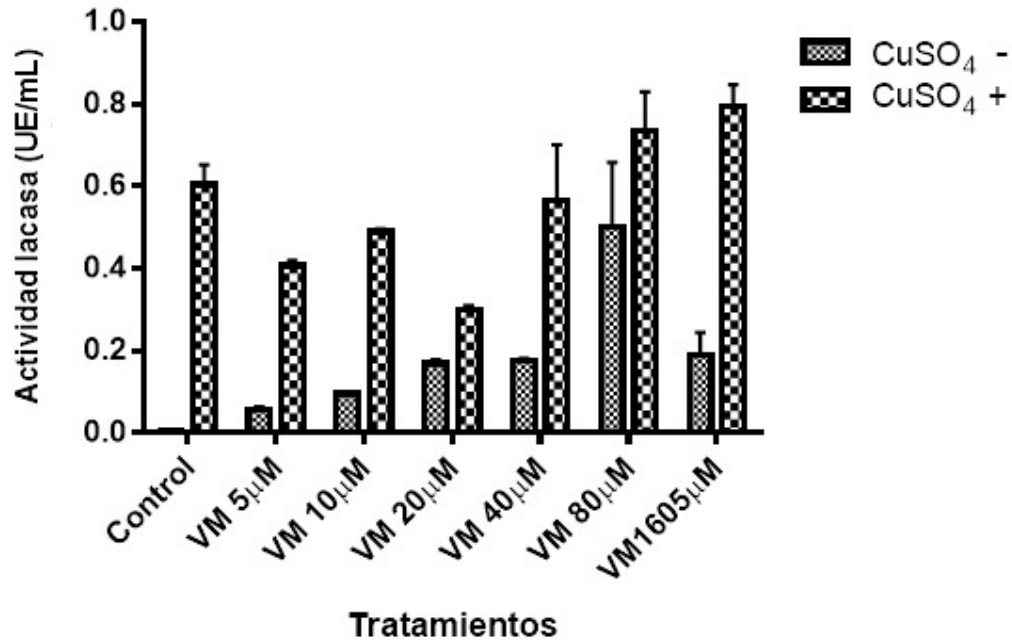


Figura 43: Actividad lacasa luego de 8 días de la adición de VM.

Por otro lado, en la **Fig. 44** se observa que, además de provocar un aumento de la actividad, la respuesta al estímulo con VM es inmediata, sólo 2 h después de su adición ya se registró un aumento de la actividad lacasa. Entre los tratamientos con cobre, los valores más altos se lograron con VM 80 y 160 μM, pero se alcanzaron valores comparables en los tratamientos con VM 80 μM sin la adición del metal. En el trabajo de Pointing *et al.* (2000) fue evaluada la estimulación de lacasa de *P. sanguineus* con xilidina a distintas concentraciones (10-100 μM) y se encontró que la concentración óptima para la inducción es 50 μM, concentraciones por encima o por debajo de ese valor resultan en una menor actividad lacasa. Resultados similares fueron hallados en este trabajo.

No se registró actividad MnP en ninguno de los tratamientos, esto concuerda con el trabajo de Yen *et al.* (2014) en donde no se detecta la actividad de esta enzima en cultivos líquidos de *T. troglia* durante la decoloración de VM. La lacasa sería la enzima más importante (entre las valoradas) en el proceso de decoloración de este compuesto en las condiciones ensayadas.

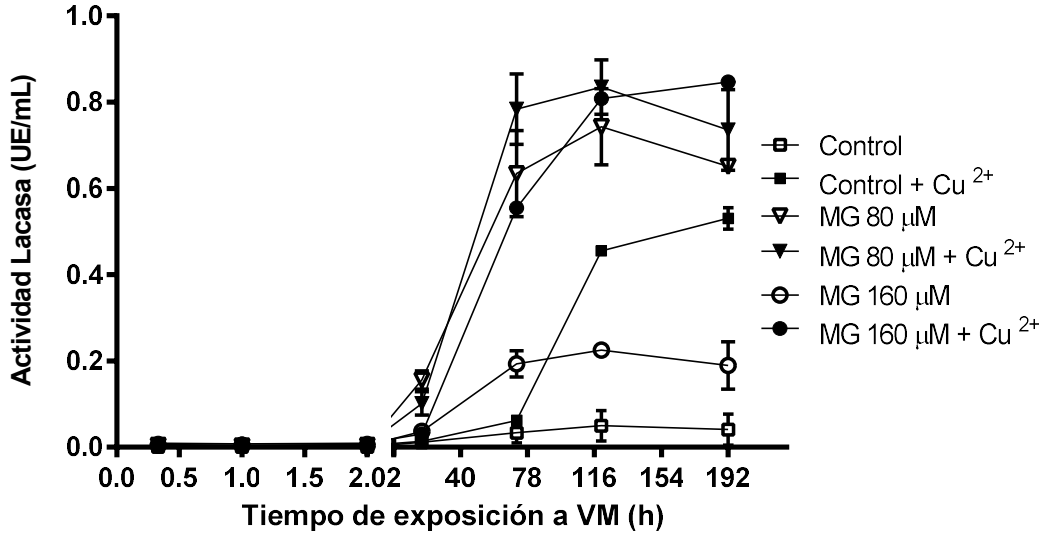


Figura 44: Curvas de actividad lacasa obtenidas con los valores más altos de VM ensayados.

4.4.2. Decoloración y adsorción de VM. Ensayos con cobre

Dado que los colorantes trifenilmetánicos son altamente nocivos para diversos organismos, incluidos los seres humanos, el hallazgo de nuevos microorganismos capaces de biodegradarlos resulta muy interesante.

En los últimos años el uso de biomasa y enzimas microbianas para la decoloración y detoxificación de efluentes contaminados con VM ha surgido como una posible solución a este problema. Estudios previos demostraron que existen muchas enzimas involucradas en la decoloración y detoxificación de VM, y que estas enzimas son a menudo especie-específicas (Yan *et al.*, 2014a). Se ha demostrado también que en la biodegradación de VM por levaduras se encuentran involucradas las enzimas lacasas, LiP, aminopirina N-demetilasa, NADH-DCIP reductasa y VM-reductasa, de las cuales estas dos últimas son las más importantes (Jadhav & Govindwar, 2006). Sin embargo, en la decoloración y detoxificación de VM por bacterias *Pseudomonas*, y por los hongos filamentosos *Penicillium pinophilum* y *Myrothecium roridum* las principales enzimas responsables son la lacasa y la VM-reductasa (Kalyani *et al.*, 2012).

Existen diferencias significativas entre las distintas cepas de *Trametes* con respecto a su capacidad para decolorar VM. En la mayoría de las cepas estudiadas se encuentra una correlación entre la actividad lacasa (medida a través de la oxidación de ABTS) y la capacidad de decoloración del hongo, aunque esto no ocurre en todos los casos (Yan *et al.*, 2014),

El proceso de decoloración de VM propuesto por Bibi *et al.* (2011) (**Fig. 45**) describe dos vías a través de las cuales se llega al producto decolorado. Ambos caminos comprenden demetilaciones, pero en uno de ellos hay un paso previo de reducción del VM a su forma leuco-VM (LVM). Que se elija una u otra vía de degradación al parecer está relacionado con el hecho de que se utilicen o no mediadores, y de la naturaleza de estos. Cuando el colorante es tratado con lacasa sin mediadores o utilizando como mediadores dimetoxifenol y catecol, la decoloración se produce por N-demetilaciones, pero cuando se utilizan como mediadores HBT, ABTS, siringaldehído, ácido p-cumárico o vainillina la decoloración se produce a través de una reducción del VM a LVM. Esto indica que la decoloración de este colorante en estas condiciones ocurre a través de su degradación (Bibi *et al.*, 2011). En el trabajo de Murugesan *et al.* (2009) se demostró que la degradación del VM mediada por la enzima lacasa ocurre a través de demetilaciones secuenciales.

Yuzhu & Viraraghavan (2001) demostraron que la decoloración del Cristal Violeta (otro colorante trifenilmetánico) también ocurre por medio de N-demetilaciones secuenciales catalizadas en este caso por la enzima LiP.

La biodegradación de VM por *Penicillium ochrochloron* produjo como metabolitos p-benzil-N,N-dimetilanilina e hidrocloreuro de N,N-dimetilanilina, resultando ambas sustancias no fitotóxicas (Utkarsha & Jadhav, 2011).

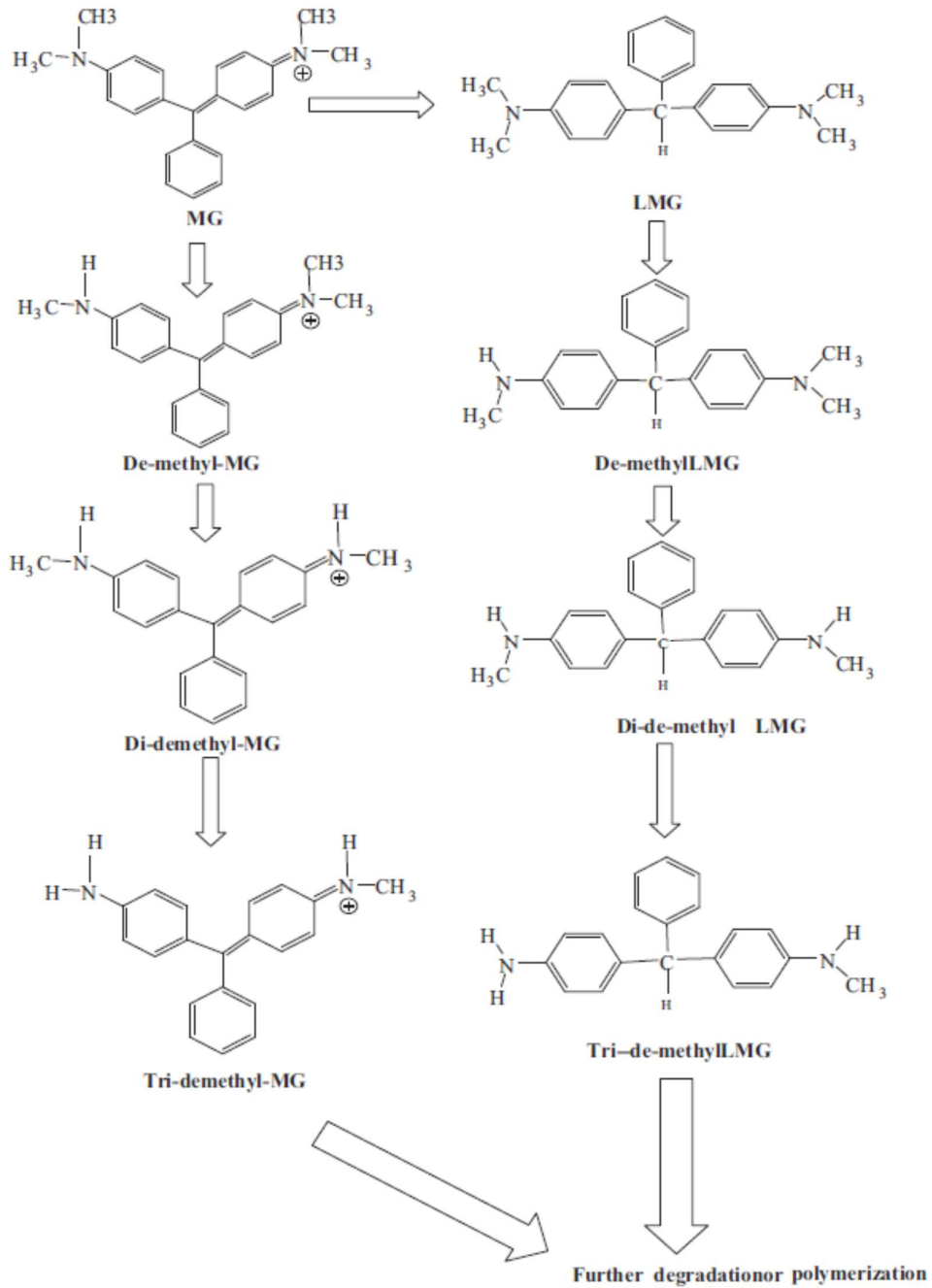


Figura 45: Mecanismo de degradación de VM por lacasa comercial de *T. versicolor* propuesto por Bibi *et al.* (2011).

La velocidad de decoloración aumenta rápidamente al principio y luego se estabiliza (**Fig. 46**) coincidiendo con lo observado por Yan *et al.* (2009) en la decoloración de VM por *P. ostreatus*.

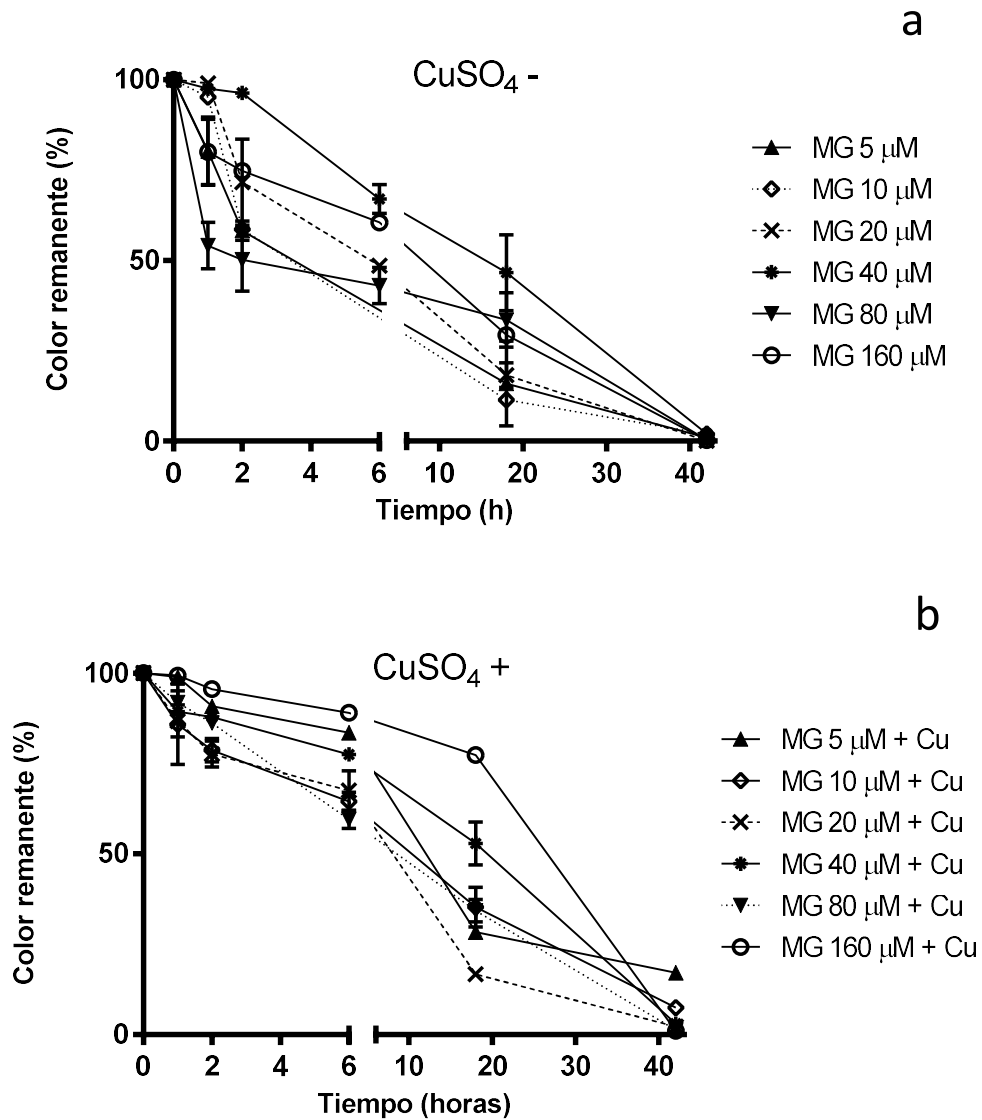


Figura 46: Curvas de decoloración obtenidas con diferentes concentraciones de VM. (a) cultivos sin la adición de CuSO_4 , (b) cultivos adicionados con CuSO_4 1 mM.

A pesar de tener más actividad lacasa, la decoloración en cultivos suplementados con Cu^{+2} es más lenta. Los metales pesados son conocidos

inhibidores de muchas enzimas involucradas tanto en metabolismo primario como secundario, y pueden afectar el crecimiento fúngico (Baldrian, 2003). El cobre inhibió el crecimiento de *G. lucidum* a concentraciones inferiores a 1 mM mientras que 150 ppm de Cu^{2+} disminuyeron el crecimiento de *P. chrysosporium* (Baldrian, 2003). Es probable que el Cu^{+2} afecte a otra enzima involucrada en la decoloración o a otro proceso fisiológico, dado que en estos experimentos se trabaja con todo el cultivo. Trabajos previos reportan que el Cu^{+2} inhibe o demora la decoloración de VM por *Trametes* sp. (Maalej-Kammoun *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2014). Resultados similares fueron obtenidos en la decoloración del colorante antraquinónico RBBR por *T. trogii* (Mechichi *et al.*, 2005).

Al finalizar el tiempo de tratamiento los micelios fueron filtrados y agitados durante 60 min. en una solución etanol:agua (1:1) con el fin de extraer el colorante que pudo ser adsorbido. La cantidad de colorante fue determinada espectrofotométricamente y resultó no ser significativa, como ya se podía apreciar a simple vista, ya que los micelios no mostraron grandes cambios en su coloración con respecto al control sin VM.

En la **Tabla 8** se pueden observar los porcentajes de decoloración y la cantidad de VM degradado en cada uno de los tratamientos ensayados.

Tabla 8: Porcentajes de decoloración y cantidades de VM degradado luego de 8 días de exposición a VM en las concentraciones indicadas, con y sin la adición de CuSO_4 1 mM. Los datos son los promedios de tres replicas independientes.

VM inicial (μM)	VM inicial (mg)	Cu^{2+} (mM)	Decoloración/Degradación	
			Porcentaje	VM (mg)
0	0	0	0	0
0	0	1	0	0
5	0.07	0	99.03	0.069
5	0.07	1	80.84	0.057
10	0.14	0	98.02	0.137
10	0.14	1	91.76	0.128
20	0.28	0	99.89	0.279
20	0.28	1	95.66	0.268
40	0.56	0	97.99	0.550
40	0.56	1	97.20	0.544
80	1.12	0	99.58	1.115
80	1.12	1	97.81	1.095
160	2.23	0	98.42	2.195
160	2.23	1	98.95	2.207

En la **Fig. 47** se puede apreciar la relación entre la actividad lacasa, la cantidad inicial de VM y la cantidad de VM degradado. Altas concentraciones (160 μM) de VM no afectaron la capacidad de degradación de la enzima, a pesar de que en los tratamientos sin cobre se observó una menor actividad lacasa. Se ha reportado que con concentraciones de VM de entre 5 y 25 mgL^{-1} ,

se logra un 91% de decoloración luego de 6 h de incubación, sin embargo, con concentraciones de 100 mgL⁻¹ o superiores la decoloración no excede el 76%, debido a la inhibición de la enzima por el exceso de VM (Maalej-Kammoun *et al.*, 2009).

Como se mencionó previamente, en presencia de Cu⁺² la decoloración se ve ligeramente afectada, coincidiendo con lo registrado por Mechichi *et al* (2005) en la decoloración de RBBR por la lacasa de *T. trogii*, y por Maalej-Kammoun *et al.* (2009) en la decoloración de VM por *Trametes* sp.

La concentración inicial del colorante y la actividad lacasa fueron los principales parámetros que determinaron el rendimiento de la decoloración en *C. unicolor* (Michniewicz *et al.*, 2008). Los títulos de lacasa también jugaron un papel importante en la decoloración enzimática por *G. lucidum*, pero el incremento en la cantidad de enzima hasta 25 UE/mL, aumentó la decoloración, sin embargo, cantidades por encima de este valor no produjeron mayores porcentajes de decoloración (Murugesan *et al.*, 2007). En el trabajo de Maalej-Kammoun *et al.* (2009) con *Trametes* sp. no se observó decoloración de VM con concentraciones de lacasa por debajo de los 0,05 UE/mL luego de 5 h de incubación, y los resultados obtenidos con 0,1 y 1 UE fueron muy similares, lo cual demuestra que un exceso de enzima no necesariamente se traduce en mayores porcentajes de decoloración.

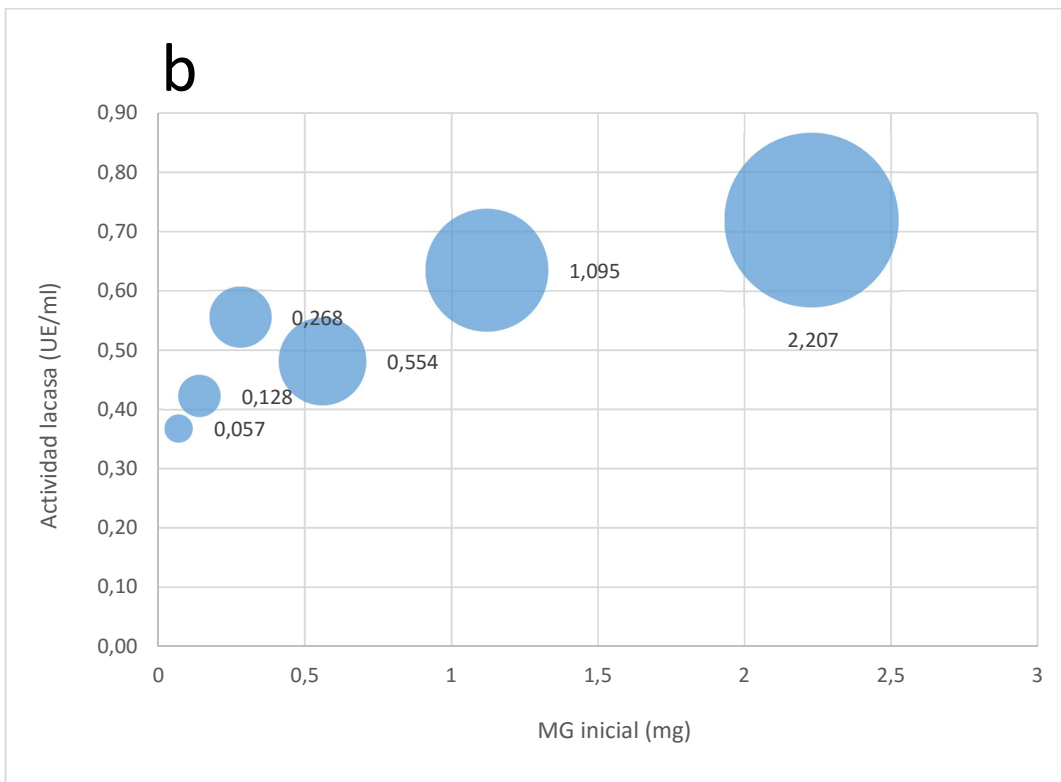
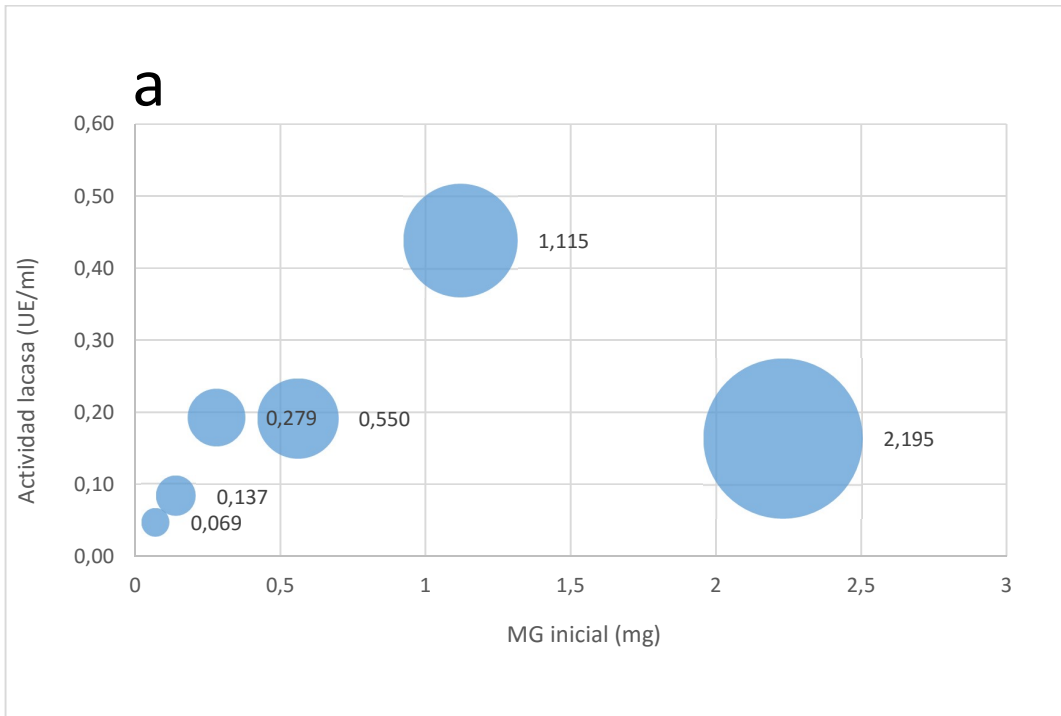


Fig. 47: Actividad lacasa en función de la cantidad inicial de VM luego de 19 días de crecimiento. VM fue adicionado al cabo de 11 días de cultivo. El tamaño de los círculos representa la cantidad de VM degradado (mg). (a) Tratamientos sin cobre, (b) Tratamientos con cobre.

4.4.3. Efecto de compuestos aromáticos, cobre y manganeso en combinación con VM sobre el crecimiento y las actividades lacasa y MnP en medio líquido

La adición de VM a los medios con compuestos aromáticos, cobre y manganeso no produjo diferencias significativas en la biomasa final alcanzada por el hongo, este colorante no afecta el crecimiento de este aislamiento en las condiciones ensayadas (**Fig. 48**). Coincidiendo con los resultados obtenidos previamente (**Fig. 31**), la adición de vainillina, el ácido ferúlico y ácido vainílico resulta en una biomasa comparable o, en este caso, superior incluso a la del control.

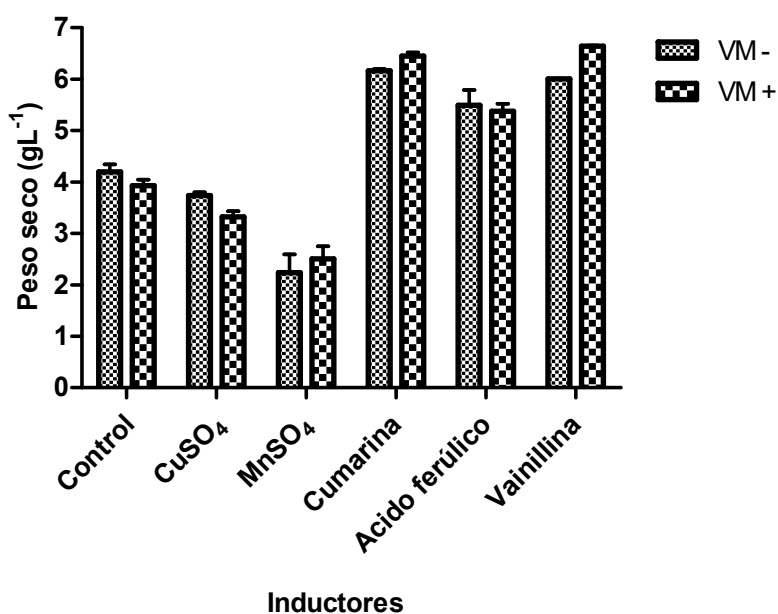


Figura 48: Efecto de VM 80 μM sobre la biomasa de *T. versicolor* en cultivos en medio GA adicionado con distintos inductores.

En la **Fig. 49** se observa la actividad lacasa específica obtenida con los distintos inductores, y su efecto al ser combinados con VM 80 μM . Se repitió el tratamiento con cobre para compararlo con el resto.

En todos los tratamientos el agregado del colorante VM produjo un aumento en la actividad lacasa. En el tratamiento control, sin la adición de otros compuestos, este aumento fue aproximadamente de un 80%. Entre los tratamientos sin VM, con el ácido ferúlico y la vainillina se alcanzaron actividades comparables a la alcanzada por el control. En los cultivos con cumarina no se encontró actividad lacasa, pero el agregado de VM estimuló su producción. Como se mostró anteriormente, el cobre y el manganeso estimulan la actividad lacasa, el agregado de VM a estos cultivos provoca un leve aumento de esta actividad. La mayor actividad específica se registró en los tratamientos con cobre y alcanzó valores de 2296 UE/gr micelio (sin VM) y 2551 UE/gr micelio (con VM). Los valores obtenidos resultan mayores que los registrados en otras cepas de *Trametes*, como, por ejemplo, *Trametes velutina* (178 UE/gr micelio), *T. versicolor* (34.2 UE/gr micelio), *T. trogii* LK13 (1000 UE/gr micelio) (Prenosilová *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2015) pero comparables a los registrados en otras especies como *Fomes fomentarius* (2481 UE/gr micelio) y *Pleurotus* sp. (1998 UE/gr micelio) (Elisashvili & Kachlishvili, 2009; Tellez-Tellez *et al.*, 2012).

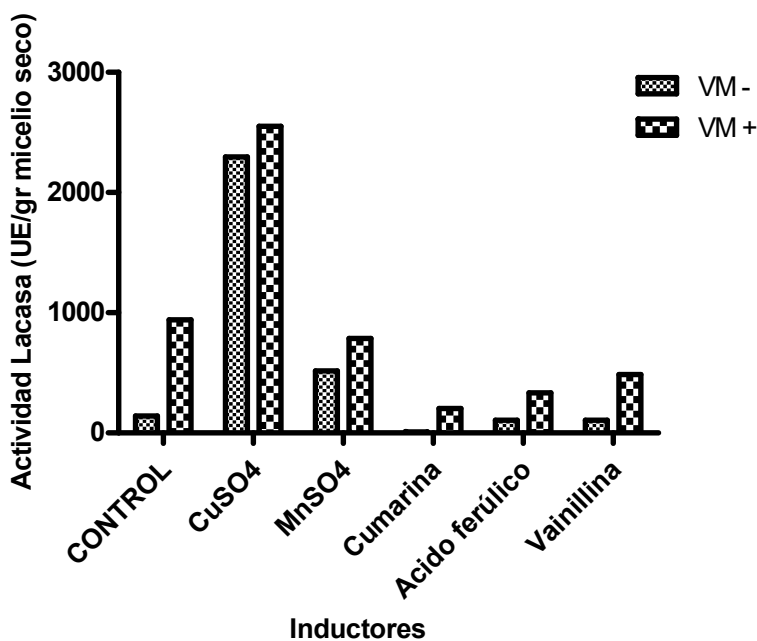


Figura 49: Efecto de VM 80 µM sobre la actividad lacasa en cultivo líquido GA adicionado con distintos inductores.

La actividad MnP varió en todos los medios en un rango de entre 0.013-0.02 UE mL⁻¹ aproximadamente, registrando su máximo valor en el tratamiento control sin VM (datos no mostrados). Sin embargo, la actividad específica expresada como UE/g peso seco de micelio en el medio con Mn resultó mayor al resto de los tratamientos (Fig. 50).

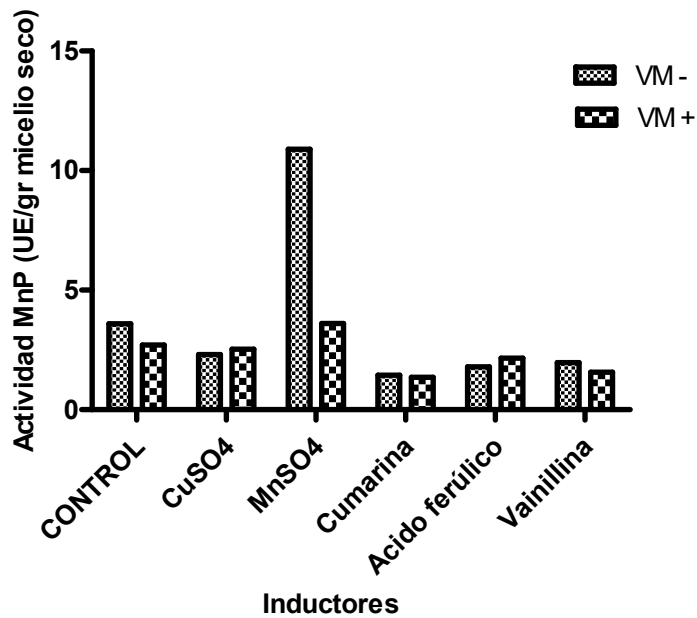


Figura 50: Efecto de VM sobre la actividad MnP en cultivos en medio GA adicionados con distintos inductores.

4.4.4. Decoloración y Detoxificación de VM

El nuevo aislamiento de *T. versicolor* BAFC 4272 es capaz de degradar en poco tiempo y eficientemente el colorante VM cuando éste es adicionado a cultivos de 11 días de crecimiento. Sin embargo, cuando se utiliza sólo el sobrenadante de estos cultivos la decoloración es más lenta y, dependiendo de la concentración del colorante y de la enzima lacasa, puede no llegar a completarse aun luego de varios días de tratamiento. Es por ello que para los

ensayos de decoloración y detoxificación con sobrenadantes de cultivos se adicionó también un mediador de la actividad lacasa.

Está demostrado que los compuestos fenólicos pueden actuar como eficientes mediadores para la actividad de la enzima lacasa (Camarero *et al.*, 2005; Moldes & Sanromán, 2006) y que la eficiencia de cada mediador en la decoloración depende del tipo de colorante a tratar (Camarero *et al.*, 2005). Entre los diferentes mediadores reportados, el HBT (1-hidroxibenzotriazol) demostró ser uno de los más efectivos, no sólo aumentando la tasa de decoloración sino también permitiendo alcanzar mayores porcentajes de decoloración de varios tipos de colorantes (Grassi *et al.*, 2011). Varios autores destacaron la eficiencia de este compuesto como mediador para la actividad lacasa (Li *et al.*, 1999a; Soares *et al.*, 2001; Rodríguez Couto *et al.*, 2005). Con la adición de HBT a sobrenadantes crudos de *T. trogii* se logró un 60% de decoloración de Azure B y más de un 90% de Xilidina y Violeta de Genciana en 1 h (Grassi *et al.*, 2011). Sin embargo, otros autores afirman que, para el caso del VM, este mediador no tiene un efecto diferente al producido por otros mediadores naturales como el ácido p-cumárico, el ácido ferúlico y la vainillina (Murugesan *et al.*, 2009).

El sistema lacasa/HBT es en general más efectivo que la lacasa sola, debido a que los radicales libres HBT generados por la acción de la lacasa sobre el HBT reducido tienen un mayor poder oxidativo (el potencial redox de la lacasa de *T. trogii* es de 760 mV a pH 7, mientras que el del radical HBT es de 1084 mV) (Garzillo *et al.*, 2001; Zille *et al.*, 2004). La tasa de decoloración de VM por *Trametes* sp. aumentó con el incremento de HBT de 1 a 5 mM, con un óptimo en 4 mM (Maalej-Kammoun *et al.*, 2009). Teniendo todo esto en cuenta, se escogió este mediador para realizar los ensayos de decoloración de VM utilizando sobrenadantes de *T. versicolor* BAFC 4272.

Como se mencionó anteriormente, el VM es un colorante altamente tóxico que inhibe el crecimiento de bacterias y hongos (Papinutti & Forchiassin, 2004). *P. chrysosporium* es un hongo causante de pudrición blanca y por lo tanto un potencial degradador de colorantes, pero a pesar de ello, su crecimiento resulta inhibido a concentraciones muy bajas de VM. Es por ello que este hongo es normalmente utilizado para testear la toxicidad remanente en las soluciones decoloradas (Murugesan *et al.*, 2009; Bibi *et al.*, 2011).

En los medios adicionados con VM 20 μM el hongo alcanzó un crecimiento aproximadamente 70% menor al del control, en los medios con VM 100 μM apenas se observó un mínimo crecimiento que se detuvo rápidamente (**Fig. 51**) y en los medios adicionados con VM 400 μM no se registró crecimiento alguno.



Figura 51: Cultivos de *P. chrysosporium* creciendo en placas con medio MEA adicionado con VM 100 μM (izquierda) y la misma concentración de VM luego de ser detoxificado (derecha).

En los medios de cultivos líquidos confeccionados con VMD (verde de malaquita decolorado) 20 μM se alcanzó un crecimiento comparable al control, mientras que en los medios con VMD 100 y 400 μM el crecimiento fue algo menor, probablemente debido a que el porcentaje de detoxificación lograda pudo ser menor, dado que se partió de una mayor concentración de VM (**Fig. 52**).



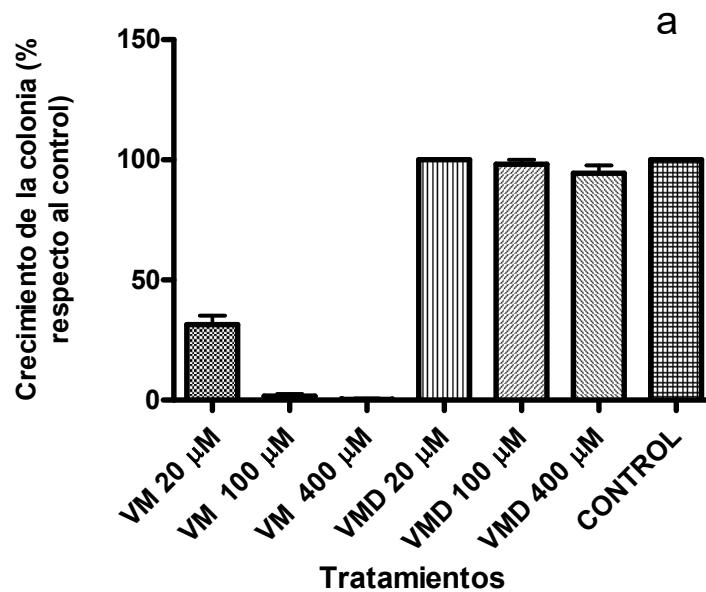
Figura 52: *P. chrysosporium* creciendo en cultivos líquidos adicionados con VM 400 μ M (izquierda) y la misma concentración de VM luego de ser decolorado (derecha).

Sin embargo, como se observa en la **Fig. 51**, *P. chrysosporium* fue capaz de crecer en los medios agarizados confeccionados con las soluciones de VM decolorado (VMD) sin mostrar diferencias significativas con respecto al control. Estos resultados demuestran claramente que la decoloración observada luego del tratamiento del colorante con el sobrenadante de cultivos de *T. versicolor* BAFC 4272 + HBT se debe a la degradación y detoxificación del VM. Resultados similares fueron obtenidos en los ensayos en medio líquido (**Fig. 52**), en este caso no se observó crecimiento en los medios adicionados con VM sin tratar en ninguna de las concentraciones utilizadas.

Al parecer los cultivos de *P. chrysosporium* en medio líquido son más sensibles a los efectos tóxicos del VM que los cultivos en medios agarizados, ya que a pesar de que ambos tipos de medios fueron confeccionados a partir de la misma solución decolorada, se registra un leve efecto negativo sobre el crecimiento en los medios líquidos con VMD. Esto también es evidente en los

medios confeccionados con VM sin tratar, ya que el hongo fue capaz de crecer en los medios agarizados adicionados con VM 20 μM pero no lo pudo hacer en los medios líquidos con la misma concentración del colorante. Este hecho también fue previamente registrado no sólo en varias cepas de *P. chrysosporium* sino también en otros hongos como *Irpex lacteus* y *Perenniporia fraxinea*. Estos aislamientos no fueron capaces de decolorar (o su porcentaje de decoloración fue muy bajo) colorantes en medio líquido, a pesar de haber demostrado alcanzar buenos porcentajes de decoloración de los mismos en medio agarizado con malta y glucosa (Choi *et al.*, 2014). Del mismo modo, cultivos de *Bjerkandera* sp. BOS55 mostraron una extensiva decoloración en medios Kirk agarizados, pero muy bajo porcentaje de decoloración en medio líquido (Swamy & Ramsay, 1999). Esto probablemente se deba a que en un medio líquido el contacto con la sustancia tóxica, en este caso el colorante, es más íntimo.

De todas maneras, volviendo a los ensayos con *T. versicolor* BAFC 4272, en ambos medios resulta marcada la diferencia entre los tratamientos con VM y VMD, lo que demuestra la efectividad del sobrenadante de este nuevo aislamiento para la decoloración y detoxificación de este colorante.



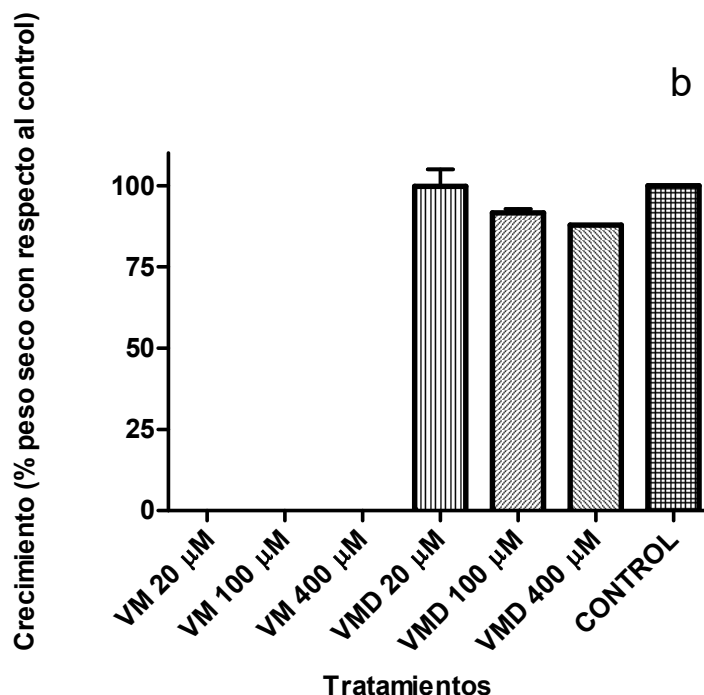


Figura 53: Prueba de toxicidad del VM decolorado utilizando *P. chrysosporium* como indicador. El crecimiento fue estimado a través del radio de crecimiento de la colonia en el caso de los cultivos en medios agarizados (a) y mediante el peso del micelio seco en el caso de cultivos en medios líquidos (b).

También se evaluó el efecto de la temperatura sobre la decoloración.

La decoloración de VM resultó afectada por la temperatura (Younes *et al.*, 2012). La actividad y estabilidad de la enzima lacasa a diferentes temperaturas se relacionó positivamente con su capacidad de decoloración (Manel *et al.*, 2009; Grassi *et al.*, 2011; Zilly *et al.*, 2011).

A 30, 40 y 50°C se alcanzó un 100% de decoloración utilizando los mayores títulos enzimáticos (entre 0.7 -1.3 UE/mL). En el tratamiento a 50°C este porcentaje se logró con bajas concentraciones de HBT (3-4 mM), mientras que en los tratamientos a 30°C se requieren concentraciones de HBT mayores (6-7 mM) y a 40°C el rango de concentraciones efectivas de HBT resultó más amplio (4-7 mM) (datos no mostrados).

Asimismo, el máximo porcentaje de detoxificación (92,15%) se logró a 40°C utilizando altos títulos enzimáticos (0.9-1.1 UE/mL) y de HBT (5-7 mM). No se obtuvieron mayores porcentajes de detoxificación al aumentar la

cantidad de enzima por encima de los 1,2 UE. En los tratamientos a 30 y 50°C se obtuvieron los menores porcentajes de detoxificación, 50% y 65% respectivamente, utilizando en ambos casos altas concentraciones enzimáticas y concentraciones medias a altas de HBT (datos no mostrados).

A 50°C la decoloración máxima (100%) se obtuvo a concentraciones bajas de HBT. Es probable que esto se deba al efecto negativo del HBT sobre la estabilidad de la enzima, el cual se hace más evidente a esta temperatura. Está comprobado que el HBT puede provocar la desestabilización de la enzima lacasa (Soares *et al.*, 2001; Moldes & Sanromán, 2006; Papinutti *et al.*, 2008). La inactivación de la enzima por el HBT se debe a radicales del mediador que atacan aminoácidos aromáticos, como la tirosina y el triptófano, en la superficie de la enzima (Li *et al.*, 1999a). Los resultados obtenidos por Maalej-Kammoun *et al.* (2009) lo confirman, cuando la lacasa de una cepa de *Trametes* sp. fue expuesta a 50°C en presencia de HBT la pérdida de actividad resultó casi lineal, aproximadamente un 20% de su actividad inicial por h, mientras que en el tratamiento sin HBT la enzima pierde un 20% de actividad solo al cabo de 4 h. El efecto es aún más evidente a 60°C, bajo estas condiciones la enzima con HBT pierde casi toda su actividad en 4 h pero en ausencia de este compuesto la actividad remanente al cabo de ese tiempo es de aproximadamente 70%.

Es deseable que el sistema funcione con bajas concentraciones de este mediador, no sólo porque es un compuesto tóxico y por su costo, sino también para mantener la estabilidad catalítica del sistema. El uso de altas concentraciones de mediadores puede promover una mayor rapidez de reacción, pero también puede causar una rápida inactivación de la enzima (Maalej-Kammoun *et al.*, 2009). Este factor es particularmente importante en aplicaciones que requieren un sistema lacasa-mediador estable.

4.5. Cocultivo de hongos causantes de pudrición blanca

4.5.1. Estimación cualitativa de la actividad lacasa

Se realizaron cocultivos de *T. versicolor* y *G. lucidum* en cajas de Petri con medios agarizados MEA y APG (**Fig. 54**). Ambas especies crecieron radialmente hasta que sus micelios se encontraron. En la línea de interacción se pudo observar un entrecruzamiento de hifas, pero ninguna de las especies avanzó sobre la otra. El crecimiento de ambas continuó cubriendo el agar hasta completar la caja.

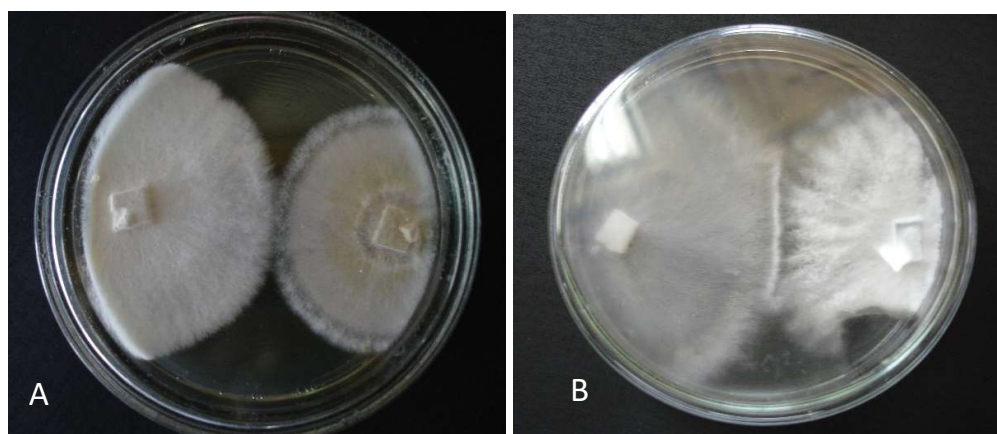


Figura 54: Interacción entre los micelios de ambos hongos en cajas de Petri con medios agarizados APG (A) y MEA (B), a los 5 días de crecimiento. A la izquierda *T. versicolor*, a la derecha *G. lucidum*.

Para revelar la actividad lacasa los cocultivos fueron incubados con DMP 5 mM registrando los cambios de coloración a los 5, 10 y 15 min. A partir de los 10 min. se observó una coloración marrón-anaranjada en la zona de contacto entre ambos micelios, indicando la presencia de actividad en los cultivos en medio MEA (**Fig. 55**). La estimación cualitativa de esta actividad fue inferida a través de la intensidad de la coloración utilizando unidades arbitrarias como se muestra en la **Tabla 9**. En los cocultivos en medio APG, al igual que en los monocultivos utilizados como control, se observó una coloración mucho más

clara y homogénea sobre las colonias, percibiéndose un leve aumento en la zona de contacto entre ambos micelios, indicando una menor actividad en ese medio.

Tabla 9: Valores arbitrarios de coloración del agar a distintas distancias de la línea de contacto entre los micelios, luego de 5, 10 y 15 min. (0) = no se observa coloración, (1) = zona de difusión marrón claro, (2) = zona de difusión marrón oscura visible sólo desde la parte de debajo de la caja, (3) = zona de difusión marrón oscura visible desde la parte superior, (4) = zona de difusión marrón muy oscuro y opaco, (5) = zona de difusión marrón intensamente oscuro, opaco, con cristales de sustrato oxidado. Los valores positivos de distancia al punto de contacto indican la dirección del inóculo de *G. lucidum* y los valores negativos de *T. versicolor*. No se observaron cambios en la coloración más allá de los 15 min.

Distancia al punto de contacto (cm)	5 min	10 min	15 min
3	1	1	1
2	0	1	2
1	0	1	1
0	0	4	5
-1	0	1	3
-2	1	1	2

-3 | 0 | 0 | 1

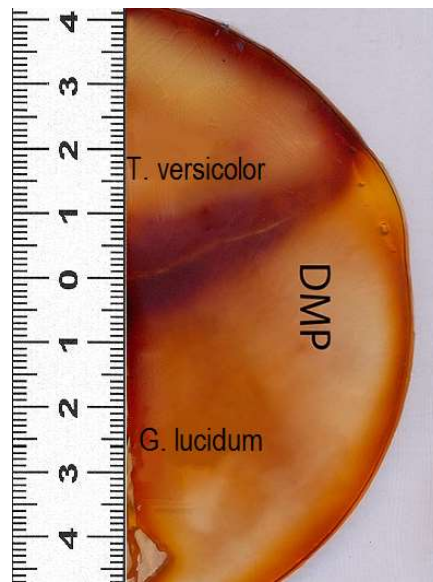


Figura 55: Placa revelada con DMP en medio MEA. La regla es orientativa de las zonas donde se tomaron las muestras para cuantificar la actividad lacasa.

4.5.2. Cuantificación de actividades enzimáticas lacasa, MnP y LiP

Para cuantificar la actividad lacasa en las cajas de Petri se tomaron muestras del medio agarizado con un sacabocado. En los cultivos en medio MEA se confirmó un aumento significativo en la zona de contacto entre ambos micelios, concordante con el patrón colorimétrico observado en las cajas de Petri (**Fig. 56**). Contrariamente, en los cultivos en medio APG no se registró aumento de la actividad lacasa en la zona de interacción de los micelios de ambas especies, sí se observó una zona con actividad lacasa en la región de crecimiento de *T. versicolor*, pero esta actividad disminuyó al aproximarse a la

zona de interacción. Lo mismo ocurrió con *G. lucidum*. Esto hace suponer que las diferentes combinaciones entre especies fúngicas y medios de cultivos deben ser considerados teniendo en cuenta los requerimientos para las actividades enzimáticas. Un incremento en la actividad lacasa no depende sólo de la especie con la que se trabaja sino también del medio de cultivo, que puede aumentar o inhibir la producción de esta enzima. En ese caso, el contraste observado entre los medios MEA y APG agarizados enfatiza la complejidad de los procesos fisiológicos involucrados en la producción de lacasa. No se registró actividad MnP o LiP en ninguno de los cultivos o cocultivos.

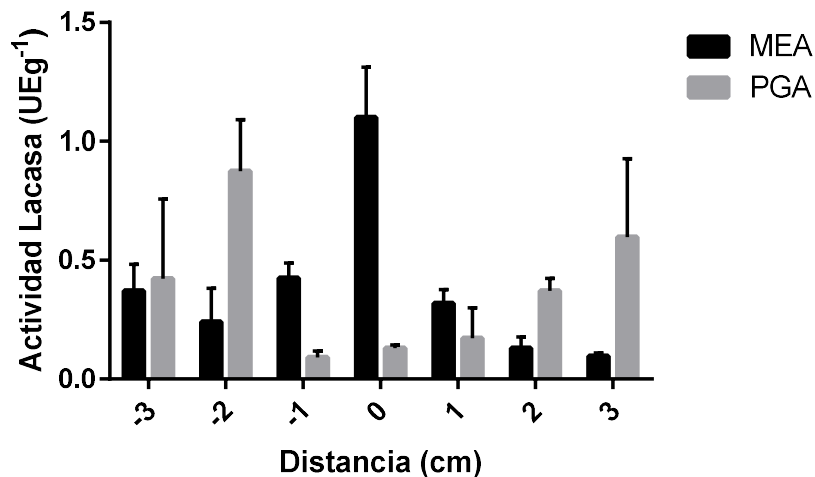


Figura 56: Actividad lacasa (UE/cm³ agar) en cajas de Petri con medios agarizados MEA y APG. El cero indica el punto de contacto entre ambos micelios, los valores positivos de distancia al punto de contacto indican la dirección del inóculo de *G. lucidum* y los valores negativos de *T. versicolor*.

Confirmando lo observado en los medios agarizados, la actividad lacasa en los cocultivos realizados en medio SSF con aserrín de álamo resultó mayor que la encontrada en los monocultivos (**Fig. 57**). En muestras tomadas luego de 14 días de cocultivo se registró un incremento de esta actividad de hasta 9 veces con respecto a los monocultivos. La actividad MnP sólo fue detectada en

monocultivos de *T. versicolor* en SSF. En ninguna de las condiciones de cocultivo ensayadas se registró actividad peroxidasa (MnP y LiP) (evaluadas luego de 28 días de incubación), sin embargo, la actividad ligninolítica puede variar a lo largo de la fermentación. Por el contrario, hay reportes previos que indican un aumento en la producción de MnP por cocultivos de *Trametes* sp. con *Chaetomium* sp. (Chi *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2011).

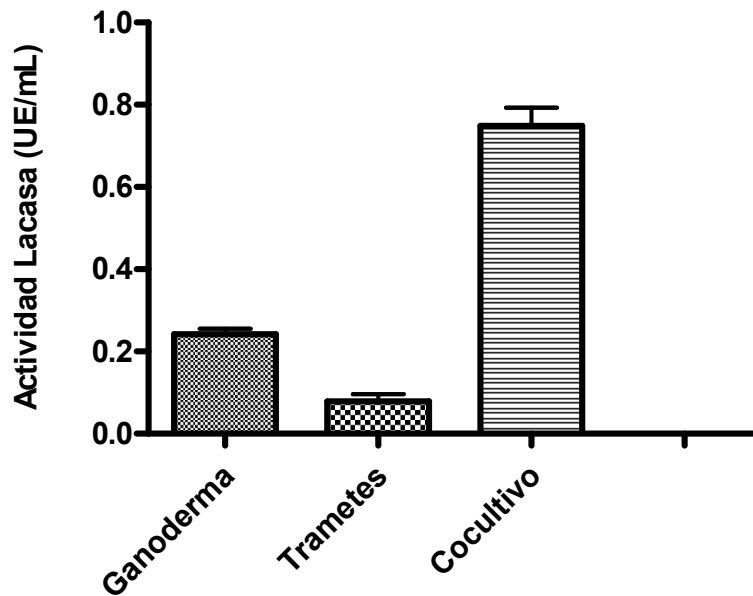


Figura 57: Actividad lacasa en medio de cultivo SSF 14 días después del procesamiento y mezcla de los cultivos.

La naturaleza del aumento de actividad lacasa debido a las condiciones de cocultivo no se encuentra aun totalmente dilucidada. En el trabajo de Savoie *et al.*, (1998) donde se realizaron cocultivos de *L. edodes* con *Trichoderma* sp., se hizo la experiencia de retirar el micelio de *L. edodes* antes de la adición de *Trichoderma* sp. y se obtuvieron patrones isoenzimáticos idénticos a los obtenidos en presencia del micelio activo de *L. edodes*, lo que los llevó a concluir que este nuevo patrón isoenzimático no puede ser atribuido a la

inducción de una nueva proteína ni a la liberación de una lacasa intracelular, sino que probablemente se deba a que *Trichoderma* sp. altera el patrón isoenzimático a través de proteasas que no afectan la actividad de la enzima.

En este sistema en particular (*T. versicolor*/*G. lucidum*) y en las condiciones en las que se realizaron los experimentos, la interacción no podría atribuirse a factores difusibles, ya que no se registra un aumento de actividad lacasa antes del contacto físico entre las hifas de ambos hongos. En los cocultivos en medio líquido no se registró incremento de la actividad lacasa con respecto a los monocultivos, probablemente debido a que ambas especies crecieron en forma de pellets, formando colonias independientes sin contacto entre sus micelios. La coinoculación de dos especies de *Pleurotus* sin realizar un proceso de mezclado posterior luego de la colonización no mostró un incremento en la actividad lacasa (Papinutti & Forchiassin, 2004).

Más allá de cuál sea el mecanismo subyacente, en la mayoría de los trabajos consultados se encontró que en general los cocultivos interespecíficos de hongos producen un incremento de actividad lacasa con respecto a los monocultivos (Tsujiyama & Minami, 2005; Velázquez-Cedeño *et al.*, 2007; Hiscox *et al.*, 2010; Asgher *et al.*, 2012a; Dong *et al.*, 2012), aunque como ya se mencionó, este incremento siempre depende del sistema de hongos utilizado y de las condiciones de cultivo (Tsujiyama & Minami, 2005), esto quedó demostrado con los distintos resultados obtenidos en medio APG agarizado y en medio MEA, a pesar de tratarse del mismo sistema de hongos. En el trabajo de Dong *et al.* (2012) se demostró que el cocultivo de *P. radiata* con *Dichomitus squalens* o *C. subvermispora* produjo un marcado aumento en la actividad lacasa, pero en el cultivo dual de *C. subvermispora* con *D. squalens* la actividad lacasa encontrada fue menor a la de los monocultivos, lo cual indica algún tipo de inhibición al cocultivar estas cepas.

El sistema *T. versicolor*/*G. lucidum* produjo un patrón isoenzimático diferente al encontrado en los monocultivos. El revelado con DMP del gel SDS-PAGE evidenció la presencia de al menos una nueva isoenzima, con un peso molecular menor a las halladas en los monocultivos (**Fig. 58**). La inducción de diferentes isoenzimas de lacasa por efecto del cocultivo de hongos fue reportada anteriormente en otros sistemas como *P. radiata*/*D. squalens* (Dong

et al., 2012) y *P. ostreatus/T. longibrachiatum* (Velazquez-Cedeño, 2007). En ambos trabajos estas nuevas isoformas halladas en los cocultivos registraron un peso molecular menor al de las isoenzimas propias de cada monocultivo, lo cual coincide plenamente con los resultados hallados en este trabajo. Velazquez-Cedeño *et al* (2007) también resaltan en su trabajo en que estas isoenzimas tienen diferentes propiedades bioquímicas y debido a ello no todas pueden ser reveladas con el mismo reactivo, por ejemplo, encuentran tres isoformas revelando el gel con 4-cloro-1-naftol y sólo una al revelarlo con *p*-fenilendiamina, además, la aparición de estas isoformas está ligada al tipo de sustrato en el que fue realizado el cocultivo. En el presente trabajo se utilizó sólo un medio de cultivo SSF y el gel de poliacrilamida fue revelado únicamente con DMP, con lo cual el patrón de isoenzimas hallado es propio del sistema utilizado y cabe la posibilidad de que no todas las isoenzimas producidas hayan sido reveladas. Existen otros trabajos en los que no se registraron diferencias entre el patrón isoenzimático entre los monocultivos y el cocultivo (He *et al.*, 2010).

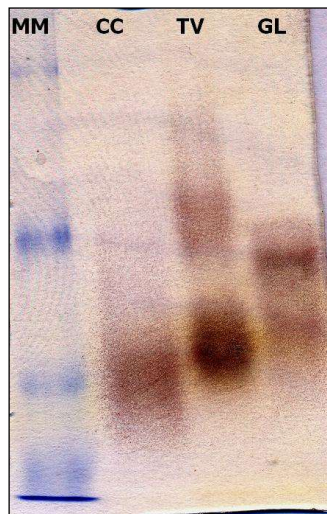


Figura 58: Electroforesis en gel de poliacrilamida. MM: marcador molecular, CC: cocultivo, TV: *T. versicolor*, GL: *G. lucidum*.

La banda de menor movilidad electroforética hallada en los cultivos duales parece corresponder a una isoenzima laccasa inducible por compuestos aromáticos hallada en un trabajo previo con la misma cepa de *G. lucidum* (Kuhar & Papinutti, 2014). Esto podría sugerir una similitud entre la inducción a través de la técnica de cocultivo y la inducción con compuestos aromáticos, pero deberían ser llevados a cabo análisis adicionales para establecer la equivalencia entre estas bandas.

4.5.3. Decoloración y detoxificación de VM

Tanto el extracto acuoso de los monocultivos, como los cocultivos crecidos en medio SSF fueron capaces de decolorar significativamente soluciones de MG 50 μM (**Fig. 61**). *T. versicolor* alcanzó un 80% de decoloración con respecto a la solución original en 13 h y *G. lucidum* en 16, mientras que el cocultivo logró el mismo nivel de decoloración en tan solo 3 h. El tiempo de vida media calculado por el cocultivo resultó mucho menor que el de los monocultivos, demostrando el potencial del cocultivo para aplicaciones en biorremediación (**Fig. 61**).

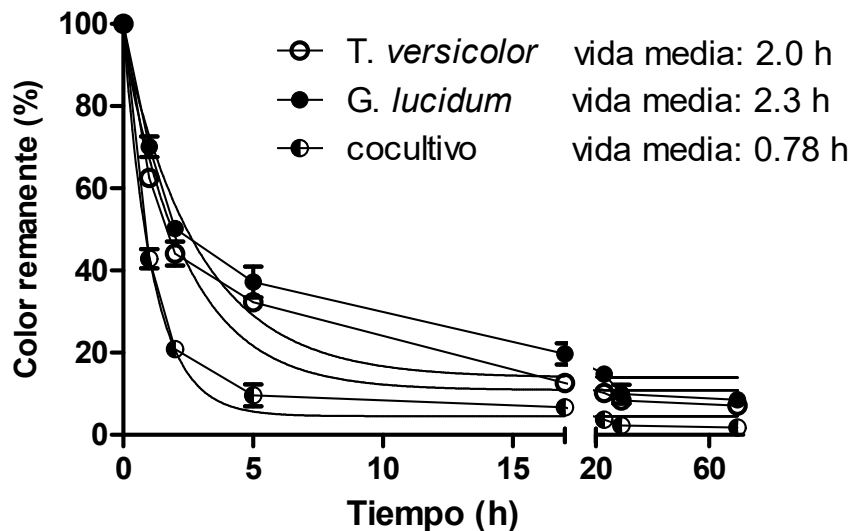


Figura 61: Decoloración de una solución de VM 50 µM tratada con medios SSF donde crecieron los monocultivos y el cocultivo.

No se registraron cantidades significativas de VM adsorbidas al sustrato.

Se evaluó la toxicidad de las muestras tratadas mediante un bioensayo con *P. chrysosporium*, altamente sensible al colorante VM. La cepa utilizada de *P. chrysosporium* fue capaz de crecer en medios agarizados formulados con la solución de VM decolorada por el cocultivo, alcanzando un diámetro de 1.4 ± 0.22 cm al cabo de 5 días a 37°C. Sin embargo, su crecimiento en los medios agarizados formulados con soluciones de VM tratadas con muestras de los monocultivos fue mucho menor, limitándose a unos pocos milímetros de micelio emergiendo del inóculo (*G. lucidum* 3 ± 0.9 mm, *T. versicolor* 2 ± 0.4 mm). No se observó crecimiento en medios formulados con la solución de VM sin tratar.

Aunque existen muchos trabajos en los cuales se demostró un aumento de la actividad lacasa como consecuencia del cocultivo de diferentes especies fúngicas (Li *et al.*, 1999; Litvintseva & Henson, 2002; Baldrian, 2004; Chi *et al.*, 2007), pocos están orientados a su aplicación en la decoloración y detoxificación de colorantes. La velocidad de decoloración del VM en los cocultivos resultó hasta 3 veces más rápida comparada con los monocultivos,

esto podría atribuirse al incremento en la actividad lacasa u a otra actividad enzimática producida durante la interacción fúngica no determinada en la investigación realizada. Dado que el VM puede ser fácilmente transformado en su forma leuco-VM (no coloreada) manteniendo su toxicidad (Srivastava *et al.*, 2004), es necesario verificar que la decoloración sea acompañada por una detoxificación. El sistema *T. versicolor*/*G. lucidum* fue capaz de lograr una degradación completa del VM, reduciendo exitosamente su toxicidad.

4.5.4. Análisis de espectros de absorción

Como se ve en la **Fig. 61** todos los tratamientos tuvieron la capacidad de degradar en mayor o menor medida el colorante VM. Tanto con *T. versicolor* como con *G. lucidum* se logró una notable reducción de absorbancia en los picos característicos del VM (445 y 621 nm). Por el contrario, en el espectro de absorción obtenido con la solución decolorada con el cocultivo no hay evidencia de estos picos, lo que sugiere una degradación más completa del colorante.

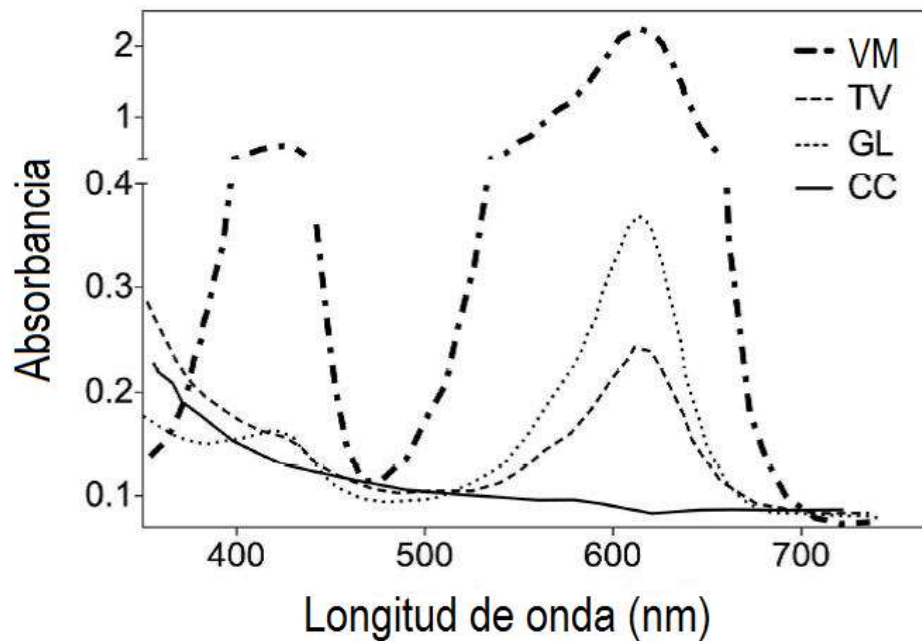


Figura 61: Espectros de absorción de una solución de VM 50 μM y de la misma solución luego de ser tratada con cultivos SSF de *G. lucidum* (GL), *T. versicolor* (TV) y un cocultivo de ambas especies (CC).

4.5.5. Composición del medio de cultivo ya utilizado

El análisis de la composición química del medio SSF con aserrín de álamo, en donde crecieron los cultivos de ambas especies y los cocultivos, mostró que los tres principales componentes de la madera (celulosa, hemicelulosa y lignina) fueron degradados. La **Fig. 62** muestra que ni la delignificación ni la pérdida de peso resultaron influenciados por el aumento de actividad lacasa registrado en los cocultivos. La mayor pérdida de peso seco (42%) fue causada por *T. versicolor*, mientras que no se observaron diferencias significativas entre los cultivos de *G. lucidum* y los cocultivos. Resultados similares fueron registrados en la pérdida de lignina Klason. Por lo tanto, en este trabajo, la alta actividad lacasa no pudo ser correlacionada con la pérdida de peso seco de la madera. Similares resultados fueron observados en cocultivos de otros hongos causantes de

putridi3n blanca, donde los resultados obtenidos con respecto a las enzimas lignocelulol3ficas no pudieron ser directamente asociados con la degradaci3n de lignina (Chi *et al.*, 2007; Levin *et al.*, 2007). Sin embargo, el 3ndice de selectividad (p3rdida de lignina/p3rdida de celulosa) en los cocultivos fue marcadamente mayor que en los monocultivos, alcanzando hasta el doble de su valor. Por otro lado, teniendo en cuenta que las lacasas est3n involucradas en diferentes procesos fisiol3gicos, no s3lo en la degradaci3n de lignina, tales como pigmentaci3n de los conidios en *A. nidulans* (Kurtz & Champe, 1982), procesos fitopatog3nicos en *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Edens *et al.*, 1999) y fructificaci3n en *Lentinus tigrinus* (Lechner & Papinutti, 2006), la isoenzima lacasa producida como resultado de esta interacci3n f3ngica interespec3fica podr3a participar en alguno de estos procesos y no en la degradaci3n de lignina.

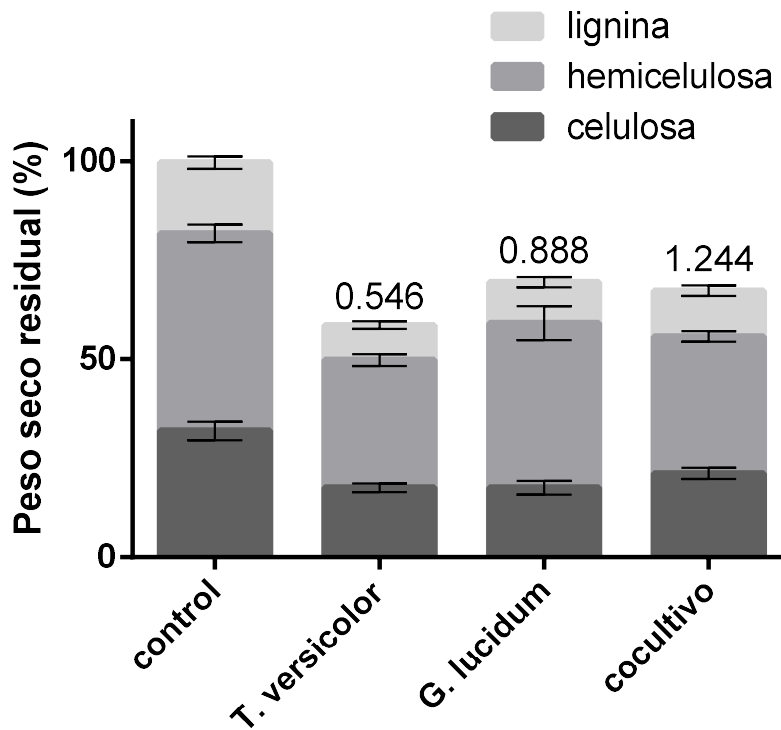


Figura 62: Composici3n qu3mica del control (sin inocular) y los cultivos en aserr3n biotratados. Las fracciones correspondientes a hemicelulosa, lignina y celulosa se muestran como proporci3n con respecto a la p3rdida de peso seco total. Los n3meros ubicados arriba de las columnas corresponden al 3ndice de selectividad (calculado

como la relación pérdida de lignina/pérdida de celulosa). Las barras representan la desviación estándar de la media calculada a partir de tres réplicas independientes.

La optimización de la producción de enzimas lignocelulolíticas en hongos de pudrición blanca mediante la utilización de cobre, manganeso u otros iones metálicos ha sido estudiada exhaustivamente (Papinutti & Forchiassin, 2006; Janusz *et al.*, 2013), pero a pesar de su gran eficacia, el uso de metales y compuestos xenobioticos como inductores en procesos de biorremediación resulta inadecuado, debido a la contaminación generada. La inducción enzimática a través de la utilización de técnicas de cocultivo es una alternativa más limpia y económica, sumado a que la degradación de VM es más eficiente. Todo esto promueve la necesidad de seguir buscando sistemas de hongos que optimicen los resultados buscados, con el objetivo de utilizarlos en ensayos de biorremediación a gran escala y en la producción de lacasa para usos industriales.

4.6. Degradación de madera de álamo (*Populus* sp.) y pino (*Pinus* sp.)

4.6.1. Cortes anatómicos y pérdida de peso seco

Bloques de maderas de álamo y pino fueron tratados durante 30 días con *T. versicolor* BAFC 4272 en medio SSF con aserrín de álamo y semillas de avena, hidratados con agua o con una solución de cobre 10 mM. Al momento de retirar los bloques de madera estos presentaban un aspecto quebradizo y esponjoso al tacto, aunque aquellos tratados con cobre resultaron más duros y con una coloración más oscura. Se calculó la pérdida de peso de las maderas para verificar su degradación (**Fig. 63**). Las maderas de álamo y pino perdieron entre un 30 y un 10% de su peso original, respectivamente. Resultados similares fueron hallados por Aguiar *et al.* (2014) en maderas de pino atacadas por otra cepa de *T. versicolor*, en este caso la madera perdió un 8% de su peso luego de 4 semanas de tratamiento. Otros autores afirman que *T. versicolor* se

comporta diferente dependiendo del tipo de madera que coloniza, degradando más rápidamente maderas duras que blandas (Enoki *et al.*, 1988), sin embargo, en este caso tanto pino como álamo son maderas blandas, por lo que los diferentes porcentajes de degradación se deban probablemente a otros factores como la composición de la lignina. *T. versicolor* degrada más fácilmente la madera de latifoliadas (como el álamo), debido a la composición de la lignina en su madera (Eaton & Hale, 1993). La lignina de tipo siringilo es degradada más fácilmente que la del tipo guayacilo por los hongos de pudrición blanca (Eriksson *et al.*, 1980). Esto explica la escasa presencia de este tipo de hongos sobre coníferas, dado que poseen maderas con mayor contenido de lignina tipo guayacilo (Highley, 1983).

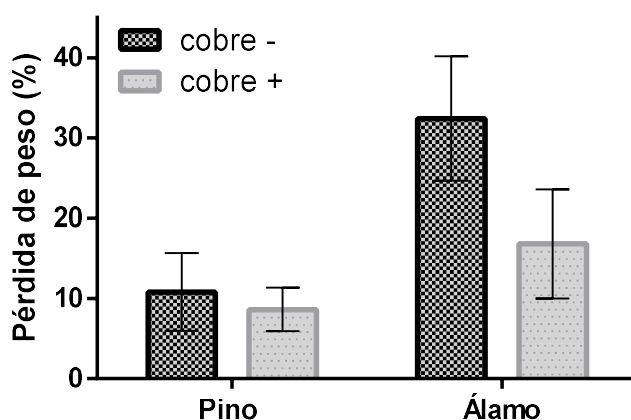


Figura 63: Porcentajes de pérdida de peso seco de las maderas tratadas con *T. versicolor* BAFC 4272 en medio SSF luego de 30 días de cultivo.

Los hongos de pudrición blanca pueden presentar dos patrones de degradación de la madera: simultáneo, atacando todos los componentes de la madera al mismo tiempo, o selectivo, degradando la lignina en primera instancia. Los motivos que ocasionan estos diferentes patrones de ataque a las paredes celulares aún no han sido esclarecidos. Debido a que la mayoría de los hongos que degradan selectivamente lignina son capaces también de causar degradación simultánea, el sustrato o factores ambientales que regulan las actividades celulolítica y hemicelulolítica serían responsables de la selectividad observada hacia la lignina (Blanchette, 1995; Reid, 1995; Martínez

et al., 2005). Diversos factores influyen sobre la síntesis de celulasas, por ejemplo, la presencia de celobiosa, glucosa y otros azúcares de la madera, fenoles y proteasas (Eriksson *et al.*, 1990). El uso de diferentes cepas o condiciones de cultivo, puede cambiar la preferencia de ciertos hongos por la lignina (Blanchette, 1991). El patrón de degradación por lo tanto no es característico de una especie, *T. trogii* BAFC 463 en madera de álamo presenta los dos patrones a la vez (Levin & Castro, 1998). En este caso se observó un patrón de degradación simultáneo en todos los tratamientos excepto en el caso de la madera de pino tratada con cobre. En la **Fig. 64** se pueden observar cortes realizados a mano alzada de los bloques de madera de álamo. En los tratamientos sin cobre se observó una estructura esponjosa debida al adelgazamiento de las paredes, lo cual se ve reflejado en el porcentaje de pérdida de peso registrado en este tratamiento. En los bloques tratados con cobre no se observó adelgazamiento de paredes, aunque sí zonas de rotura, probablemente generadas al realizar el corte, pero que no fueron observadas en los controles, lo que delataría una pérdida de resistencia de la madera. En la **Fig. 65** se observan los cortes correspondientes a la madera de pino. En este caso se observó degradación de la laminilla media en los tratamientos con cobre, congruente con un patrón de degradación selectiva. Sin embargo, en los tratamientos sin cobre el patrón parece ser de degradación simultánea, ya que se observa toda la pared celular deteriorada incluida la zona correspondiente a la pared secundaria.

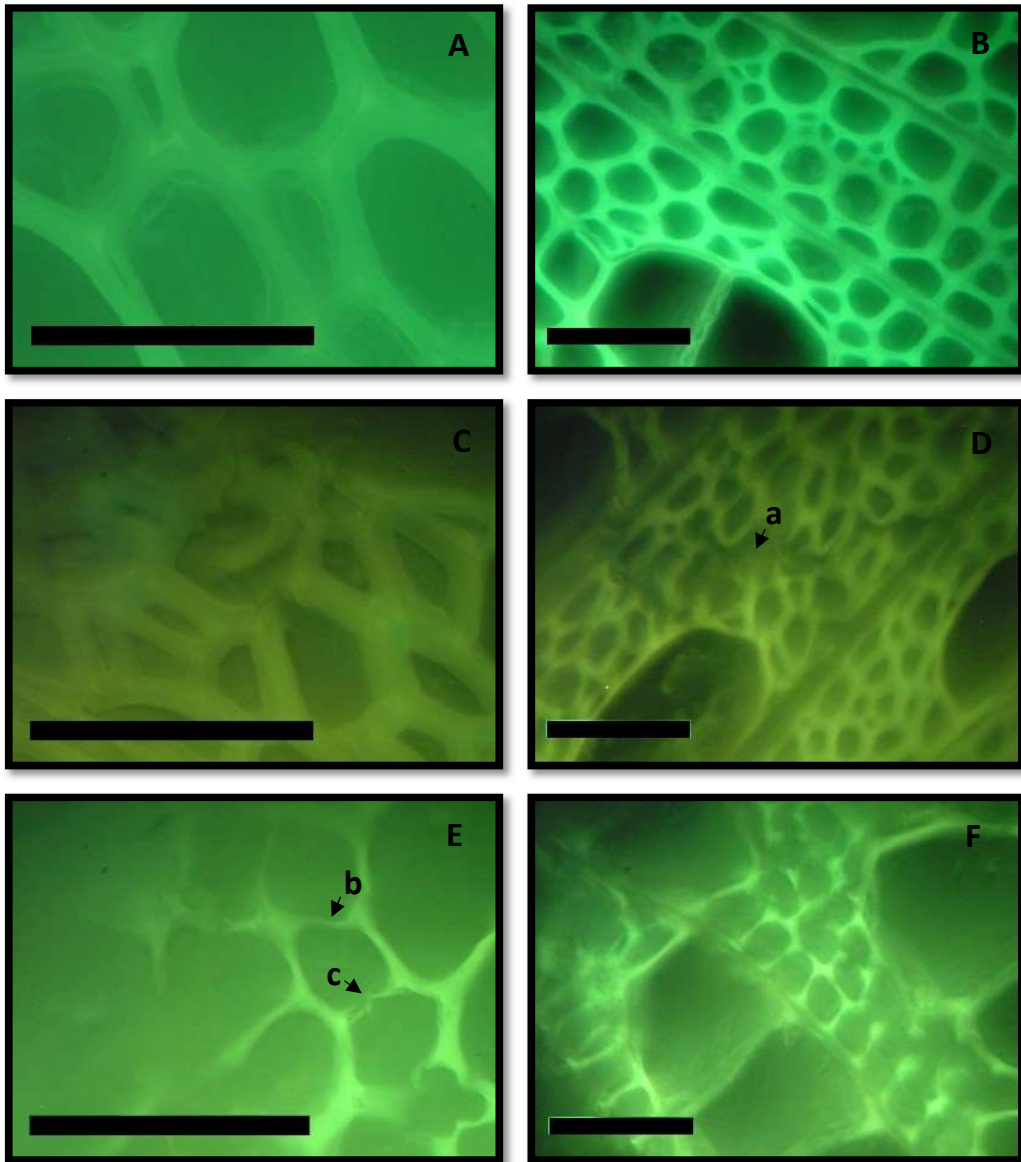


Figura 64. Pudrición blanca causada por *T. versicolor* BAFC 4272 en madera de álamo. A, B: controles (madera no atacada); C, D: tratamientos con cobre; E,F: tratamientos sin cobre, (a) zona de roturas, (b)(c) adelgazamiento de paredes. Obsérvese la disminución en la fluorescencia natural de la lignina. La barra representa 50 µm.

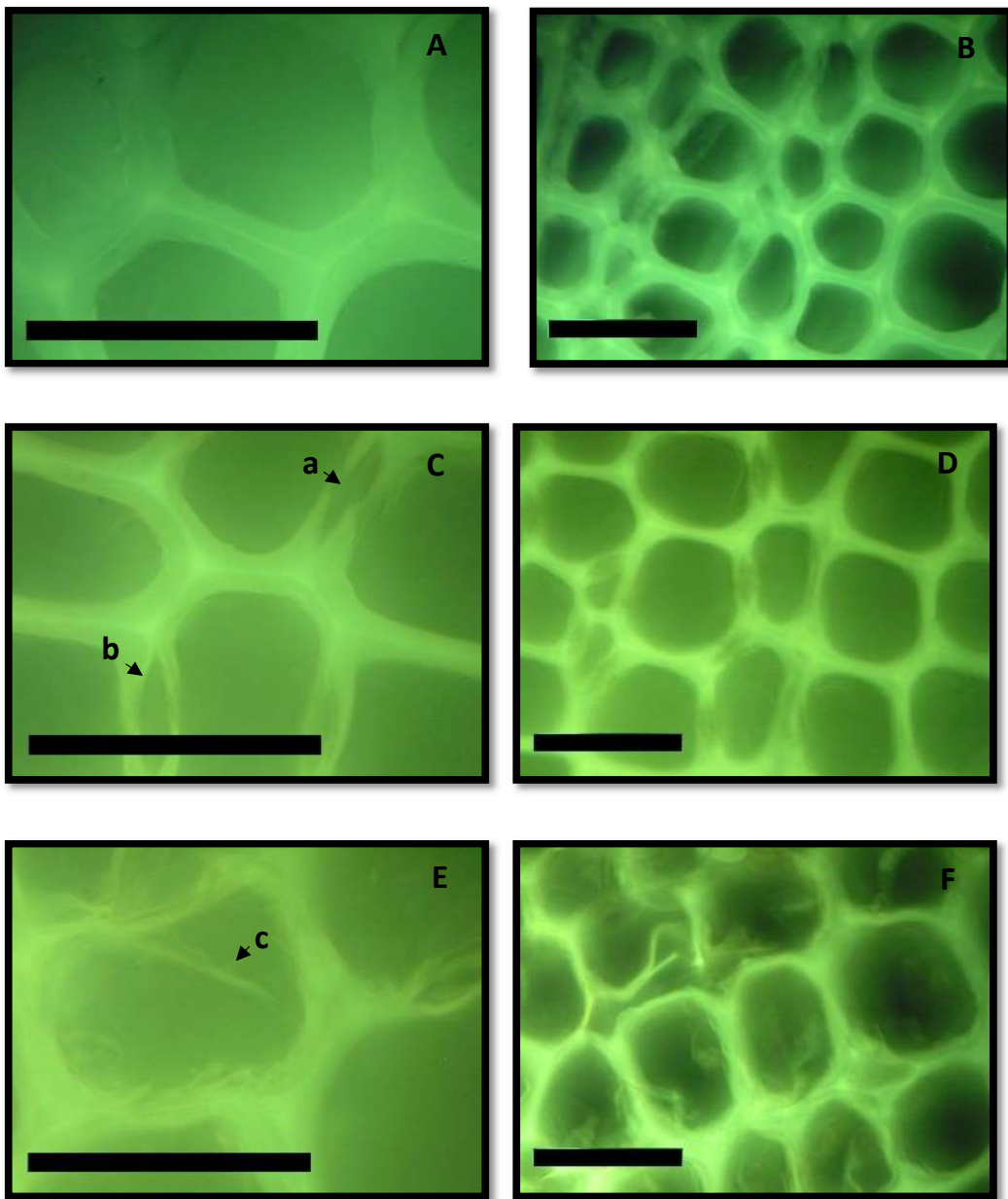


Figura 65. Pudrición blanca causada por *T. versicolor* BAFC 4272 en madera de pino. A, B: controles (madera no atacada); C, D: tratamientos con cobre; E, F: tratamientos sin cobre, (a)(b) degradación de la laminilla media, (c) degradación de pared secundaria. Obsérvese la disminución en la fluorescencia natural de la lignina.

4.6.2. Actividad lacasa

Los cultivos hidratados con la solución de cobre registraron mayores valores de actividad lacasa (hasta 30 veces en pino y 11 veces en álamo), con respecto a los hidratados con agua (**Fig. 66**). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, en estos últimos tratamientos, en álamo se registraron los mayores porcentajes de pérdida de peso y en las microfotografías se observan las paredes celulares más adelgazadas. Esta degradación podría deberse a otras enzimas lignocelulolíticas no cuantificadas en el ensayo: tanto a la acción de otras enzimas ligninolíticas que facilitan el acceso a los polisacáridos de la madera, como a una mayor producción de enzimas involucradas en la degradación de los otros componentes de la madera, en particular celulasas y hemicelulasas. Existen trabajos previos en los que no detectaron niveles significativos de actividad lacasa en los extractos tomados durante la degradación de madera de pino, a pesar de observar una degradación significativa de la madera (Aguiar *et al.*, 2014). En otros casos, esta enzima fue detectada únicamente durante la primera semana de tratamiento y no en semanas posteriores (Aguiar & Ferraz, 2008). Existen trabajos que citan a la enzima MnP como la única detectada en niveles significativos durante la degradación de maderas por *C. subvermispora* (Souza-Cruz *et al.*, 2004; Aguiar & Ferraz, 2008). Mäkelä *et al.* (2002) detectaron únicamente MnP durante la degradación de madera de *Picea abies*, mientras que la presencia de lacasa fue detectada sólo luego de 30 días de degradación. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el método de extracción puede no haber garantizado una eficiente recuperación de todas las enzimas retenidas en la madera. En trabajos previos altos niveles de producción enzimática lignocelulolítica no se correlacionaron con mayores pérdidas de peso y degradación de cada uno de los componentes de la madera (Levin *et al.*, 2007, Fackler *et al.*, 2006). *T. versicolor* es capaz de producir los tres tipos principales de enzimas ligninolíticas (lacasas, MnP y LiP) (Rogalski *et al.*, 1991) pero la secreción de cada una de ellas depende mucho del medio de cultivo. Creciendo en madera de *Eucalyptus grandis* con malta como cosustrato produjo principalmente lacasa (Machuca & Ferraz, 2001), pero durante la biodegradación de madera de *Fagus crenata* produjo los tres tipos de enzimas

ligninolíticas (Tanaka *et al.*, 1999). En varios trabajos se menciona que la producción de enzima lacasa por *T. versicolor* creciendo sobre sustratos lignocelulolíticos resultó comúnmente estimulada por la presencia de cosustratos (Lekonougou *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2013). La mayor degradación de la madera en los cultivos con menor actividad lacasa también puede deberse a otros factores; Tanaka *et al.* (1999) demostraron la generación de radicales OH durante la biodegradación de maderas por *T. versicolor*, causada por un glicopéptido que reduce al Fe³⁺ promoviendo la degradación vía reacción de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{-OH} + \bullet\text{OH}$). Coincidiendo con esto, Ma *et al.* (2011) reportaron una degradación significativa de lignina en cultivos tratados con *I. lacteus* aun cuando no se registró actividad lacasa en ellos, sugiriendo que radicales OH u otros oxidantes no identificados podrían ser los responsables. La actividad reductora de Fe⁺³ y la subsecuente producción de radicales OH y u otras especies reactivas de oxígeno pueden contribuir a la degradación de lignina por *T. versicolor* e *I. lacteus* (Aguar *et al.*, 2014).

La actividad lacasa resultó mayor en los tratamientos con pino probablemente debido a las sustancias presentes en esta madera, como por ejemplo ceras y resinas, las cuales contienen diversos compuestos aromáticos como terpenos, estilbenos y flavonoides, capaces de actuar como inductores. Aunque no se observaron diferencias significativas en la pérdida de peso de las maderas tratadas con y sin cobre, sí se observaron diferencias en el patrón de degradación, ya que en los tratamientos con cobre que estimularon la producción de lacasa, se detectó un patrón de degradación selectiva de lignina.

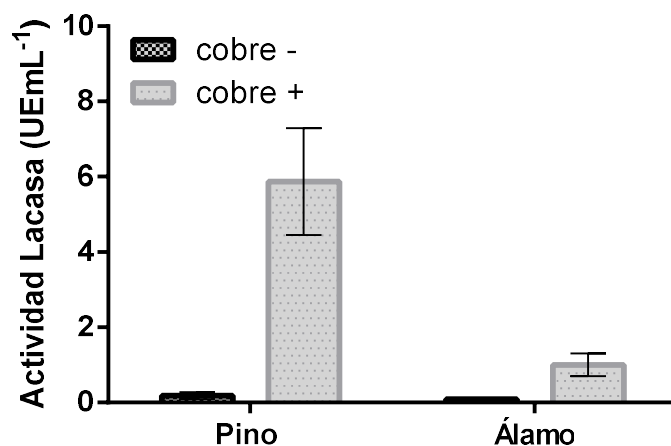


Figura 66: Porcentajes de actividad lacasa registrada en los extractos acuosos de los cultivos SSF al cabo de 30 días.

Otras cepas de *T. versicolor* ya han demostrado su capacidad de delignificar selectivamente y han sido aplicadas a procesos de biopulpado. Bajo condiciones de SSF *T. versicolor* delignificó selectivamente troncos de palma mejorando las características de las pulpas preparadas (Singh *et al.*, 2013). El tratamiento de maderas de *P. abies* con *T. versicolor*, seguido de un proceso de pulpado termomecánico, no afectó las propiedades mecánicas de las hojas de prueba y produjo efluentes menos tóxicos, mejorando su biodegradabilidad (van Beeket *al.*, 2007). *T. versicolor* BAFC 4272 es capaz de delignificar selectivamente bajo ciertas condiciones y podría también aplicarse en procesos de biopulpado.

4.7. Ensayos con CCA

Se ensayó el efecto del preservante de maderas CCA sobre la capacidad de degradación y la actividad lacasa de *T. versicolor* BAFC 4272. En principio se realizó un ensayo en placa con medio MEA agarizado adicionado con el preservante a fin de estimar la concentración máxima tolerable por el microorganismo. *T. versicolor* BAFC 4272 creció normalmente a una concentración de 0.2% de CCA, pero fue incapaz de hacerlo al 0.6% (**Fig. 67**).

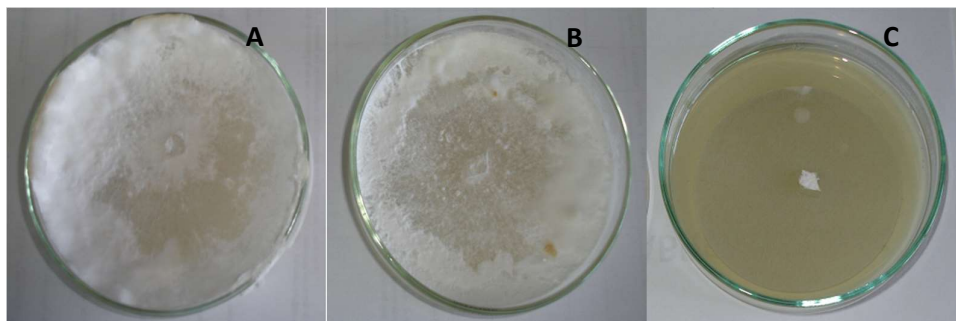


Figura 67. *T. versicolor* creciendo en medio MEA adicionado con CCA. A: Control, B: CCA 0.2%, C: CCA 0.6%.

Para el ensayo en medio SSF se utilizó aserrín de pino humedecido con soluciones de CCA a distintas concentraciones (0.1, 0.5, 1 y 3%). Se observaron colonias del hongo creciendo en todos los tratamientos, incluso en la máxima concentración ensayada (3%) (**Fig. 68**).

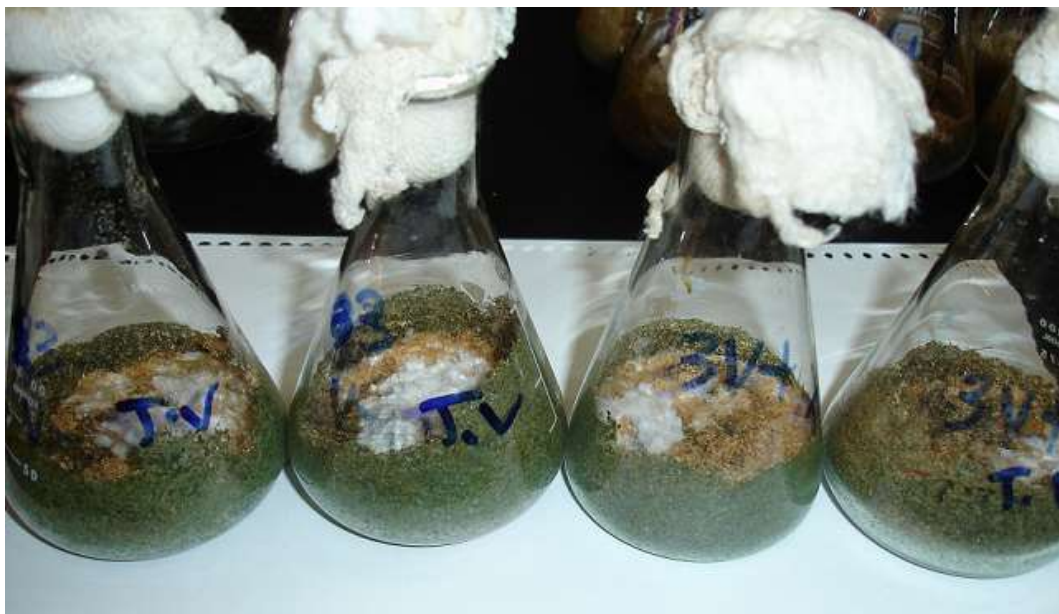


Figura 68. Cultivos de *T. versicolor* creciendo en medio SSF con aserrín adicionado con una solución de CCA al 3%.

Sin embargo, la pérdida de peso del aserrín inoculado con *T. versicolor* disminuyó a medida que aumentó la concentración de CCA, siendo esta pérdida del 28, 5, 2.7 y 1% para el control, 0.1, 0.5 y 1% de CCA respectivamente, y no registrándose pérdida de peso alguna en el tratamiento al 3% (**Fig. 69**). Lo que denota que a pesar de observarse cierta colonización fúngica superficial aún a las mayores concentraciones de CCA probadas, la invasión y degradación del sustrato no fue igualmente eficiente en todas las concentraciones evaluadas, el agregado de CCA afecta la capacidad de degradación del sustrato por parte del hongo y la inhibe completamente a la máxima concentración testeada.

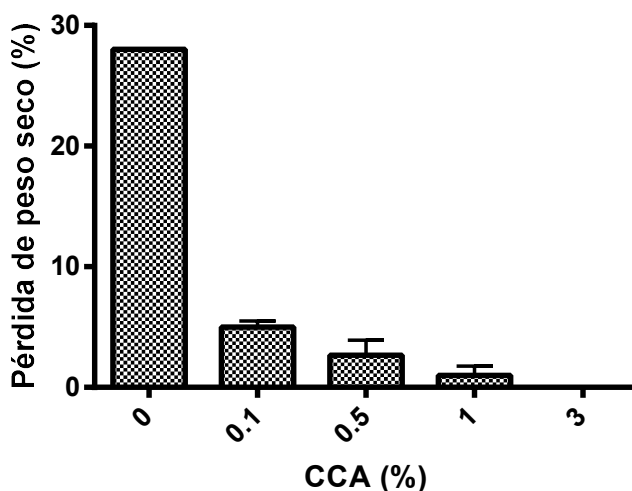


Figura 69: Porcentajes de pérdida de peso seco del aserrín inoculado con *T. versicolor* en los tratamientos con CCA al cabo de 3 meses de incubación.

Interesantemente, en este último tratamiento se obtuvo la mayor actividad lacasa (**Fig. 70**), concordando con resultados obtenidos anteriormente en los ensayos con bloques de madera de pino y álamo, en donde los tratamientos con cobre registraron mayores títulos de actividad lacasa a pesar de no registrar grandes pérdidas de peso. Otras cepas evaluadas de *T. versicolor* han mostrado una significativa reducción en su crecimiento al ser expuestas a concentraciones de CCA del 1% (Guillén *et al.*, 2009). En el

trabajo de Sierra-Alvarez (2007) se registraron pérdidas de peso de hasta un 21% en maderas tratadas con un preservante de maderas a base de cobre y cromo a una concentración del 4.4%, aunque en este caso el ensayo se realizó con hongos causantes de pudrición marrón. Según el trabajo de Guillen *et al.* (2009) existen variaciones no sólo interespecíficas sino también intraespecíficas en cuanto a la tolerancia a preservantes de maderas. Según sus resultados, algunas cepas de *T. versicolor*, *Ganoderma australe* y *Gloeophyllum trabeum* mostraron una importante inhibición en su crecimiento (80-100%) ante diferentes concentraciones de CCA, pero otras cepas de estos mismos hongos resultaron altamente tolerantes. Entre las especies más tolerantes a este preservante podemos citar a *Wolfiporia cocos*, sin embargo, esta especie resultó extremadamente sensible a otros preservantes de madera a base de boro y silicio (BS) (Guillén *et al.*, 2009). *T. versicolor* fue descrito como una especie sensible al cobre (Pohleven *et al.*, 2002; Humar & Pohleven, 2005), sin embargo, la cepa de *T. versicolor* 88 (Guillen *et al.*, 2009) resultó altamente tolerante a este metal y una de las menos sensibles al preservante CCA.

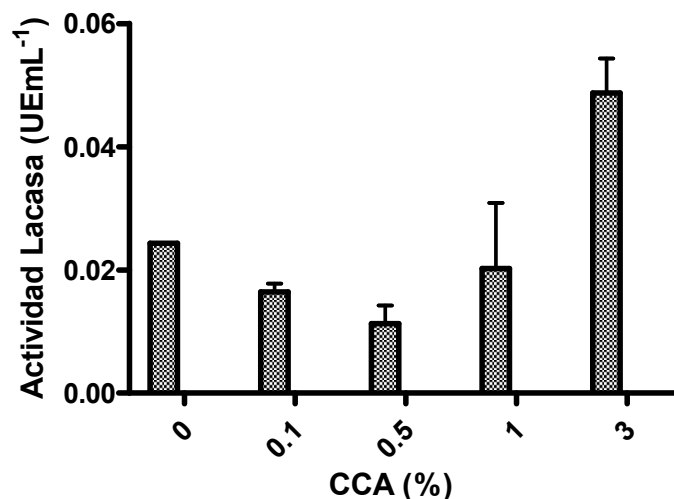


Figura 70: Actividad lacasa registrada en los extractos acuosos de los tratamientos al cabo de 30 días de incubación.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en diferentes trabajos sobre el tema, es importante evitar las generalizaciones basándose en resultados obtenidos con una o pocas cepas (Collet, 1992; Woodward & De Groot, 1999; Clausen *et al.*, 2000). En los ensayos realizados con *T. versicolor* BAFC 4272 el preservante CCA afectó la capacidad de degradación de la madera, aunque estimuló la producción de lacasa probablemente por el cobre que contiene la formulación. Dado que el CCA afectó el crecimiento de *T. versicolor* BAFC 4272 como lo denotan los ensayos en placa, y la capacidad de degradación de la madera, esta cepa no parece prometedora para la biorremediación de maderas tratadas con CCA.

CONCLUSIONES

Se investigó la capacidad de degradar colorantes en placa y producir enzimas ligninolíticas en 8 hongos causantes de pudrición blanca pertenecientes al grupo *Trametes*. Siete nuevos aislamientos provenientes de relevamientos realizados en Buenos Aires, Entre Ríos, Misiones y Santiago del Estero fueron incorporados a la colección BAFC para futuros usos. La cepa *T. versicolor* BAFC 4272 resultó ser la mejor candidata para su uso en biorremediación. En las condiciones ensayadas esta cepa sin embargo no resultó buena productora de endoglucanasa, endoxilanasas, polimetilgalacturonasa ni amilasas. Con respecto a las enzimas ligninolíticas, la enzima lacasa es la única detectable en valores significativos. La producción de MnP sólo fue detectada en ciertos ensayos a concentraciones bajas y en ninguna de las condiciones ensayadas se detectó la presencia de LiP.

Entre las fuentes de nitrógeno ensayadas, el ácido glutámico y el sulfato de amonio resultaron las más favorables para la producción de lacasa y MnP.

Entre los compuestos aromáticos el ácido ferúlico y la vainillina promovieron una mayor producción de lacasa, entre 2-3 veces mayor que la registrada en los controles. Se registraron distintos patrones isoenzimáticos dependiendo del compuesto aromático adicionado.

Con respecto a la adición de metales, la actividad lacasa aumentó 150 veces con la adición de cobre alcanzando títulos de 10000 UE L⁻¹ a los 18 días de cultivo, y la actividad MnP alcanzó 24 UE L⁻¹. La adición de manganeso incrementó levemente la actividad lacasa (7 veces más que el control) pero no así la actividad actividad MnP (10 UE L⁻¹).

La enzima lacasa demostró tener una actividad óptima en un rango de temperaturas de entre 30-60°C y a pHs de entre 4-6. La enzima tiene una buena estabilidad térmica, comparable a otras lacasas del mismo género. La adición del colorante VM tuvo un efecto negativo sobre esta estabilidad.

El nuevo aislamiento es capaz de decolorar colorantes industriales del tipo heterocíclicos, indigoides, antraquinónicos, trifenilmetánicos y azoicos, sin la ayuda de inductores. También es capaz de decolorar hasta un 86% una

mezcla de colorantes de diferentes estructuras químicas con la adición de vainillina como inductor.

La actividad lacasa es inducible por el colorante VM, la respuesta a este estímulo es casi inmediata, el aumento de actividad se registra tan solo dos horas después. Este aislamiento no sólo es capaz de crecer a concentraciones relativamente altas de este colorante, sino que también la producción enzimática de lacasa se incrementa al aumentar la concentración de VM, y mientras mayor es la concentración inicial del colorante mayor es el porcentaje de decoloración obtenido.

El cobre aumenta la actividad lacasa en cultivos con VM pero retarda su decoloración. Se comprobó la degradación de este colorante con sobrenadante crudo a través de un bioensayo y se encontraron los valores óptimos de temperatura, concentración de HBT y de enzima (40°C, 0.9 UE mL⁻¹ y 5.5 mM respectivamente) para este proceso.

El cocultivo del nuevo aislamiento con una cepa de *G. lucidum* produjo un nuevo patrón isoenzimático y un incremento de la actividad lacasa, reduciendo el tiempo necesario para la decoloración de VM y alcanzando mayores porcentajes de degradación con respecto a los monocultivos. El índice de selectividad de los cocultivos fue marcadamente mayor, indicando un mayor porcentaje de lignina degradada.

Con respecto a la degradación de maderas, *T. versicolor* BAFC 4272 degradó la madera de álamo más rápidamente que la de pino. El cobre afectó negativamente esta degradación, pero estimuló significativamente la producción de lacasa. Dependiendo de las condiciones, se observaron características compatibles con patrones de degradación selectiva o simultánea.

T. versicolor BAFC 4272 es capaz de crecer en medios SSF hidratados con soluciones de hasta 3% de CCA. El porcentaje de pérdida de peso del aserrín del medio de cultivo resultó inversamente proporcional a la concentración de CCA utilizada, sin embargo, la actividad lacasa resultó significativamente mayor en los tratamientos con la más alta concentración (3%) de CCA.

A partir del relevamiento realizado en este trabajo de tesis se seleccionó un aislamiento de *Trametes versicolor* (BAFC 4272) que fue capaz de decolorar

varios tipos de colorantes industriales sin la ayuda de mediadores. Mediante co-cultivo de *T. versicolor* con otro hongo de pudrición blanca (*Ganoderma lucidum*) en fermentación en estado sólido en un medio a base de aserrín, se incrementó la producción de la enzima ligninolítica lacasa, reduciéndose el tiempo necesario para lograr la decoloración completa del colorante verde de malaquita y lográndose una mayor eficiencia en la detoxificación, con respecto a los monocultivos. El índice de selectividad (pérdida de lignina/pérdida de celulosa) de los cultivos duales fue marcadamente mayor. Lo que sugiere la conveniencia de utilizar cultivos duales en biopulpado. La principal enzima ligninolítica producida por *T. versicolor* BAFC 4272 es la lacasa, una enzima con muchísimas posibilidades de uso en biotecnología aplicada a la biorremediación.

Los resultados obtenidos, en particular los relacionados con degradación de VM, permiten considerar a esta cepa como potencialmente útil para biorremediación de efluentes contaminados.

Parte de los resultados de esta Tesis dieron lugar a esta publicación:

Kuhar F, Castiglia V, Levin L. 2015. Enhancement of laccase production and malachite Green decolorization by co-culturing *Ganoderma lucidum* and *Trametes versicolor* in solid-state fermentation. *International Biodeterioration & Biodegradation* 104: 238-243.

REFERENCIAS

- Abadulla E, Tzanov T, Costa S, Robra KH, Cavaco-Paulo A, Gübitz GM. 2000. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Appl Environ Microbiol* 66: 3357-3362.
- Abbott DW & Boraston AB. 2007. The structural basis for exopolygalacturonase activity in a family 28 glycoside hydrolase. *J Mol Biol* 368: 1215-1222.
- Acuña-Argüelles ME., Guitiérrez-Rojas M., Viniegra-González G., Favela-Torres E. 1995. Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-stated fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 43: 808-814.
- Ademark P, de Vries RP, Hagglund P, Stalbrand H, Visser J. 2001. Cloning and characterization of *Aspergillus niger* genes encoding an alpha-galactosidase and a beta-mannosidase involved in galactomannan degradation. *Eur J Biochem* 268: 2982-2990.
- Aguiar A, Gavioli D, Ferraz A. 2014. Metabolite secretion, Fe³⁺-reducing activity and wood degradation by the white-rot fungus *Trametes versicolor* ATCC 20869. *Fungal Biol* 118: 935-942.
- Aguiar A & Ferraz A. 2008. Relevance of extractives and wood transformation products on the biodegradation of *Pinus taeda* by *Ceriporiopsis subvermispota*. *Int Biodeter Biodegr* 61: 182-188.
- Ajisaka K, Fujimoto H, Miyasato M. 1998. An alpha-L-fucosidase from *Penicillium multicolor* as a candidate enzyme for the synthesis of alpha (1→3)-linked fucosyl oligosaccharides by transglycosylation. *Carbohydr Res* 309: 125-129.
- Ajisaka K & Shirakabe M. 1992. Regio selective synthesis of alpha-L-fucosyl-containing disaccharides by use of alpha-L-fucosidases of various origins. *Carbohydr Res* 224: 291-299.
- Albenne C, Canut H, Boudart G, Zhang Y, San Clemente H, Pont-Lezica R, Jamet E. 2009. Plant cell wall proteomics: mass spectrometry data, a trove for research on protein structure/function relationships. *Mol Plant* 2: 977-989.
- Alberts JE, Gelderblom WCA, Botha A, van Zyl WH. 2009. Degradation of aflatoxin B1 by fungal laccase enzymes. *Int J Food Microbiol* 135: 47-52.
- Alder E. 1977. Lignin chemistry – past, present and future. *Wood Sci Technol* 11: 169-218.
- Alic M, Akileswaran L, Gold MH. 1997. Characterization of the gene encoding manganese peroxidase isozyme 3 from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochim Biophys Acta* 1338: 1-7.
- Alvarez JM, Canessa P, Mancilla RA, Polanco R, Santibáñez PA, Vicuña R. 2009. Expression of genes encoding laccase and manganese-dependent peroxidase in the fungus *Ceriporiopsis subvermispota* is mediated by

- an ACE1-like copper-fist transcription factor. *Fungal Genet Biol* 46: 104-111.
- Amaral PFF, Fernandes DLA, Tavares APM, Xavier ABMR, Cammarota MC, Coutinho JAP, Coelho MAZ. 2004. Decolorization of dyes from textile wastewater by *Trametes versicolor*. *Environ Technol* 25: 1313-1320.
- Anastasi A, Spina F, Prigione V, Tigini V, Giansanti P and Varese GC. 2010. Scale-up of a bioprocess for textile wastewater treatment using *Bjerkandera adusta*. *Bioresource Technol* 101: 3067- 3075.
- Arana-Cuenca A, Roda A, Tellez A, Loera O, Carbajo JM, Terron MC, Gonzales AE. 2004. Comparative analysis of laccase-isoenzymes patterns of several related *Polyporaceae* species under different culture conditions. *J Basic Microbiol* 44: 79-87.
- Archana A & Satyanarayana T. 1997. Xylanase production by thermophilic *Bacillus licheniformis* A99 in solid-state fermentation. *Enzyme Microb Tech* 21: 12-17.
- Archibald F. 1992. A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye azure B *Appl Environ Microbiol* 58: 3110-3116.
- Argyropoulos DS, Jurasek L, Kristofova L, Xia ZC, Sun YJ, Palus E. 2002. Abundance and reactivity of dibenzodioxocins in softwood lignin. *J Agr Food Chem* 50: 658-666.
- Arora DS & Rampal P. 2002. Laccase production by some *Phlebiaspecies*. *J. Basic Microbiol* 42: 295-301.
- Asada Y, Watanabe A, Irie T, Nakayama T, Kuwahara M. 1995. Structures of genomic and complementary DNAs coding for *Pleurotus ostreatus* manganese (II) peroxidase. *Biochim Biophys Acta* 1251: 205-209.
- Asgher M, Jamil F, Iqbal HMN. 2012a. Bioremediation potential of mixed white rot culture of *Pleurotus ostreatus* IBL-02 and *Coriolus versicolor* IBL-04 for textile industry wastewater. *J Bioremed Biodegrad* S1:007.
- Asgher M, Noreen S, Iqbal HMN. 2012b. Investigation of the potential of a fungal co-culture for bioremediation of textile industry effluents. *Fresen Environ Bull* 21: 1864-1872.
- Aydinoglu T & Sargin S. 2013. Production of laccase from *Trametes versicolor* by solid-stated fermentation using olive leaves as phenolic substrate. *Bioprocess Biosyst Eng* 36: 215-222.
- Bailey MJ & Pessa E. 1990. Strain and process for production of polygalacturonase. *Enzyme Microb Tech* 12: 266-271.
- Baldrian P. 2006. Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev* 30: 215-242.
- Baldrian P. 2004. Increase of laccase activity during interspecific interaction of white rot fungi. *FEMS Microbiol Ecol* 50: 245-253.
- Baldrian P. 2003. Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme Microb Tech* 32 (1): 78-91.

- Ballance DJ. 1986. Sequences important for gene expression in filamentous fungi. *Yeast* 2: 229-236.
- Bao W, Usha SN, Renganathan V. 1993. Purification and characterization of cellobiose dehydrogenase, a novel hemoflavoenzyme from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Biochem Biophys* 300: 705-713.
- Bao W & Renganathan V. 1992. Cellobiose oxidase of *Phanerochaete chrysosporium* enhances crystalline cellulose degradation by cellulases. *FEBS Lett* 302: 77-80.
- 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 DP & Aust SD. 1994. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 28: 78A-87A.
- Barrosy J, Serk H, Granlundz I, Pesquet E. 2015. The cell biology of lignification in higher plants. *Ann Bot-London* 115: 1053-1074.
- Bauer S, Vasu P, Persson S, Mort AJ, Somerville CR. 2006. Development and application of a suite of polysaccharide degrading enzymes for analyzing plant cell walls. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 11417-11422.
- Bautista LF, Morales G, Sanz R. 2010. Immobilization strategies for laccase from *Trametes versicolor* on mesostructured silica materials and the application to the degradation of naphthalene. *Bioresource Technol* 101: 8541-8548.
- Beckham GT, Matthews JF, Bomble YJ, Bu L, AdneyWS, Himmel ME, Nimlos MR, Crowley MF. 2010. Identification of amino acids responsible for processivity in a Family 1 carbohydrate-binding module from a fungal cellulase. *J Phys Chem B* 114: 1447-1453.
- Beeson WT, Phillips CM, Cate JH, Marletta MA. 2012. Oxidative cleavage of cellulose by fungal copper-dependent polysaccharide monooxygenases. *J Am Chem Soc* 134: 890-892.
- Benoit I, Danchin EG, Bleichrodt RJ, de Vries RP. 2008. Biotechnological applications and potential of fungal feruloyl esterases based on prevalence, classification and biochemical diversity. *Biotechnol Lett* 30: 387-396.
- Bergwerff AA & Scherpenisse P. 2003. Determination of residues of malachite green in aquatic animals. *J Chromatogr B* 788: 351-359.
- Bey M, Zhou S, Poidevin L, Henrissat B, Coutinho PM, Berrin JG, Sigoillot JC. 2013. Cello-oligosaccharide oxidation reveals differences between two lytic polysaccharide monooxygenases (family GH61) from *Podospira anserina*. *Appl Environ Microbiol* 79: 488-496.
- Bezerra RM & Dias AA 2005. Enzymatic kinetic of cellulose hydrolysis: inhibition by ethanol and cellobiose. *Appl Biochem Biotechnol* 126: 49-59.
- Bibi I, Bhatti HN, Asgher M. 2011. Comparative study of natural and synthetic phenolic compounds as efficient laccase mediators for the transformation of cationic dye. *Biochem Eng J* 56: 225-231.

- Biely P, Mastihubova M, Tenkanen M, Eyzaguirre J, Li XL, Vrsanska M. 2011. Action of xylan deacetylating enzymes on monoacetyl derivatives of 4-nitrophenyl glycosides of beta-D-xylopyranose and alpha-L-arabinofuranose. *J Biotechnol* 151: 137-142.
- Biely P, Vrsanska M, Tenkanen M, Kluepfel D. 1997. Endo-beta-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. *J Biotechnol* 57: 151-166.
- Bigelis R. 1991. Fungal enzymes in food processing. En: Handbook of applied mycology. K. G. Mukerji y E. H. Marth (eds.). Marcel Dekker Inc., New York.
- Binder M, Hibbett DS, Larsson K-H, Larsson E, Langer E. 2005. The phylogenetic distribution of resupinate forms in the homobasidiomycetes. *Syst Biodivers* 3: 113-157.
- Blais P, Rogers PA, Charest PM. 1992. Kinetic of the production of polygalacturonase and pectin lyase by two closely related formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Exp Mycol* 16: 1-7.
- Blanchette RA. 1995. Degradation of lignocellulose complex in wood. *Can J Bot* 73: S999-S1010.
- Blanchette RA. 1991. Delignification by Wood-Decay Fungi. *Annu Rev Phytopathol* 29: 381-403.
- Blanquez P, Sarra M, Vicent T. 2008. Development of a continuous process to adapt the textile wastewater treatment by fungi to industrial conditions. *Process Biochem* 43: 1-7.
- Boccas F, Roussos S, Gutierrez M, Serrano L, Viniestra GG. 1994. Production of pectinase from coffee pulp in solid state fermentation system: selection of wild fungal isolation of high potency by a simple three-step screening technique. *J Food Sci Technol* 31: 22-26.
- Bonnarme P, Delattre M, Drouet H, Corrieu G, Asther M. 1993. Toward a control of lignin and manganese peroxidases hypersecretion by *Phanerochaete chrysosporium* in agitated vessels: evidence of the superiority of pneumatic bioreactors on mechanically agitated bioreactors. *Biotechnol Bioeng* 41: 440-450.
- Boominathan K, D'Souza TM, Naidu PS, Dosoretz C, Reddy CA. 1993. Temporal expression of the major lignin peroxidase genes of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microb* 59: 3946-3950.
- Boominathan K & Reddy CA. 1992. cAMP-mediated differential regulation of lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase production in the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *P Natl Acad Sci USA* 89: 5586-5590.
- Boonlue S, Aimi T, Morinaga T. 2003. Molecular characterization of a xylanase producing thermophilic fungus isolated from Japanese soil. *Curr Microbiol* 47: 119-124.

- Botella C, Diaz A, de Ory I, Webb C, Blandino A. 2007. Xylanase and pectinases production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. *Process Biochem* 42: 98-101.
- Brotman Y, Briff E, Viterbo A, Chet I. 2008. Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. *Plant Physiol* 147: 779-789.
- Brown JA, Glenn JK, Gold MH. 1990. Manganese regulates expression of manganese peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*. *J Bacteriol* 172: 3125-3130.
- Brunow G. 2001. Methods to reveal the structure of lignin. En M. Hofrichter, & A. Steinbuchel (Eds.), *Lignin, humic substance and coal (Biopolymers, vol. 1)*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
- 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.
- Buswell J & Odier E. 1987. Lignin biodegradation. *CRC Crit Rev Biotechnol* 6: 1-59.
- Cai YJ, Chapman S, Buswell J, Chang S-T. 1999. Production and distribution of endoglucanase, cellobiohydrolase, and β -glucosidase components of the cellulolytic system of *Volvariella volvacea*, the edible straw mushroom. *Appl Environ Microb* 65: 553-559.
- Camarero S, Ibarra D, Martinez MJ, Martinez A. 2005. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Appl Environ Microb* 71: 1775-1784.
- Cannella D, Hsieh CW, Felby C, Jorgensen H. 2012. Production and effect of aldonic acids during enzymatic hydrolysis of lignocellulose at high dry matter content. *Biotechnol Biofuels* 5:26.
- Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V. 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res* 37: D233-238.
- Carabajal M, Kellner H, Levin L, Jehmlich N, Hofrichter M, Ullrich R. 2013. The secretome of *Trametes versicolor* grown on tomato juice medium and purification of the secreted oxido reductases including a versatile peroxidase. *J Biotechnol* 168: 15-23.
- Carlile MJ, Watkinson SC, Gooday GW. 2001. *The Fungi*, p. 296. Academic Press, London, UK.
- Castanera R, Perez G, Omarini A, Alfaro M, Pisabarro AG, Faraco V, Amore A, Ramirez L. 2012. Transcriptional and enzymatic profiling of *Pleurotus ostreatus* laccase genes in submerged and solid-state fermentation cultures. *Appl Environ Microb* 78: 4037-45.
- Cavallazzi JRP, Oliveira MGA, Kasuya MCM. 2005. Screening of inducers for laccase production by *Lentinula edodes* in liquid medium. *Braz J Microbiol* 36: 383-387.

- Chakroun H, Mechichi T, Martinez MJ, Dhouib A, Sayadi S. 2010. Purification and characterization of a novel laccase from the ascomycete *Trichoderma atroviride*: application on bioremediation of phenolic compounds. *Process Biochem* 45:507–513.
- Champagne PP & Ramsay JA. 2010. Dye decolorization and detoxification by laccase immobilized on porous glass beads. *Bioresource Technol* 101: 2230-2235.
- Champagne PP & Ramsay JA. 2005. Contribution of manganese peroxidase and laccase to dye decoloration by *Trametes versicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol* 69: 276-285.
- Chen SH & Yien Ting AS. 2015. Biodecolorization and biodegradation potential of recalcitrant triphenylmethane dyes by *Coriolopsis* sp. isolated from compost. *J Environ Manage* 150: 274-280.
- Chen XA, Ishida N, Todaka N, Nakamura R, Maruyama J, Takahashi H, Kitamoto K. 2010a. Promotion of efficient saccharification of crystalline cellulose by *Aspergillus fumigatus* Swo1. *Appl Environ Microbiol* 76: 2556-2561.
- Chen M, Yao S, Zhang H, Liang X. 2010b. Purification and characterization of a versatile peroxidase from edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *Chinese J Chem Eng* 18: 824-829.
- Chen S, Ge W, Buswell JA. 2004. Molecular cloning of a new laccase from the edible straw mushroom *Volvariella volvacea*: possible involvement in fruit body development. *FEMS Microbiol Lett* 30: 171-176.
- 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.
- Chen H, Hayn M, Esterbauer H. 1992. Purification and characterization of two extracellular beta-glucosidases from *Trichoderma reesei*. *Biochim Biophys Acta* 1121: 54-60.
- Cheng H, Zhan H, Fu S, Lucia L. 2010. Alkali extraction of hemicellulose from de-pithed corn stover and effects on soda-AQ pulping. *Bio Resources* 6: 196-206.
- Chi Y, Hatakka A, Maijala P. 2007. Can co-culturing of two white-rot fungi increase lignin degradation and the production of lignin-degrading enzymes? *Int Biodeter Biodegr* 59: 32-39.
- Chiu SW, Ching ML, Fong KL, Moore D. 1998. Spent oyster mushroom substrate performs better than many mushroom mycelia in removing the biocide pentachlorophenol. *Mycol Res* 102: 1553-1562.
- Cho HT & Cosgrove DJ. 2002. Regulation of root hair initiation and expansin gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 3237-3253.
- Choi YS, Long Y, Kim M-J, Kim J-J, Kim G-H. 2013. Decolorization and degradation of synthetic dyes by *Irpex lacteus* KUC8958. *J Environ Sci Heal A* 48: 501-508.

- Choi Y-S, Seo J-Y, Lee H, Yoo J, Jung J, Kim J-J, Kim G-H. 2014. Decolorization and detoxification of wastewater containing industrial dyes by *Bjerkandera adusta* KUC9065. *Water Air Soil Pollut.* 225: 1-10
- Chong SL, Battaglia E, Coutinho PM, Henrissat B, Tenkanen M, de Vries RP. 2011. The alpha-glucuronidase Agu1 from *Schizophyllum commune* is a member of a novel glycoside hydrolase family (GH115). *Appl Microbiol Biotechnol* 90: 1323-1332.
- Clausen C, Green FIII, Woodward B, Evans J, De Groot R. 2000. Correlation between oxalic acid production and copper tolerance in *Wolfiporia cocos*. *Int Biodeter Biodegr* 46:69-76.
- Clausen CA & Smith RL. 1998. Removal of CCA from treated wood by oxalic acid extraction, steam explosion, and bacterial fermentation. *J Ind Microbiol Biotechnol* 20: 251-257.
- Collet O. 1992. Comparative tolerance of the brown-rot fungus *Antrodia vallantii* (DC.:Fr.) Ryv. isolates to copper. *Holzforschung* 46: 293-298.
- Collins PJ & Dobson ADW. 1997. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Appl Environ Microbiol* 63: 3444-3450.
- Colpa DI, Fraaije MW, van Bloois E. 2014. DyP-type peroxidases: a promising and versatile class of enzymes. *J Ind Microbiol Biotechnol* 41: 1-7.
- Cooper P. 1995. Removing colour from dye house wastewater. *Asian Textile Journal* 3: 52-56.
- Cooper RM. 1983. The mechanisms and significance of enzyme degradation of host cell walls. En: *Biochemical plant pathology*. pp. 101-137. J. A. Callow (ed.). Wiley, New York.
- Cosgrove DJ, Bedinger P, Durachko DM. 1997. Group I allergens of grass pollen as cell wall-loosening agents. *Proc Natl Acad Sci* 94: 6559-6564.
- Costa SA, Tzanov T, Carneiro AF, Para A, Gübitz GM, Cavaco-Paulo A. 2002. Studies of stabilization of native catalase using additives. *Enzyme Microb Tech* 30: 387-391.
- Coughlan MP & Hazlewood GP. 1993. β -1, 4-D-Xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnol Appl Biochem* 17: 259-289.
- Coughlan MP & Ljungdahl LG. 1988. Comparative biochemistry of fungal and bacterial cellulolytic enzyme systems. En: *Biochemistry and genetics of cellulose degradation*. pp. 11-31. J. P. Aubert, P. Beguin y J. Millet (eds.). Academic Press, New York.
- Coutinho PM, Andersen MR, Kolenova K, vanKuyk PA, Benoit I, Gruben BS, Trejo-Aguilar B, Visser H, van Solingen P, Pakula T, Seiboth B, Battaglia E, Aguilar-Osorio G, de Jong JF, Ohm RA, Aguilar M, Henrissat B, Nielsen J, Stalbrand H, de Vries RP. 2009. Post-genomic insights into the plant polysaccharide degradation potential of *Aspergillus nidulas* and comparison to *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet Biol* 46: S161-S169.

- Couto SR & Herrera JLT. 2006. Industrial and biotechnological applications of laccase: a review. *Biotechnol Adv* 24: 500-513.
- Crepin VF, Faulds CB, Connerton IF. 2004. Functional classification of the microbial feruloyl esterases. *Appl Microbiol Biotechnol* 63: 647-652
- D'souza TD, Tiwari R, Sah AK, Raghukumar C. 2006. Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of coloured effluents and synthetic dyes. *Enzyme Microb Technol* 38: 504-511.
- Da Silva R, Franco CML, Gomez E. 1997. Pectinases, hemicelulases e celulases: ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: Revisão. *Bol Soc Bras Ciên Tecnol Alim* 31: 249-60.
- Daâssi D, Zouari-Mechichi H, Prieto A, Martínez MJ, Nasri M, Mechichi T. 2013. Purification and biochemical characterization of a new alkali-stable laccase from *Trametes* sp. isolated in Tunisia: role of the enzyme in olive mill wastewater treatment. *World J Microbiol Biotechnol* 29: 2145-2155.
- Daneshvar N, Ayazloo M, Khataee AR, Pourhassan M. 2007. Biological decolorization of dye solution containing Malachite Green by microalgae *Cosmarium* sp. *Bioresource Technol* 98: 1176-1182.
- Davidson R, Campbell W, Blaisdell D. 1938. Differentiation of wood-decaying fungi by their reactions on gallic or tannic acid medium. *J Agric Res* 57: 683-695.
- de Jong E, Cazemier AE, Field JA, de Bont JAM. 1994. Physiological role of chlorinated aryl alcohols biosynthesized de novo by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55. *Appl Environ Microbiol* 60: 271-277.
- De la Rubia T, Ruiz E, Pérez J, Martínez J. 2002. Properties of a laccase produced by *Phanerochaete flavido-alba* induced by vainillin. *Arch Microbiol* 179: 70-73.
- de Souza CGM, Tychanowicz GK, de Souza DF, Perlata RM. 2004. Production of laccase isoforms by *Pleurotus pulmonarius* in response to presence of phenolic and aromatic compounds. *J Basic Microbiol* 44: 129-136.
- de Vries RP, van Grieken C, VanKuyk PA, Wosten HA. 2005. The value of genome sequences in the rapid identification of novel genes encoding specific plant cell wall degrading enzymes. *Curr Genomics* 6: 157-187.
- de Vries RP, Visser J, de Graaff LH. 2000. CreA modulates the XlnR-induced expression on xylose of *Aspergillus niger* genes involved in xylan degradation. *Res Microbiol* 150: 281-285.
- de Vries RP & Visser J. 2001. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol Mol Biol Rev* 65: 497-522.
- Deacon J. 2005. *Fungal biology*. Blackwell Publishing.
- Decker CH, Visser J, Schreier P. 2000. Beta-glucosidases from five black *Aspergillus* species: study of their physico-chemical and biocatalytic properties. *J Agric Food Chem* 48: 4929-4936.

- Dekker RF, Barbosa AM, Giese EC, Godoy SD, Covizzi LG. 2007. Influence of nutrients on enhancing laccase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. *Int Microbiol* 10: 177-185.
- Desmet T, Cantaert T, Gualfetti P, Nerinckx W, Gross L, Mitchinson C, Piens K. 2007. An investigation of the substrate specificity of the xyloglucanase Cel74A from *Hypocrea jecorina*. *FEBS J* 274: 356-363.
- Dey PM. 1978. Biochemistry of plant galactomananos. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 35: 3411-3376.
- Dhankhar R & Hooda A. 2011. Fungal biosorption-an alternative to meet the challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. *Environ Technol* 32: 467-491.
- Dhawan S & Kuhad RC. 2002. Effects of amino acid and vitamins on laccase production by the bird's nest fungus *Cyathus bulleri*. *Bioresour Tech* 84: 35-38.
- Dhillon GS, Kaur S, Brar KS. 2012. In-vitro decolorization of recalcitrant dyes through an ecofriendly approach using laccase from *Trametes versicolor* grown on brewer's spent grain. *Int Biodeter Biodegr* 72: 67-75.
- Díaz R, Saparrat MCN, Jurado M, García-Romera I, Ocampo JA, Martínez MJ. 2010. Biochemical and molecular characterization of *Coriolopsis rigida* laccases involved in transformation the solid waste from olive oil production. *Appl Microbiol Biotechnol* 88: 133-142.
- Dimarogona M, Topakas E, Olsson L, Christakopoulos P. 2012. Lignin boosts the cellulase performance of a GH-61 enzyme from *Sporotrichum thermophile*. *Bioresour Technol* 110: 480-487.
- Diorio LA, Mercuri AA, Nahabedian DE, Forchiassin F. 2008. Development of a bioreactor system for the decolorization of dyes by *Coriolus versicolor* f. *antarticus*. *Chemosphere* 72: 150-156.
- Do BC, Dang TT, Berrin JG, Haltrich D, To KA, Sigoillot JC, Yamabhai M. 2009. Cloning, expression in *Pichia pastoris*, and characterization of a thermostable GH5 mannan endo-1,4-betamannosidase from *Aspergillus niger* BK01. *Microb Cell Fact* 8: 59.
- Dong Y-C, Wang W, Hu Z-C, Fu M-L, Chen Q-H. 2012. The synergistic effect on production of lignin-modifying enzymes through submerged co-cultivation of *Phlebia radiata*, *Dichomitus squalens* and *Ceriporiopsis subvermispota* using agricultural residues. *Bioprocess Biosyst Eng* 35: 751-760.
- Dong JL, Zhang YW, Zhang RH, Huang WZ, Zhang YZ. 2005. Influence of culture conditions on laccase production and isozyme patterns in the white-rot fungus *Trametes gallica*. *J. Basic Microbiol.* 45: 190-198.
- Dooley DM, Rawlings J, Dawson JH, Stephens PJ, Andreasson L-E, Malmstrom BC, Gray HB. 1979. Spectroscopic studies of *Rhus vernicifera* and *Polyporus versicolor* laccase. Electronic structure of the copper sites. *J Amer Chem Soc* 101: 5038-5046.

- Dubrow SF, Boardman GD, Michelsen DL. 1996. Chemical pretreatment and aerobic-anaerobic degradation of textile dye wastewater. En: Reife A, Freeman HS, eds. *Environmental Chemistry of Dyes and Pigments*, Toronto: John Wiley and Sons, pp. 75-94.
- Ducros V, Brzozowski AM, Wilson KS, Brown SH, Ostergaard P, Schneider P. 1998. Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å resolution. *Nat Structural Biol* 5: 310-316.
- Eaton RA & Hale MD. 1983. Soft rot decay of wood: the infection and cavity-forming processes of *Phialophora hoffmannii* (Van Beyma) Schol-Schwarz. *Biodeterioration* 5: 54-63.
- Edens WA, Goins TQ, Dooley D, Henson JM. 1999. Purification and characterization of a secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Appl Environ Microbiol* 65: 3071-3074.
- Eggert, C, Temp U, Dean JFD, Eriksson KEL. 1996a. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Lett* 391: 144-148.
- Eggert C, Temp U, Eriksson KEL. 1996b. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl Environ Microbiol* 62: 1151-1158.
- Elisashvili V, Kachlishvili E, Khardziani T, Agathos SN. 2010. Effect of aromatic compounds on the production of laccase and manganese peroxidase by white-rot basidiomycetes. *J Ind Microbiol Biotechnol* 37: 1091-1096.
- Elisashvili V & Kachlishvili E. 2009. Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot Basidiomycetes. *J Biotechnol* 144: 37-42.
- Elisashvili V, Kachlishvili E, Penninckx M. 2008. Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35: 1531-1538.
- Elisashvili V, Kachlishvili E, Tsiklauri N, Bakradze M. 2002. Physiological regulation of edible and medicinal higher basidiomycetes lignocellulolytic enzymes activity. *Int J Med Mushr* 4: 159-166.
- Enoki A, Tanaka H, Fuse G, 1988. Degradation of lignin-related compounds, pure cellulose, and wood components by white rot and brown-rot fungi. *Holzforschung* 42: 85-93.
- Eriksson KE, Blanchette RA., Ander P. 1990. *Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components*, p. 406. Springer, Berlin-Heidelberg-New York.
- Eriksson KE, Wood TM. 1985. Biodegradation of cellulose. En: Higuchi T. (Ed) *Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components* pp. 469-504. Academic Press.
- Eriksson KE, Pettersson B, Westermark U. 1974. Oxidation: an important enzyme reaction in fungal degradation of cellulose. *FEBS Lett* 49: 282-285.

- Eriksson Ö, Goring DAI, Lindgren BO. 1980. Structural studies on the chemical bonds between lignins and carbohydrates in spruce wood. *Wood Sci Technol* 14: 267-279.
- Eriksson T, Karlsson J, Tjerneld F. 2002. A model explaining declining rate in hydrolysis of lignocellulose substrates with cellobiohydrolase I (cel7A) and endoglucanase I (cel7B) of *Trichoderma reesei*. *Appl Biochem Biotechnol* 101: 41-60.
- Fackler K, Gradinger C, Hinterstoisser B, Messner K, Schwanninger M. 2006. Lignin degradation by white rot fungi on spruce wood shavings during short-time solid-state fermentations monitored by near infrared spectroscopy. *Enzyme Microb Technol* 39: 1476-1483.
- Fan F, Zhuo R, Sun S, Wan X, Jiang M, Zhang X, Yang Y. 2010. Cloning and functional analysis of a new laccase gene from *Trametes* sp. 48424 which had the high yield of laccase and strong ability for decolorizing different dyes. *Bioresource Tech* 102: 3126-3137.
- Faraco V, Giardina P, Sannia G. 2003. Metal-responsive elements in *Pleurotus ostreatus* laccase gene promoters. *Microbiology* 149: 2155-2162.
- Farnet AM, Criquet S, Cigna M, Gil G, Ferré E. 2004. Purification of a laccase from *Marasmius quercophilus* induced with ferulic acid: reactivity towards natural and xenobiotic aromatic compounds. *Enzyme Microb Tech* 34: 549-554.
- Farnet AM, Tagger S, Le Petit J. 1999. Effects of copper and aromatic inducers on the laccases of the white-rot fungus *Marasmius quercophilus*, C.R.A.S. *Life Sci* 322: 499-503.
- Fernandez-Fernandez M, Sanroman MA, Moldes D. 2013. Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnol Adv* 31: 1808-1825.
- Fessard V, Godard T, Huet S, Mourot A, Poul JM. 1999. Mutagenicity of malachite green and leucomalachite green in in vitro tests. *J Appl Toxicol* 19: 421-430.
- Flores C, Vidal C, Trejo-Hernandez HR, Galindo E, Serano-Carreón L. 2009. Selection of *Trichoderma* strains capable of increasing laccase production by *Pleurotus ostreatus* and *Agaricus bisporus* in dual cultures. *J Appl Microbiol* 106: 249-257.
- Flores ME, Perea M, Rodríguez O, Malvaez A, Huitron C. 1996. Physiological Studies on induction and catabolite repression of β -xylosidase and endoxylanases in *Streptomyces* sp. CH-M-1035. *J Biotechnol* 49: 179-187.
- Floudas D, Binder M, Riley R, Barry K, Blanchette RA, Henrissat B, Martinez AT, Otilar R, Spatafora JW, Yadav JS, Aerts A, Benoit I, Boyd A, Carlson A, Copeland A, Coutinho PM, de Vries RP, Ferreira P, Findley K, Foster B, Gaskell J, Glotzer D, Gorecki P, Heitman J, Hesse C, Hori C, Igarashi K, Jurgens JA, Kallen N, Kersten P, Kohler A, Kues U, Kumar TK, Kuo A, LaButti K, Larrondo LF, Lindquist E, Ling A, Lombard V, Lucas S, Lundell T, Martin R, McLaughlin DJ, Morgenstern I, Morin E,

- Murat C, Nagy LG, Nolan M, Ohm RA, Patyshakuliyeva A, Rokas A, Ruiz-Duenas FJ, Sabat G, Salamov A, Samejima M, Schmutz J, Slot JC, St John F, Stenlid J, Sun H, Sun S, Syed K, Tsang A, Wiebenga A, Young D, Pisabarro A, Eastwood DC, Martin F, Cullen D, Grigoriev IV, Hibbett DS. 2012. The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science* 336(6089): 1715-1719.
- Fogarty WM & Kelly CT. 1983. Pectic enzymes. En: *Microbial enzymes and biotechnology*. pp. 131-182. W. M. Fogarty (ed.). Applied Science Publishers, London.
- Fonseca MI, Shimizu E, Zapata PD, Villalba L. 2010. Copper inducing effect on laccase production of white rot fungi native from Misiones (Argentina). *Enzyme Microb Tech* 46: 534-539.
- Fonseca MJV & Said S. 1995. Sequential production of pectinases by *Penicillium frequentans*. *World J Microbial Biotechnol* 11: 174-177.
- Forde J, Tully E, Vakurov A, Gibson TD, Millner P, O'Fagain C. 2010. Chemical modification and immobilisation of laccase from *Trametes hirsuta* and from *Myceliophthora thermophila*. *Enzyme Microb Technol* 46: 430-437.
- Foreman PK, Brown D, Dankmeyer L, Dean R, Diener S, Dunn-Coleman NS, Goedegebuur F, Houfek TD, England GJ, Kelley AS, Meerman HJ, Mitchell T, Mitchinson C, Olivares HA, Teunissen PJ, Yao J, Ward M. 2003. Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *J Biol Chem* 278: 31988-31997.
- Forootanfar H, Moezzi A, Aghaie-Khouzani M, Mahmoudjanlou Y, Ameri A, Niknejad F, Faramarzi MA. 2012. Synthetic dye decolorization by three sources of fungal laccase. *J Environ Health Sci Eng* 9: 27.
- Forootanfar H, Faramarzi MA, Shahverdi AR, Yazdi MT. 2011. Purification and biochemical characterization of extracellular laccase from the ascomycete *Paraconiothyrium variabile*. *Bioresource Tech* 102: 1808-1814.
- Forsberg Z, Mackenzie AK, Sørli M, Røhr AK, Helland R, Arvai AS, Vaaje-Kolstad G, Eijsink VGH. 2014. Structural and functional characterization of a conserved pair of bacterial cellulose-oxidizing lytic polysaccharide monoxygenases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 8446-8451.
- 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.
- Fukushima K. 2001. Regulation of syringyl to guaiacyl ratio in lignin biosynthesis. *J Plant Res* 114: 499-508.
- Gaetke LM & Chow CK. 2003. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* 189: 147-163.

- Galhaup C, Wagner H, Hinterstoisser B, Haltrich D. 2002a. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme Microb Tech* 30: 529-536.
- 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 & Haltrich D. 2001. Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. *Appl Microbiol Biotechnol* 56: 225-232.
- García-Sandoval R, Wang Z, Binder M. 2011. Molecular phylogenetics of the gleophyllales and relative ages of clades of Agaricomycotina producing a brown rot. *Mycologia* 103: 510-523.
- Garzillo AM, Colao MC, Buonocore B, Oliva R, Falcigno L, Saviano M, Santoro AM, Zappala R, Bonomo RP, Bianco C, Giardina P, Palmieri G, Sannia G. 2001. Structural and kinetic characterization of native laccases from *Pleurotus ostreatus*, *Rigidoporus lignosus*, and *Trametes trogii*. *J Protein Chem* 20: 191-120.
- Gerini MF, Roccatano D, Bacioncchi E, Nola AD. 2003. Molecular dynamics simulations of lignin peroxidase in solution. *Biophys J* 84: 3883-3893.
- Ghosh A, Frankland JC, Thurston CF, Robinson CH. 2003. Enzyme production by *Mycena galopus* mycelium in artificial media and in *Picea sitchensis* F1 horizon needle litter. *Mycol Res* 107: 996-1008.
- Ghosh M, Das A, Mishra AK, Nanda G. 1993. *Aspergillus sydowii* MG49 is a strong producer of thermostable xylanolytic enzymes. *Enzyme Microb Tech* 15: 703-709.
- Gianfreda L & Rao MA. 2004. Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. *Enzyme Microb Tech* 35: 339-354.
- Gianfreda L, Iammarino G, Scelza R, Rao MA. 2006. Oxidative catalysts for the transformation of phenolic pollutants: a brief review. *Biocatal Biotransform* 24:177-87.
- Gianfreda L, Xu F, Bollag J-M. 1999. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation J* 3: 1-26.
- Giardina P, Faraco V, Pezzella C, Piscitelli A, Vanhulle S, Sannia G. 2010. Laccases: a never-ending story. *Cell Mol Life Sci* 67: 369-385.
- Giardina P, Palmieri G, Fontanella B, Riviaccio V, Sannia G. 2000. Manganese peroxidase isoenzymes produced by *Pleurotus ostreatus* grown on wood sawdust. *Arch Biochem Biophys* 376: 171-179.
- Giardina P, Palmieri G, Scaloni A, Fontanella B, Faraco V, Cennamo G, Sannia G. 1999. Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochem J* 34: 655-663.
- Gilbert HJ, Stalbrand H, Brumer H. 2008. How the walls come crumbling down: recent structural biochemistry of plant polysaccharide degradation. *Curr Opin Plant Biol* 11: 338-348.

- 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 & Gold MH. 1985. Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Biochem Biophys* 242: 329-341.
- 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, 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.
- Gnanamani A, Jayaprakashvel M, Arulmani M, Sadulla S. 2006. Effect of inducers and culturing processes on laccase synthesis in *Phanerochaete chrysosporium* NCIM 1197 and the constitutive expression of laccase isozymes. *Enzyme Microb Tech* 38: 1017-1021
- 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.
- Grassi E, Scodelle P, Filieil N, Carballo R, Levin L. 2011. Potential of *Trametes trogii* culture fluids and its purified laccase for the decolorization of different types of recalcitrant dyes without the addition of redox mediators. *Int Biodeter Biodegr* 65: 635-643.
- Grishutin SG, Gusakov AV, Markov AV, Ustinov BB, Semenova MV, Sinitsyn AP. 2004. Specific xyloglucanases as a new class of polysaccharide-degrading enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1674: 268-281.
- Guillen D, Sanchez S, Rodriguez-Sanoja R. 2010. Carbohydrate binding domains: multiplicity of biological roles. *Appl Microbiol Biotechnol* 85: 1241-1249.
- Guillén F, Martínez MJ, Muñoz C, Martínez AT. 1997. Quinone redox cycling in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii* leading to extracellular production of superoxide anion radical. *Arch Biochem Biophys* 339: 190-199.
- Guillén Y, Navias D, Machuca A. 2009. Tolerance to wood preservatives by copper-tolerant wood-rot fungi native to south-central Chile. *Biodegradation* 20: 135-142.
- Gupta VK & Suhas. 2009. Applications of low-cost adsorbents for dye removal - A review. *J Environ Manage* 90: 2313-2342.
- Gutiérrez-Soto JG, Salcedo-Martínez SM, Contreras-Cordero JF, Hernández-Luna CE. 2011. Characterization of the major laccase from *Trametes maxima* CU1 and decolorization of nine commercially significant dyes by the enzyme. *Water Res Dev* 1: 10-19.

- Haibo Z, Yinglong Z, Feng H, Peiji G, Jiachuan C. 2009. Purification and characterization of a thermostable laccase with unique oxidative characteristics from *Trametes hirsuta*. *Biotechnol Lett* 31: 837-843.
- Hakala TK, Hilden K, Maijala P, Olsson C, Hatakka A. 2006. Differential regulation of manganese peroxidases and characterization of two variable MnP encoding genes in the white-rot fungus *Physisporinus rivulosus*. *Appl Microb Biotechnol* 73: 839-49.
- Haki GD & Rakshit SK. 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Biores Tech* 89: 17-34.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid symposium series N° 41*: 95-98. Oxford University Press.
- Haltrich D, Preiss M, Steiner W. 1993. Optimization of a culture medium for increased xylanase production by a wild strain of *Schizophyllum commune*. *Enzyme Microb Tech* 15: 854-860.
- Hankin L & Anagnostakis SL. 1977. Solid media containing carboxymethylcellulose to detect CX cellulose activity of micro-organisms. *J Gen Microbiol* 98:109-115.
- Harris PV, Welner D, McFarland KC, Re E, Navarro Poulsen JC, Brown K, Salbo R, Ding H, Vlasenko E, Merino S, Xu F, Cherry J, Larsen S, Lo Leggio L. 2010. Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: structure and function of a large, enigmatic family. *Biochemistry* 49: 3305-3316.
- Hatakka A. 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol Rev* 13: 125-135.
- Hatvani N & Mecs I. 2002. Effect of the nutrient composition on dye decolorisation and extracellular enzyme production by *Lentinus edodes* on solid medium. *Enzyme Microbiol Tech* 30: 381-386.
- He R, Lui X, Yan Z. 2010. Enhancement of laccase activity by combining white rot fungal strains. *J Environ Sci* 31: 465-471.
- Hemsworth GR, Henrissat B, Davies GJ, Walton PH. 2014. Discovery and characterization of a new family of lytic polysaccharide monoxygenases. *Nat Chem Biol* 10: 122-126.
- Hemsworth GR, Taylor EJ, Kim RQ, Gregory RC, Lewis SJ, Turkenburg J, Parkin A, Davies GJ, Walton PH. 2013. The copperactive site of CBM33 polysaccharide oxygenases. *J Am Chem Soc* 135: 6069-6077.
- Herbert C, O'Connell R, Gaulin E, Salesses V, Esquerré-Tugayé M-T, Dumas B. 2004. Production of a cell wall-associated endopolygalacturonase by *Colletotrichum lindemuthianum* and pectin degradation during bean infection. *Fungal Genet Biol* 41: 140-147.
- Hessel C, Allegre C, Maisseu M, Charbit F, Moulin P. 2007. Guidelines and legislation for dye house effluents, a review. *J Environ Manage* 83: 171-180.

- Hibbett DS & Donoghue MJ. 1995. Progress toward a phylogenetic analysis of the Polyporaceae through parsimony analysis of mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Can J Botany* 73: S583-S861.
- Highley TL, Bar-Lev SS, Kirk TK, Larsen MJ. 1983. Influence of O₂ and CO₂ on wood decay by heartrot and saprot fungi. *Phytopathology* 73: 630-633.
- Highley T L. 1975. Properties of cellulases of two brown-rot fungi and two white-rot fungi. *Wood and Fiber* 6: 275-281.
- Higuchi T. 2006. Look back over the studies of lignin biochemistry. *J Wood Sci* 52: 2-8.
- Hildén K, Hakala TK, Lundell T. 2009. Thermotolerant and thermostable laccases. *Biotechnol Lett* 31: 1117-1128.
- Hildén K, Martínez AT, Hatakka A, Lundell T. 2005. The two manganese peroxidases Pr-MnP2 and Pr-MnP3 of *Phlebia radiata*, a lignin-degrading basidiomycete, are phylogenetically and structurally divergent. *Fungal Genet Biol* 42: 403-19.
- Hildén KS, Bortfeldt R, Hofrichter M, Hatakka A, Lundell TK. 2008. Molecular characterization of the basidiomycete isolate *Nematoloma frowardii* b19 and its manganese peroxidase places the fungus in the corticioid genus *Phlebia*. *Microbiology* 154: 2371-2379.
- Hiscox J, Baldrian P, Rogers HJ, Boddy L. 2010. Changes in oxidative enzyme activity during interspecific mycelial interactions involving the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Fungal Genet Biol* 47: 562-571.
- Hoegger PJ, Kilaru S, James TY, Thacker JR, Kues U. 2006. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *FEBS J* 273: 2308-2326.
- Hoegger PJ, Navarro-Gonzalez M, Kilaru S, Hoffmann M, Westbrook ED, Kues U. 2004. The laccase gene family in *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*). *Curr Genet* 45: 9-18.
- Hofrichter M, Ullrich R, Pecyna MJ, Liers C, Lundell T. 2010. New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. *Appl Microbiol Biotechnol* 87: 871-897.
- Hofrichter M. 2002. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme Microbiol Tech* 30: 454-466.
- Holtzapple M, Cognata M, Shu Y, Hendrickson C. 1990. Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents. *Biotechnol Bioeng* 36: 275-287.
- Holzbaumer EL, Andrawis A, Tien M. 1988. Structure and regulation of a lignin peroxidase gene from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem Biophys Res Commun* 155: 626-633.
- Horn SJ, Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Eijsink VGH. 2012. Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnol Biofuels* 5:45.

- Hou H, Zhou J, Wang J, Du C, Yan B. 2004. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Process Biochem* 39: 1415-1419.
- Hrmova M, Biely P, Vrsanska M. 1986. Specificity of cellulose and β -xylanase induction in *Trichoderma reesei* QM9414. *Arch Microbiol* 144: 307-311.
- Hu J, Arantes V, Pribowo A, Gourlay K, Saddler JN. 2014. Substrate factors that influence the synergistic interaction of AA9 and cellulases during the enzymatic hydrolysis of biomass. *Energy Environ Sci* 7: 2308-2315.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat N, Condemine G, Nasser W, Reverchon S. 1996. Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annu Rev Microbiol* 50: 213-257.
- Humar M & Pohleven F. 2005. Influence of a nitrogen supplement on the growth of wood decay fungi and decay of wood. *Int Biodeter Biodegr* 56: 34-39.
- Ikehata K, Buchanan ID, Smith DW. 2004. Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. *J Environ Eng Sci* 3: 1-19.
- Ishimizu T, Hashimoto C, Takeda R, Fujii K, Hase S. 2007. A novel α 1,2-L-fucosidase acting on xyloglucan oligosaccharides is associated with endo- β -mannosidase. *J Biochem* 142: 721-729.
- Ito T, Yokoyama E, Sato H, Ujita M, Funaguma T, Furukawa K, Hara A. 2003. Xylosidases associated with the cell surface of *Penicillium herquei* IFO 4674. *J Biosci Bioeng* 96: 354-359.
- Janusz G, Kucharzyk K, Pawlik AA, Staszczak M, Paszczynski AJ. 2013. Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: gene expression and regulation. *Enzyme Microb Tech* 52: 1-12.
- Jaouani A, Francisco G, Penninckx JM, Martinez AT. 2005. Role of *Pycnoporus coccineus* laccase in the degradation of aromatic compounds in olive oil mill wastewater. *Enzyme Microb Tech* 36: 478-486.
- Jarosz-Wilkolazka A, Malarczyk E, Pirszel J, Skowronski T, Leonowicz A. 2002a. 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.
- Jarosz-Wilkolazka A, Kochmanska-Rdest J, Malarczyk E, Wardas W, Leonowicz A. 2002b. Fungi and their ability to decolourize azo and anthraquinonic dyes. *Enzyme Microb Tech* 30: 566-572.
- Jadhav JP & Govindwar SP. 2006. Biotransformation of malachite green by *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463. *Yeast* 23: 315-323.
- Jensen MH, Otten H, Christensen U, Borchert TV, Christensen LL, Larsen S, Leggio LL. 2010. Structural and biochemical studies elucidate the mechanism of rhamnoglucuronan lyase from *Aspergillus aculeatus*. *J Mol Biol* 404: 100-111.
- Jiang H & Murmann JP. 2011. Regional institutions, ownership transformation, and migration of industrial leadership in China: the case of the Chinese synthetic dye industry, 1978-2008. *Australian School of Business*

- Johannes C & Majcherczyk A. 2000. Laccase activity tests and laccase inhibitors. *J. Biotechnol* 78: 193-199.
- Johansson M. 1988. Pectic enzyme activity of spruce (S) and pine (P) strains of *Heterobasidion annosum* (Fr.) *Bref Physiol Mol Plant Pathol* 33: 333-349.
- 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 Microb* 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.
- Kaal JEE, Field AJ, Joyce WT. 1995. Increasing ligninolytic enzyme activities in several white-rot basidiomycetes by nitrogen-sufficient media. *Bioresource Tech* 53: 133-139.
- Kadowaki MK, Souza CGM, Simão RCG, Peralta RM. 1997. Xylanase production by *Aspergillus tamarii*. *Appl Biochem Biotechnol* 66: 97-106.
- Kalyani DC, Telke AA, Surwase SN, Jadhav SB, Lee JK, Jadhav JP. 2012. Effectual decolorization and detoxification of triphenylmethane dye malachite green (MG) by *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 2074 and its enzyme system. *Clean Technol Environ Pol* 14: 989-1001.
- Kapich AN, Steffen KT, Hofrichter M, Hatakka A. 2005. Involvement of lipid peroxidation in the degradation of a non-phenolic lignin model compound by manganese peroxidase of the litter-decomposing fungus *Stropharia coronilla*. *Biochem Bioph Res Co* 330: 371-377.
- Karam J & Nicell JA. 1997. Potential application of enzymes in waste treatment. *J Chem Technol Biotechnol* 69: 141-53.
- Karhunen P, Rummakko P, Sipila J, Brunow G, Kilpelainen I. 1995. The formation of dibenzodioxin structures by oxidative coupling. A model reaction for lignin biosynthesis. *Tetrahedron Letter* 36: 4501-4504.
- Karlsson J, Saloheimo M, Siika-Aho M, *et al.* 2001. Homologous expression and characterization of Cel61A (EG IV) of *Trichoderma reesei*. *Eur J Biochem* 268: 6498-507.
- Kartal SN, Munir E, Kakitani T, Imamura Y. 2004. Bioremediation of CCA-treated wood by brown rot fungi *Fomitopsis palustris*, *Coniophora puteana*, and *Laetiporus sulphureus*. *J Wood Sci* 50: 182-8.

- Kaushik P & Malik A. 2009. Fungal dye decolourization: recent advances and future potential. *Environ Int* 35: 127-141.
- Kelley RL & Reddy CA. 1986. Identification of glucose oxidase activity as a primary source of hydrogen peroxide production in ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Microbiol* 414: 248-253.
- Kermnický L & Biely P. 1998. Disaccharides permeases: constituents of xylanolytic and mannanolytic systems of *Aureobasidium pullulans*. *Biochim Biophys Acta* 1425: 560-566.
- Kersten PJ. 1990. Glyoxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: its characterization and activation by lignin peroxidase. *P Natl Acad Sci USA* 87: 2936-2940.
- Khlifi R, Belbahri L, Woodward S, Ellouz M, Dhouib A, Sayadi S, Mechichi T. 2010. Decolourization and detoxification of textile industry wastewater by the laccase-mediator system. *J Hazardous Mater* 175: 802-808.
- Kiiskinen LL. 2004. Characterization and heterologous production of a novel laccase from *Melanocarpus albomyces*. Helsinki, Finland: VTT Publications p.556.
- Kim S, Stahlberg J, Sandgren M, *et al.* 2014. Quantum mechanical calculations suggest that lytic polysaccharide monooxygenases use a copper-oxyl, oxygen-rebound mechanism. *P Natl Acad Sci USA* 111: 149-54.
- Kirk TK & Farrell RL. 1987. Enzymatic combustion: The microbial degradation of lignin. *Annu Rev Microbiol* 41: 465-505.
- Kirk TK. 1981. Toward elucidating the mechanism of action of the ligninolytic system in basidiomycetes. New York: Forest Products Laboratory, Forest Service U.S. Dept. of Agriculture.
- Ko KS. 2000. Phylogenetic study of Polypores based on molecular sequences. Thesis (Supervisor Prof. H.S. Jung) for the Degree of Doctor in Philosophy, School of Biological Sciences, Seoul National University. 324 p.
- Ko KS & Jung HS. 1999. Molecular phylogeny of *Trametes* and related genera. *Antonie van Leeuwenhoek* 75: 191-199.
- Kormelink FJ, Gruppen H, Vietor RJ, Voragen AG. 1993. Mode of action of the xylan-degrading enzymes from *Aspergillus awamori* alkali-extractable cereal arabinoxylans. *Carbohydr Res* 249: 355-367.
- 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 hirsutum* and *Coriolus zonatus*. *Biochim Biophys Acta* 1547: 397-407.
- Koschorreck K, Richter SM, Swierczek A, Beifuss U, Schmid RD, Urlacher VB. 2008. Comparative characterization of four laccases from *Trametes versicolor* concerning phenolic C-C coupling and oxidation of PAHs. *Arch Biochem Biophys* 474: 213-219.
- Kotterman MJJ, Vis EH, Field JM. 1998. Successive mineralization and detoxification of benzo[a]pyrene by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain

- BOS55 and indigenous microflora. *Appl. Environ. Microbiol* 64: 2853-2858.
- Krastanov A, Koleva R, Alexieva Z, Stoilova I. 2013. Decolorization of industrial dyes by immobilized mycelia of *Trametes versicolor*. *Biotechnol Biotec Eq* 27: 4263-4268.
- Kristensen JB, Felby C, Jorgensen H. 2009. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biotechnol Biofuels* 2: 11.
- Kuan IC & Tien M. 1989. Phosphorylation of lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Identification of mannose 6-phosphate. *J Biol Chem* 264: 20350-20355.
- Kubicek CP, Herrera-Estrella A, Seidl-Seiboth V, Martinez DA, Druzhinina IS, Thon M, Zeilinger S, Casas-Flores S, Horwitz BA, Mukherjee PK, Mukherjee M, Kredics L, Alcaraz LD, Aerts A, Antal Z, Atanasova L, Cervantes-Badillo MG, Challacombe J, Chertkov O, McCluskey K, Couplier F, Deshpande N, von Doehren H, Ebbola DJ, Esquivel-Naranjo EU, Fekete E, Flipphi M, Glaser F, Gomez-Rodriguez EY, Gruber S, Han C, Henrissat B, Hermosa R, Hernandez-Onate M, Karaffa L, Kostic I, Le Crom S, Lindquist E, Lucas S, Lubeck M, Lubeck PS, Margeot A, Metz B, Misra M, Nevalainen H, Omann M, Packer N, Perrone G, Uresti-Rivera EE, Salamov A, Schmoll M, Seiboth B, Shapiro H, Sukno S, Tamayo-Ramos JA, Tisch D, Wiest A, Wilkinson HH, Zhang M, Coutinho PM, Kenerley CM, Monte E, Baker SE, Grigoriev IV. 2011. Comparative genome sequence analysis under scores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biol* 12: R40.
- Kubicek CP. 2013. *Fungi and Lignocellulosic Biomass*. Wiley-Blackwell, Oxford, UK. pp. 1-11.
- Kuhar F & Papinutti L. 2014. Optimization of laccase production by two strains of *Ganoderma lucidum* using phenolic and metallic inducers. *Rev Argent Microbiol* 46: 144-149.
- Kulik N, Weignerova L, Filipi T, Pompach P, Novak P, Mrazek H, Slamova K, Bezouska K, Kren V, Etrich R. 2010. The alpha galactosidase type A gene *aglA* from *Aspergillus niger* encodes a fully functional alpha-N-acetylgalactosaminidase. *Glycobiology* 20: 1410-1419.
- Kulkarni N, Shendye A, Rao M. 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* 23: 411-56.
- Kulla HG, Klausener F, Meyer U, Ludeke B, Leisinger T. 1983. Interference of aromatic sulfo groups in the microbial degradation of the azo dyes Orange I and Orange II. *Arch Microbiol* 135: 1-7.
- Kurtz MB & Champe SP. 1982. Purification and characterization of the conidial laccase of *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriology* 151: 1338-1345.
- Laks PE & Hemingway RW. 1992. Plant polyphenols-synthesis, properties, significance - concluding remarks. *Plant Polyphenol Synth Propert Signif* 59: 1035-6.

- Langston JA, Shaghasi T, Abbate E, Sweeney M. 2011. Oxidoreductive cellulose depolymerization by the enzymes cellobiose dehydrogenase and glycoside hydrolase 61. *Appl Environ Microbiol* 77: 7007-7015.
- Lara-Márquez A, Zavala-Páramo MG, López-Romero E, Camacho HC. 2011. Biotechnological potencial of pectinolytic complexes of fungi. *Biotechnol Lett* 33: 859-868.
- Larraya LM, Perez G, Ritter E, Pisabarro AG, Ramirez L. 2000. Genetic linkage map of the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microb* 66: 5290-5300.
- Larsson K-H, Parmasto E, Fischer M, Langer E, Nakasone KN, Redhead SA. 2006. Hymenochaetales: A molecular phylogeny for the hymenochaetoid clade. *Mycologia* 98: 926-936.
- Larsson K-H, Larsson E, Koljalg U. 2004. High phylogenetic diversity among corticioid homobasidiomycetes. *Mycol Res* 108: 983-1002.
- Lawton JH & Jones CG. 1995. Linking species and ecosystems: organisms as ecosystems engineers. En: *Linking Species and Ecosystems*, C.G. Jones and J.H. Lawton, eds. Chapman & Hall, New York, pp. 141-150.
- Leatham GF & Kirk TK. 1983. Regulation of ligninolytic activity by nutrient N in white-rot basidiomycetes. *FEMS Microbiol Lett* 16: 65-67.
- Lechner BE & Papinutti L. 2006. Production of lignocellulosic enzymes during growth and fruiting of the edible fungus *Lentinus tigrinus* on wheat straw. *Process Biochem* 41: 594-598.
- Lee IY, Jung KH, Lee CH, Park YH. 1999. Enhanced production of laccase in *Trametes versicolor* by the addition of ethanol. *Bio-technol Lett* 21: 965-968.
- Lee JS & Lim YW. 2010. *Cerreña aurantipora* sp. Nov. (Polyporaceae) from eastern Asia. *Mycologia* 102: 211-216.
- Lekonougou S, Mounquengui S, Dumarcay S, Rose C, Courty PE, Garbaye J, Gerardin P, Jacquot JP, Gelhaye E, 2008. Initial stages of *Fagus sylvatica* wood colonization by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*: enzymatic characterization. *Int Biodeter Biodegr* 61: 287-293.
- Leonard R, Pabst M, Bondili JS, Chambat G, Veit C, Strasser R, Altmann F. 2008. Identification of an *Arabidopsis* gene encoding a GH95 alpha 1,2-fucosidase active on xyloglucan oligo- and polysaccharides. *Phytochemistry* 69: 1983-1988.
- Leone G & Van den Heuvel. 1987. Regulation by carbohydrates of the sequential in vitro production of pectic enzymes by *Botrytis cinerea*. *Can J Bot* 65: 2133-2141.
- Leonowicz A & Bollag J-M. 1987. Laccases in soil and the feasibility of their extraction. *Soil Biol Biochem* 19: 237-242.
- Lesage-Meessen L, Delattre M, Haon M, Thibault J-F, Ceccaldi BC, Brunerie P, Aster M. 1996. A two-step bioconversion process for vanillin production from

- ferulic acid combining *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *J Biotechnol* 50: 107-113.
- Lestan D, Lestan M, Perdih. 1994. Physiological aspects of biosynthesis of lignin peroxidases by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 60: 606-612.
- Lettera V, Piscitelli A, Leo G, Birolo L, Pezzella C, Sannia G. 2010. Identification of a new member of *Pleurotus ostreatus* laccase family from mature fruiting body. *Fungal Biol* 114: 724-30.
- Levasseur A, Drula E, Lombard V, Coutinho PM, Henrissat B. 2013. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnol Biofuels* 6: 41.
- Levasseur A, Saloheimo M, Navarro D, Andberg M, Pontarotti P, Kruus K, et al. 2010. Exploring laccase-like multicopper oxidase genes from the ascomycete *Trichoderma reesei*: a functional, phylogenetic and evolutionary study. *BMC Biochemistry* 11:32.
- Levin L, Castro MA. 1998. Anatomical study of the decay caused by the white-rot fungus *Trametes trogii* (Aphyllophorales) in wood of *Salix* and *Populus*. *IAWA J* 19: 169-180.
- Levin L & Forchiassin F. 1998. Culture conditions for the production of pectinolytic enzymes by the white-rot fungus *Trametes trogii* on a laboratory scale. *Acta Biotechnol* 18: 157-166.
- Levin L & Forchiassin F. 2007. White-rot fungi, new biotechnological tools for a cleaner environment. *Curr Top Biotechnol* 3: 49-56.
- Levin L, Forchiassin F, Ramos AM. 2002. Copper induction of lignin-modifying enzymes in the white-rot fungus *Trametes trogii*. *Mycologia* 94: 377-383.
- Levin L, Carabajal M, Hofrichter M, Ullrich René. 2016. Degradation of 4-nitrophenol by the white-rot polypore *Trametes versicolor*. *Int Biodeter & Biodegr* 107: 174-179.
- Levin L, Malignani E, Ramos AM. 2010. Effect of nitrogen sources and vitamins on ligninolytic enzyme production by some white-rot fungi. Dye decolorization by selected culture filtrates. *Bioresource Technol* 101: 4554-4563.
- Levin L, Papinutti L, Forchiassin F. 2004. Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorized industrial dyes. *Bioresource Technol* 94: 169-176.
- Levin L, Villalba L, Da Re V. 2007. Comparative studies of loblolly pine biodegradation and enzyme production by Argentinean white rot fungi focused on biopulping processes. *Process Biochem* 42: 995-1002.
- Li Q, Ge L, Cai J, Pei J, Xie J, Zhao L. 2014a. Comparison of two laccases from *Trametes versicolor* for application in the decolorization of dyes. *J Microbiol Biotechnol* 24: 545-555.

- Li Q, Pei J, Zhao L, Xie J, Cao F, Wang G. 2014. Overexpression and characterization of laccase from *Trametes versicolor* in *Pichia pastoris*. *Appl Biochem Microbiol* 50: 140-147.
- Li C, Lou Y, Wan Y, Wang W, Yao J, Zhang B. 2013. Laccase immobilized on topoly (GMA-MAA) microspheres for p-benzenediol removal from wastewater. *Water Sci Technol* 67: 2287-2293.
- 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 K, Xu F, Eriksson KEL. 1999a. Comparison of fungal laccase and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. *Appl Environ Microbiol* 65: 2654-2660.
- Li D, Li N, Ma B, Mayfield MB, Gold MH. 1999b. Characterization of genes encoding two manganese peroxidases from the lignin-degrading fungus *Dichomitus squalens*. *Biochim Biophys Acta* 1434: 356-64.
- Li WF, Zhou XX, Lu P. 2005. Structural features of thermozymes. *Biotech Adv* 23: 271-281.
- Li X, Beeson WT, Phillips CM, *et al.* 2012. Structural basis for substrate targeting and catalysis by fungal polysaccharide monooxygenases. *Structure* 20: 1051-1061.
- Li ZC, Durachko DM, Cosgrove DJ. 1993. *Planta* 191: 349-356.
- Li Y, Jones L, McQueen-Mason S. 2003. Expansins and cell growth. *Curr Opin Plant Biol* 6: 603-610.
- Lin SH & Peng CF. 1994. Treatment of textile wastewaters by electrochemical method. *Water Res* 28: 277-876.
- Lisker N, Katan J, Henis Y. 1975. Sequential production of polygalacturonase, cellulase, and pectin lyase by *Rhizoctonia solani*. *Canadian J Microbiol* 21: 1298-1304.
- Litvintseva AP & Henson JM. 2002. Cloning, characterization, and transcription of three laccase genes from *Gaeumannomyces graminis var. tritici*, the take-all fungus. *Appl Environ Microbiol* 68: 1305-1311.
- Liu J, Cai Y, Liao X, Huang Q, Hao Z, Hu M, Zhang D. 2012. Simultaneous laccase production and color removal by culturing fungus *Pycnoporus* sp. SYBC-L3 in a textile wastewater effluent supplemented with a lignocellulosic waste *Phragmites australis*. *B Environ Contam Tox* 89: 269-273.
- Liu YS, Baker JO, Zeng Y, Himmel ME, Haas T, Ding SY. 2011. Cellobiohydrolase hydrolyzes crystalline cellulose on hydrophobic faces. *J Biol Chem* 286: 11195-11201.

- Lo SC, Ho YS, Buswell JA. 2001. Effects of phenolic monomers on the production of laccases by the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*, and partial characterization of a major laccase components. *Mycologia* 93: 413-421.
- Lobos S, Larrondo L, Salas L, Karahanian E, Vicuna R. 1998. Cloning and molecular analysis of a cDNA and the Cs-mnp1 gene encoding a manganese peroxidase isoenzyme from the lignin-degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Gene* 206:185-193.
- Lobos S, Larrain J, Salas L, Cullen D, Vicuna R. 1994. Isoenzymes of manganese dependent peroxidase and laccase produced by the lignin-degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Microbiology* 140: 2691-2698.
- 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: 618-624.
- Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B. 2014. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res* 42: 490-495.
- Lombard V, Bernard T, Rancurel C, Brumer H, Coutinho PM, Henrissat B. 2010. A hierarchical classification of polysaccharide lyases for glyco-genomics. *Biochem J* 432: 437-444.
- Lopez C, Mielgo I, Moreira MT, Feijoo G, Lema JM. 2002. Enzymatic membrane reactors for biodegradation of recalcitrant compounds. Application to dye decolourisation. *J Biotechnol* 99: 249-257.
- Lorenzo M, Moldes D, Sanromán MA. 2006. Effect of heavy metals on the production of several laccase isoenzymes by *Trametes versicolor* and on their ability to decolourise dyes. *Chemosphere* 63: 912-917.
- Lorenzo M, Moldes D, Rodriguez Couto S, Sanroman A. 2002. Improvement in laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of *Trametes versicolor*. *Bioresource Tech* 82: 109-113.
- Lourenco ND, Novais JM, Pinheiro HM. 2001. Effect of some operational parameters on textile dye biodegradation in a sequential batch reactor. *J Biotechnol* 89: 163-174.
- Lundell TK, Mäkelä MR, Hildén K. 2010. Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycetes: ecological, functional and phylogenetic review. *J Basic Microbiol* 50: 1-16.
- Luo W. 2005. Growth studies of marine and terrestrial lignicolous fungi with special reference to laccase and other lignin-modifying enzyme activities of *Xylariaceous fungi*. Doctoral Thesis, University of Hong Kong.
- Ma FY, Wang JJ, Zeng YL, Yu HB, Yan Y, Zhang XY. 2011. Influence of the co-fungal treatment with two white rot fungi on the lignocellulosic degradation and thermogravimetry of corn stover. *Process Biochem* 46: 1767-1773.

- Maalej-Kammoun M, Zouari-Mechichi H, Belbahri L, et al. 2009. Malachite green decolourization and detoxification by the laccase from a newly isolated strain of *Trametes* sp. *Int Biodeter Biodegr* 63: 600-606.
- Machida M, Asai K, Sano M, Tanaka T, Kumagai T, Terai G, Kusumoto K, Arima T, Akita O, Kashiwagi Y, Abe K, Gomi K, Horiuchi H, Kitamoto K, Kobayashi T, Takeuchi M, Denning DW, Galagan JE, Nierman WC, Yu J, Archer DB, Bennett JW, Bhatnagar D, Cleveland TE, Fedorova ND, Gotoh O, Horikawa H, Hosoyama A, Ichinomiya M, Igarashi R, Iwashita K, Juvvadi PR, Kato M, Kato Y, Kin T, Kokubun A, Maeda H, Maeyama N, Maruyama J, Nagasaki H, Nakajima T, Oda K, Okada K, Paulsen I, Sakamoto K, Sawano T, Takahashi M, Takase K, Terabayashi Y, Wortman JR, Yamada O, Yamagata Y, Anazawa H, Hata Y, Koide Y, Komori T, Koyama Y, Minetoki T, Suharnan S, Tanaka A, Isono K, Kuhara S, Ogasawara N, Kikuchi H. 2005. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature* 438 (7071): 1157-1161.
- 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 Tech* 29: 386-391.
- Majeau J-A, Brar SK, Tyagi RD. 2010. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresource Technol* 101: 2331-2350.
- Mäkelä M, Galkin S, Hatakka A, Lundell T. 2002. Production of organic acids and oxalate decarboxylase in lignin-degrading white rot fungi. *Enzyme Microb Tech* 30: 542-549.
- Manel MK, Hela ZM, Lassaad B, Steve W, Tahar M. 2009. Malachite green decolourization and detoxification by the laccase from a newly isolated strain of *Trametes* sp. *Int Biodeter Biodegr* 63: 600-606.
- Manubens A, Canessa P, Folch C, Avila M, Salas L, Vicuña R. 2007. Manganese affects the production of laccase in the basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispota*. *FEMS Microbiol Lett* 275: 139-145.
- Martinez AT, Speranza M, Ruiz-Dueñas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillén F, Martínez MJ, Gutiérrez A, del Río JC. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbiol, chemicals, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int Microbiol* 8: 195-204.
- Martinez D, Berka RM, Henrissat B, Saloheimo M, Arvas M, BakerSE, Chapman J, Chertkov O, Coutinho PM, Cullen D, DanchinEG, Grigoriev IV, Harris P, Jackson M, Kubicek CP, Han CS, Hol, Larrondo LF, de Leon AL, Magnuson JK, Merino S, Misra M, Nelson B, Putnam N, Robbertse B, Salamov AA, Schmoll M, Terry A, Thayer N, Westerholm-Parvinen A, Schoch CL, Yao J, Barabote R, Nelson MA, Detter C, Bruce D, Kuske CR, Xie G, Richardson P, Rokhsar DS, Lucas SM, Rubin EM, Dunn-Coleman N, Ward M, Brettin TS. 2008. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nat Biotechnol* 26: 553-560.

- Martinez MJ, Muñoz C, Guillén F, Martínez AT. 1994. Studies on homoveratric acid transformation by the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. Appl Microbiol Biotechnol 41: 500-504.
- Martinez MJ, Alconada MT, Gillen F, Vasquez C, Reyes F. 1991. Pectic activities from *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*: purification and characterization of an exopolygalacturonase. FEMS Microbiol Lett 81: 145-150.
- Martinez MJ, Martinez R, Reyes F. 1988. Effect of pectin on pectinases of *Botrytis cinerea*. Mycopathologia 102: 37-43.
- Martínez-Morales F, Bertrand B, Pasi6n Nava AA, Tinoco R, Acosta-Urdapilleta L, Trejo-Hernández MR. 2015. Production, purification and biochemical characterization of two laccase isoforms produced by *Trametes versicolor* grown on oak sawdust. Biotechnol Lett 37: 391-396.
- Martins ES, Silva D, Silva RD, Gomez E. 2002. Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. Process Biochem 37: 949-954.
- Master ER, Zheng Y, Storms R, Tsang A, Powlowski J. 2008. Axyloglucan-specific family 12 glycosyl hydrolase from *Aspergillus niger*: recombinant expression, purification and characterization. Biochem J 411: 161-170.
- Matsunaga T, Ishii T, Matsumoto S, Higuchi M, Darvill A, Albersheim P, O'Neill MA. 2004. Occurrence of the primary cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II in pteridophytes, lycophytes, and bryophytes. Implication for the evolution of vascular plants. Plant Physiol 134: 339-51.
- Mauseth JD. 1988. Plant Anatomy. The Benjamin Cummings Publishing Company.
- Mayans O, Scott M, Connerton I, Gravesen T, Benen J, Visser J, Pickersgill R, Jenkins J. 1997. Two crystal structure of pectin lyase A from *Aspergillus* reveal a pH driven conformational change and striking divergence in the substrate-binding clefts of pectin and pectate lyases. Structure 5: 677-689.
- 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.
- McQueen-Mason S & Cosgrove DJ. 1994. Disruption of hydrogen bonding between plant cellwall polymers by proteins that induce wall extension. Proc Natl Acad Sci USA 91: 6574-6578.
- McQueen-Mason S, Durachko DM, Cosgrove DJ. 1992. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. Plant Cell 4: 1425-1433.
- Mechichi T, Mhiri N, Sayadi S. 2005. Remazol brilliant blue R decolorization by the laccase from *Trametes trogii*. Chemosphere 64: 998-1005.
- Melignani E. 2007. Estudio del efecto de fuentes nitrogenadas y vitaminas sobre la producci6n de enzimas lignocelulolíticas y la degradaci6n de colorantes industriales por hongos causantes de pudrici6n blanca.

Tesis de Licenciatura. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

- Mester TA & Field AJ. 1997. Optimization of manganese peroxidase production by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. Strain BOS55. *FEMS Microbiol Lett* 155: 161-168.
- Meyer KH & Misch L. 1937. Position des atome dans le nouveau modele spatiale de la cellulose. *Helv Chim Acta* 20: 232-245.
- Meza JC, Auria R, Lomascolo A, Sigoillot J, Casalot L. 2007. Role of ethanol on growth, laccase production and protease activity in *Pycnoporus cinnabarinus* ss3. *Enzyme Microb Tech* 41: 162-168.
- Michniewicz A, Ledakowicz S, Ullrich R, Hofrichter M. 2008. Kinetics of the enzymatic decolorization of textile dyes by laccase from *Cerrena unicolor*. *Dyes Pigm* 77: 295-302.
- Miki Y, Ichinose H, Wariishi H. 2010. Molecular characterization of lignin peroxidase from the white-rot basidiomycete *Trametes cervina*: a novel fungal peroxidase. *FEMS Microbiol Lett* 304: 39-46.
- Mikiashvili N, Wasser SP, Nevo E, Elisashvili V. 2006. Effects of carbon and nitrogen sources on *Pleurotus ostreatus* ligninolytic enzyme activity. *World J Microbiol Biotechnol* 22: 999-1002.
- 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.
- Minic Z & Jouanin L. 2006. Plant glycoside hydrolases involved incell wall polysaccharide degradation. *Plant Physiol Biochem* 44: 435-449.
- Minussi RC, Miranda MA, Silva JA, Ferreira CV, Aoyama H, Marangoni S, Rotilio D, Pastore GM, Duran N. 2007. Purification, characterization and application of laccase of *Trametes versicolor* for colour and phenolic removal of olive mill wastewater in the presence of 1-hydroxybenzotriazole. *African J Biotechnol* 6: 1248-1254.
- Mohnen D. 2008. Pectin structure and biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* 11: 266-277.
- Moldes D & Sanromán MA. 2006. Amelioration of the ability to decolorize dye by laccase: relationship between redox mediators and laccase isoenzymes in *Trametes versicolor*. *World J Microbiol Biotechnol* 22: 1197-1204.
- Moldes D, Lorenzo M, Sanromán MA. 2004. Different proportion of laccase isoenzymes produced by submerged cultures of *Trametes versicolor* grown on lignocellulosic wastes. *Biotechnol Lett* 26: 327-330
- Montenecourt BS, Nhlapo SK, Trimino-Vasquez H, Cuskey S, Schambert DH, Eveleigh DE. 1981. Regulatory controls in relation to over production of fungal cellulases, p. 33-53. En A. Hollaender, R. Rabson, P. Rogers, A. San Pietro, R. Valentine, and R. Wolfe (ed.), *Trends in the biology of fermentations for fuels and chemicals*. Plenum Publishing Corp New York.

- More SS, Renuka PS, Pruthvi K, Swetha M, Malini S, Veena SM. 2011. Isolation, purification, and characterization of fungal laccase from *Pleurotus* sp. Enzyme Research, article ID 248735, 7 pages.
- Moreira MT, Viacava C, Vidal G. 2004. Fed-batch decolorization of Poly R-478 by *Trametes versicolor*. B. Arch Biol Technol 47: 179-183.
- Moreira MT, Palma C, Mielgo I, Feijoo G, Lema JM. 2001. In vitro degradation of a polymeric dye (Poly R-478) by manganese peroxidase. Biotechnol Bioeng 3: 362-368.
- Moreira Neto SL, Esteves PJ, Santos VTO, Paranhos AP, Cescato F, Vitali VM, Machado KMG. 2011. Novel salt and alkali tolerant neotropical basidiomycetes for dye decolorisation in simulated textile effluent. World J Microbiol Biotechnol 27: 2665-2673.
- Morgenstern I, Powlowski J, Tsang A. 2014. Fungal cellulose degradation by oxidative enzymes: from dysfunctional GH61 family to powerful lytic polysaccharide monooxygenase family. Brief Funct Genomics. 13: 471-481.
- Morgenstern I, Robertson DL, Hibbett DS. 2010. Characterization of three mnp genes of *Fomitiporia mediterranea* and report of additional class II peroxidases in the order *Hymenochaetales*. Appl Environ Microbiol 76: 6431-6440.
- Mouso N, Papinutti L, Forchiassin F. 2003. Efecto combinado del cobre y pH inicial del medio de cultivo sobre la producción de lacasa y manganeso peroxidasa por *Stereum hirsutum* (Willd) Pers. Rev Iberoam Micol 20: 176-178.
- Mozolowski GA & Connerton IF. 2009. Characterization of a highly efficient heterodimeric xylosidase from *Humicola insolens*. Enzyme Microb Tech 45: 436-442.
- 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.
- Murugesan K, Yang I-H, Kim Y-M, Jeon J-R, Chang Y-S. 2009. Enhanced transformation of malachite green by laccase of *Ganoderma lucidum* in the presence of natural phenolic compounds. Appl Microbiol Biotechnol 82: 341-350.
- Murugesan K, Nam I-H, Kim Y-M, Chang Y-S. 2007. Decolorization of reactive dyes by a thermostable laccase produced by *Ganoderma lucidum* in solid state culture. Enzyme Microb Tech 20: 1662-1672.
- Mutter M, Beldman G, Pitson SM, Schols HA, Voragen AG. 1998. Rhamnogalacturona alpha-D-galactopyranosyluronohydrolase. An enzyme that specifically removes the terminal nonreducing galacturonosyl residues in rhamnogalacturonan regions of pectin. Plant Physiol 117: 153-163.
- Myasoedova NM, Chernykh AM, Psurtseva NV, Belova NV, Golovleva LA. 2008. New efficient producers of fungal laccases. Appl Biochem Microbiol 44: 73-77.

- Nagai M, Sakamoto Y, Nakade K, Sato T. 2007. Isolation and characterization of the gene encoding a manganese peroxidase from *Lentinula edodes*. *Mycoscience* 48:125-130.
- Nelson NJ. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J Biochem* 153: 375-380.
- Nevalainen KMH & Palva ET. 1978. Production of extracellular enzymes in mutants isolated from *Trichoderma viride* unable to hydrolyze cellulose. *Appl Environ Microbiol* 35: 11-16.
- Nicell JA, Bewtra JK, Biswas N, Taylor E. 1993. Reacto development for peroxidase catalysed polymerisation and precipitation of phenols from wastewater. *Water Res* 27: 1629-39.
- Niebisch CH, Foltran C, Campos Serra Dominguez R, Paba J. 2014. Assesment of *Heteroporus biennis* secretion extracts for decolorization of textile dyes. *Int Biodeter Biodegr* 88: 20-28.
- Nutt A, Sild V, Pettersson G, Johansson G. 1998. Progress curves – a mean for functional classification of cellulases. *Eur J Biochem* 258: 200-206.
- Nyanhongo GS, Gomez J, Gubitz G, Zvanya R, Read JS, Steiner W. 2002. Production of laccase by a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Bioresource Tech* 84: 259-263.
- O'Sullivan AC. 1997. Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose* 4: 173-207.
- Okamoto K, Ito Y, Shigematsu I, Yanagi SO, Yanase H. 2003. Cloning and characterization of a laccase gene from the white-rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Mycoscience* 44: 11-17.
- Olivares-Hernandez R, Sunner H, Frisvad JC, Olsson L, Nielsen J, Panagiotou G. 2010. Combining substrate specificity analysis with support vector classifiers reveals feruloyl esterase as a phylogenetically informative protein group. *PLoS One* 5(9): e12781.
- Orfila C, Sorensen SO, Harholt J, Geshi N, Crombie H, Truong HN, Reid JS, Knox JP, Scheller HV. 2005. QUASIMODO1 is expressed in vascular tissue of *Arabidopsis thaliana* inflorescence stems, and affects homogalacturonan and xylan biosynthesis. *Planta* 222: 613-622.
- Osorio Echavarría J, Vidal Benavides AI, Quintero Díaz JC. 2012. Decolorization of textile wastewater using the white rot fungi anamorph R1 of *Bjerkandera* sp. *Revista de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Antioquia* 57: 85-93.
- Ottoni C, Lima L, Santos C. 2014. Effect of different carbon sources on decolourisation of an industrial textile dye under alkaline-saline conditions. *Curr Microbiol* 68: 53-58.
- Pakshirajan K & Kheria S. 2012. Continuous treatment of coloured industry wastewater using immobilized *Phanerochaete chrysosporium* in a rotating biological contactor reactor. *J Environ Manage* 101: 118-123.
- Palmieri G, Bianco C, Cennamo G, Giardina P, Marino G, Monti M, Sannia G. 2001. Purification characterization and functional role of a novel extracellular

- protease from *Pleurotus ostreatus*. Appl Environ Microbiol 67: 2754-2759.
- 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.
- Pant D, Singh A, Satyawali Y, Gupta RK. 2008. Effect of carbon and nitrogen source amendment on synthetic dyes decolourizing efficiency of white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. J Environ Biol 29: 79-84.
- Papinutti L, Dimitriu P, Forchiassin F. 2008. Stabilization studies of *Fomes sclerodermeus* laccases. Bioresource Technol 99: 419-424.
- Papinutti VL & Forchiassin F. 2004. Modification of malachite green by *Fomes sclerodermeus* and reduction of toxicity to *Phanerochaete chrysosporium*. FEMS Microbiol Lett 231: 205-209.
- Papinutti VL & Forchiassin F. 2006. Enzymes of white rot fungi involved in lignin degradation. Rev Argent Microbiol 32: 83-88.
- Papinutti VL, Mouso N, Forchiassin F. 2006. Removal and degradation of the fungicide dye malachite green from aqueous solution using the system wheat bran-*Fomes sclerodermeus*. Enzyme Microb Tech 39: 848-853.
- Papinutti VL. 2003. Enzimas Ligninolíticas en *Fomes sclerodermeus*. (Tesis doctoral). Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
- Paszczynski A, Huynh V-B, Crawford R. 1986. Comparison of ligninase-I and peroxidase-M2 from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Arch Biochem Biophys 244: 750-765.
- Pease EA, Andrawis A, Tien M. 1989. Manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Primary structure deduced from cDNA sequence. J Biol Chem 264: 13531-13535.
- 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. 1993. Role of organic acid chelators in manganese regulation of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl Biochem Biotechnol 39-40: 227-238.
- Perez-Boada M, Ruiz-Dueñas FJ, Pogni R, Basosi R, Choinowski T, Martinez M, Piontek K, Martinez AT. 2005. Versatile peroxidase oxidation of high redox potential aromatic compounds: site-directed mutagenesis, spectroscopic and crystallographic investigation of three long-range electron transfer pathways. J Mol Biol 354: 385-402.
- Periasamy R & Palvannan T. 2010. Optimization of laccase production by *Pleurotus ostreatus* IMI 395545 using the Taguchi DOE methodology. J Basic Microbiol. 50: 1-9.
- Petrescu S, Hulea SA, Stan R, Avram D, Herlea V. 1992. A Yeast-strain that used galacturonic acid as a substrate for l-ascorbic-acid biosynthesis. Biotechnol Lett 14: 1-6.

- Pezzella C, Lettera V, Piscitelli A, Giardina P, Sannia G. 2012. Transcriptional analysis of *Pleurotus ostreatus* laccase genes. *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 705-17.
- Pezzella C, Autore F, Giardina P, Piscitelli A, Sannia G, Faraco V. 2009. The *Pleurotus ostreatus* laccase multi-gene family: isolation and heterologous expression of new family members. *Curr Genetics* 55: 45-57.
- Phillips CM, Beeson WT, Cate JH, Marletta MA. 2011. Cellobiose dehydrogenase and a copper-dependent polysaccharide monooxygenase potentiates cellulose degradation by *Neurospora crassa*. *ACS Chem Biol* 6: 1399-1406.
- Ping W, Xuerong F, Li C, Qiang W, Aihui Z. 2008. Decolorization of reactive dyes by laccase immobilized in alginate/gelatin blend with PEG. *J Environ Sci* 20: 1519-1522.
- Pintos AP, Serrano C, Pires T, Mestrinho E, Dias L, Martins Teixeira D, Caldeira A.T. 2012. Degradation of terbuthylazine, difenoconazole and pendimethalin pesticides by selected fungi cultures. *Sci Total Environ* 435-436: 402-410.
- Piontek K, Antorini M, Choinowski T. 2002. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *J Biol Chem* 277: 37663-37669.
- Piscitelli A, Giardina P, Lettera V, Pezzella C, Sannia G, Faraco V. 2011. Induction and transcriptional regulation of laccases in fungi. *Curr Genomics* 12: 104-112.
- Piscitelli A, Pezzella C, Giardina P, Faraco V, Giovanni S. 2010. Heterologous laccase production and its role in industrial applications. *Bioengineered Bugs* 1(4): 252-262.
- Placková M, Svobodová K, Cajthaml T. 2012. Laccase activity profiling and gene expression in PCB-degrading cultures of *Trametes versicolor*. *Int Biodeter Biodegr* 71: 22-28.
- Pocsi I, Prade RA, Penninckx MJ. 2004. Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Adv Microbial Physiol* 49: 1-76.
- Pohleven F, Humar M, Amartei S, Benedik J. 2002. Tolerance of wood decay fungi to commercial copper based wood preservatives. International Research Group on Wood Preservation, IRG/WP/3029, Stockholm, Sweden.
- Pointing SB, Jones EBG, Vrijmoed LLP. 2000. Optimization of laccase production by *Pycnoporus sanguineus* in submerged liquid cultures. *Mycologia* 92: 139-144.
- Pointing SB, Parungao MM, Hyde KD. 2003. Production of wood-decay enzymes, mass loss and lignin solubilization in wood by tropical *Xylariaceae*. *Mycol Res* 107: 231-235.
- Pointing SB. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 57: 20-33.

- Polizeli ML, Rizzatti AC, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA, Amorim DS. 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 67: 577-591.
- Pollet A, Delcour JA, Courtin CM. 2010. Structural determinants of the substrate specificities of xylanases from different glycoside hydrolase families. *Crit Rev Biotechnol* 30: 176-191.
- Popper ZA. 2008. Evolution and diversity of green plant cell walls. *Curr Opin Plant Biol* 11: 286-92.
- Powlowski J, Mahajan S, Schapira M, Master ER. 2009. Substrate recognition and hydrolysis by a fungal xyloglucan-specific family 12 hydrolase. *Carbohydr Res* 344: 1175-1179.
- Pozdnyakova N, Makarov O, Chernyshova M, Turkovskaya O, Jarosz-Wilkolazka A. 2013. Versatile peroxidase of *Bjerkandera fumosa*: Substrate and inhibitor specificity. *Enzyme Microb Tech* 52: 44-53.
- Prenosilová L, Kresinová Z, Slavíková Amemori A, Cajthaml T, Svobodová K. 2013. Transcriptional response of lignin-degrading enzymes to 17 α -ethinyloestradiol in two white rots. *Microb Biotechnol* 6: 300-306.
- 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.
- Quarantino D, Ciaffi M, Federici E, D'Annibale A. 2008. Response surface methodology study of laccase production in *Panus tigrinus* liquid cultures. *Biochem Eng J* 39: 236-245.
- Quinlan RJ, Sweeney MD, Lo Leggio L, Otten H, Poulsen J-C N, Johansen KS, Krogh KBRM, Jorgensen CI, Tovborg M, Anthonsen A, Tryfona T, Walter CP, Dupree P, Xu F, Davies GJ, Walton PH. 2011. Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 15079-15084.
- Quiroz-Castañeda RE & Folch-Mallol JL. 2011. Plant cell wall degrading and remodeling proteins: current perspectives. *Biotechnología Aplicada* 28: 205-215.
- Quiroz-Castañeda RE, Martínez-Anaya C, Cuervo-Soto LI, Segovia L, Folch-Mallol JL. 2011. Loosenin, a novel protein with cellulose-disrupting activity from *Bjerkandera adusta* *Microb Cell Fact* 10: 8.
- Rabinovich ML, Bolobova AV, Vasilchenko LG. 2004. Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: a review. *Appl Biochem Microbiol* 40: 1-17.
- Raghukumar C, D'souza TD, Verma AK. 2008. Treatment of coloured effluents with lignin-degrading enzymes: an emerging role of marine derived fungi. *Crit Rev Microbiol* 34: 189-206.

- 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.
- 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.
- Rajchenberg M. 2011. Nuclear behavior of the mycelium and the phylogeny of polypores (Basidiomycota). *Mycologia* 103: 677-702.
- Ramos AM, Gally M, García M, Levin L. 2010. Pectinolytic enzyme production by *Collectotrichum truncatum*, causal agent of soybean anthracnose. *Revista Iberoamericana de Micología* 27: 186-190.
- Ramsay JA & Nguyen T. 2002. Decoloration of textile dyes by *Trametes versicolor* and its effects on dye toxicity. *Biotechnol Lett* 24: 1757-1761.
- Ravanal MC, Callegari E, Eyzaguirre J. 2010. Novel Bifunctional α -L-Arabinofuranosidase/Xylobiohydrolase (ABF3) from *Penicillium purpurogenum*. *Appl Environ Microbiol* 76: 5247-5253.
- Reczey K, Brumbauer A, Bollok M, Szengyel Z, Zacchi G. 1998. Use of hemicellulose hydrolysate for beta-glucosidase fermentation. *Appl Biochem Biotechnol* 70-72: 225-235.
- Reddy CA. 1993. An overview of the recent advances on the physiology and molecular biology of lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. *J Biotechnol* 30: 91-107.
- Reid ID. 1995. Biodegradation of lignin. *Can J Bot* 73: S1011-S1018.
- Reiter WD. 2002. Biosynthesis and properties of the plant cell wall. *Curr Opin Plant Biol* 5: 536-42.
- Revankar MS & Lele SS. 2006. Enhanced production of laccase using a new isolate of white-rot fungus WR-1. *Process Biochem* 41: 581-588.
- Riou C, Salmon JM, Vallier MJ, Gunata Z, Barre P. 1998. Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant beta-glucosidase from *Aspergillus oryzae*. *Appl Environ Microbiol* 64: 3607-3614.
- Ritch Jr TG, Nipper VJ, Akileswaran L, Smith AJ, Pribnow DG, Gold MH. 1991. Lignin peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* is synthesized as a preproenzyme. *Gene* 107: 119-26.
- Robinson T, McMullan G, Marchant R, Nigam P. 2001. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresour Tech* 77: 247-255.
- Rodríguez Couto SR, Sanromán MA, Gübitz GM. 2005. Influence of redox mediators and metal ions on synthetic acid dye decolorization by crude laccase from *Trametes hirsuta*. *Chemosphere* 58: 417-422.
- Rodríguez E, Ruiz-Duenas FJ, Kooistra R, Ram A, Martínez AT, Martínez MJ. 2008.

- Isolation of two laccase genes from the white-rot fungus *Pleurotus eryngii* and heterologous expression of the pel3 encoded protein. *J Biotechnol* 134: 9-19.
- Rodriguez-Couto S. 2013. Treatment of textile wastewater by white-rot fungi: still a far away reality?. *Textiles and Light Industrial Sci Technol (TLIST)* 2: 133-119.
- Rogalski J, Lundell T, Leonowicz A, Hatakka A. 1991. Production of laccase, lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase by various strains of *Trametes versicolor* depending on culture conditions. *Acta Microbiol Polonica* 40: 221-234.
- Rombouts FM & Pilnik W. 1978. Enzymes in fruit and vegetable juice technology. *Process Biochem* 18: 9-13.
- Rose JK, Saladié M, Catalá C. 2004. The Plot thickens: new perspectives of primary cell wall modification. *Curr Opin Plant Biol* 7: 296-301.
- 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.
- Royer JC & Nakas JP. 1990. Interrelationship of xylanase induction and cellulose induction of *Trichoderma longibrachiatum*. *Appl Environ Microbiol* 56: 2535-2539.
- Royer JC & Nakas JP. 1989. Generation of extracellular xylanase activity by *Trichoderma longibrachiatum*. *Enzyme Microb Tech* 11: 405-410.
- Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ, Martínez AT. 1999. Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Mol Microbiol* 31: 223-235.
- Ruttimann C, Schwember E, Salas L, Cullen D, Vicuna R. 1992. Ligninolytic enzymes of the white-rot basidiomycetes *Phlebia brevispora* and *Ceriporiopsis subvermispora*. *Biotechnol Appl Biochem* 16: 64-76.
- Ryabova O, Vrsanska M, Kaneko S, van Zyl WH, Biely P. 2009. A novel family of hemicellulolytic alpha-glucuronidase. *FEBS Lett* 583: 1457-1462.
- Saddler JN, Hogan CM, Louis-Seize G. 1985. A comparison between the cellulose systems of *Trichoderma harzianum* and *T. reesei* C30. *Appl Microbiol Biotechnol* 22: 139-145.
- Saha BC. 2000. α -L-Arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. *Biotechnol Adv* 18: 403-423.
- Saloheimo M, Paloheimo M, Hakola S, Pere J, Swanson B, Nyssönen E, Bhatia A, Ward M, Penttilä M. 2002. Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. *Eur J Biochem* 269: 4202-4211.
- Sampedro J & Cosgrove DJ. 2005. The expansin superfamily. *Genome Biol* 6: 242.

- Sangeeta P, Kheria S, Pakshirajan K. 2011. Biodecolourization of real textile industry wastewater using white-rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. J Sci Industrial Res 70: 982-986.
- Sanlier SH, Gider S, Koprulu A. 2013. Immobilization of laccase for biotechnology applications. Artif Cells Nanome Biotechnol 41: 259-263.
- Saparrat M, Balatti PA, Martínez MJ, Jurado M. 2010. Differential regulation of laccase gene expression in *Corioloopsis rigida* LPSC No. 232. Fungal Biol 114: 999-1006.
- Sari AA, Tachibana S, Muryanto. 2012. Correlation of ligninolytic enzymes from the newly-found species *Trametes versicolor* U97 with RBBR decolorization and DDT. Water Air Soil Pollut 223: 5781-5792.
- Sarkanen KV & Hergert HL. 1971. Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reaction. K. V. Sarkanen and C. H. Ludwig (eds.) Wiley Science, New York.
- Savoie J-M, Mata G, Billette C. 1998. Extracellular laccase production during hyphal interactions between *Trichoderma* sp. and Shiitake, *Lentinula edodes*. Appl Microbiol Biotechnol 49: 589-593.
- Scheel T, Höfer M, Ludwig S, Hölker 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.
- Scheller HV & Ulvskov P. 2010. Hemicelluloses. Annu Rev Plant Biol 61: 263-289.
- Schmidhalter DR & Canevascini G. 1993. Isolation and characterization of the cellobiose dehydrogenase from the brown-rot fungus *Coniophora puteana* (Schum ex Fr.) Karst. Arch Biochem Biophys 300: 559-563.
- Schnick RA. 1988. The impetus to register new therapeutics for aquaculture. Prog Fish Cult 50: 190-196.
- Shah AR & Madamwar D. 2005. Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. Process Biochem 40: 1763-1771.
- Shakhovaa NV, Golenkinab SA, Stepanovab EV, Loginovb DS, Psurtsevaa NV, Fedorovab TV, Korolevab OV. 2011. Effect of submerged cultivation conditions and inducers on biosynthesis of extracellular laccase by a *Trametes versicolor* 1666 strain. Appl Biochem Microbiol 47: 808-816.
- Shin M, Nguyen T, Ramsay J. 2002. Evaluation of support materials for the surface immobilization and decoloration of Amaranth by *Trametes versicolor*. Appl Microbiol Biotechnol 60: 218-223.
- Shuttleworth KL, Postie L, Bollag J-M. 1986. Production of induced laccase by the fungus *Rhizoctonia praticola*. Can J Microbiol 32: 867-870.
- Sierra-Alvarez R. 2009. Removal of copper, chromium and arsenic from preservative-treated wood by chemical extraction fungal bioleaching. Waste Manag 29: 1885-1891.

- Sierra-Alvarez R. 2007. Fungal bioleaching of metals in preservative-treated wood. *Process Biochem* 42: 798-804.
- Singh AD & Kumar SR. 2010. Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. *Appl Biochem Biotechnol* 160: 1760-1788.
- Singh AP & Singh T. 2014. Biotechnological applications of wood-rotting fungi: A review. *Biomass Bioenerg* 62: 198-206.
- Singh P, Sulaiman O, Hashima R, Peng LC, Singh RP. 2013. Evaluating biopulping as an alternative application on oil palm trunk using the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Int Biodeter Biodegr* 82: 96-103.
- Singh S & Pakshirajan K. 2010. Enzyme activities and decolourization of single and mixed azo dyes by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Int Biodeter Biodegr* 64: 146-150.
- Soares GMB, Costa-Ferreira M, Amorim MTP. 2001. Use of laccase together with redox mediators to decolorize Remazol Brilliant Blue R. *J Biotechnol* 89: 123-129.
- Soden DM & Dobson AD. 2001. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. *Microbiolgy* 147: 1755-1763.
- Soden DM & Dobson AD. 2003. The use of amplified flanking region-PCR in the isolation of laccase promoter sequences from the edible fungus *Pleurotus sajor-caju*. *J Appl Microbiol* 95: 553-562.
- Somogyi MJ. 1952. Notes on sugar determination. *J Biol Chem* 195: 19-23.
- Souza CGM, Tychanowicz GK, Souza DF, Peralta RM. 2004. Production of laccase isoforms by *Pleurotus pulmonarius* in response to presence of phenolic and aromatic compounds. *J Basic Microbiol* 44: 129-136.
- Souza-Cruz PB, Freer J, Siika-Aho M, Ferraz A. 2004. Extraction and determination of enzymes produced by *Ceriporiopsis subvermispota* during biopulping of *Pinus taeda* wood chips. *Enzyme Microb Tech* 34: 228-234.
- Spadaro JT, Gold MH, Renganathan V. 1992. Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 58: 2397-2401.
- Sprey B & Bochem HP. 1993. Formation of cross-fractures in cellulose microfibril structure by an endoglucanase-cellobiohydrolase complex from *Trichoderma reesei*. *FEMS Microbiol Lett* 106: 239-243.
- Srivastava S, Sinha R, Roy D. 2004. Toxicological effects of malachite green. *Aquatic Tox* 66: 319-329.
- Stoilova I, Krastanov A, Stanchev V. 2010. Properties of crude laccase from *Trametes versicolor* produced by solid-substrate fermentation. *Adv Biosci Biotechnol* 1: 208-215.
- Stokke DD, Groom LH. 2006. Characterization of the cellulosic cell wall. April 2006, Wiley-Blackwell. ISBN: 978-0-8138-0439-2. 296 pages.

- Strobel RJ & 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.
- Strong PJ. 2011. Improved laccase production by *Trametes pubescens* MB89 in distillery wastewaters. *Enzyme Res* 2011: 1-8.
- Sugano Y, Muramatsu R, Ichiyanagi A, Sato T, Shoda M. 2007. DyP, a unique dye-decolorizing peroxidase, represents a novel heme peroxidase family: ASP171 replaces the distal histidine of classical peroxidases. *J Biol Chem* 282: 36652-36658.
- Sugano Y. 2009. DyP-type peroxidases comprise a novel heme peroxidase family. *Cell Moll Life Sci* 66: 1387-1403.
- Sun X, Zhang R, Zhang Y. 2004 Production of lignocellulolytic enzymes by *Trametes gallica* and detection of polysaccharide hydrolase and laccase activities in polyacrylamide gels. *J Basic Microbiol* 44: 220-231.
- Sundaramoorthy M, Kishi K, Gold MH, Poulos TL. 1994. Preliminary crystallographic analysis of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *J Mol Bio* 238: 845-848.
- Swamy J & Ramsay JA. 1999. Effects of Mn⁺² and NH₄⁺ concentrations on laccase and manganese peroxidase production and Amaranth decoloration by *Trametes versicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol* 51: 391-396.
- Taboada-Puig R, Lú-Chau TA, Moreira MT, Feijoo G, Lema JM. 2013. Activation of kraft lignin by an enzymatic treatment with a versatile peroxidase from *Bjerkandera* sp. R1. *Appl Biochem Biotechnol* 169: 1262-1278.
- Taboada-Puig R, Lú-Chau T, Moreira MT, Feijoo G, Martínez MJ, Lema JM. 2011. A new strain of *Bjerkandera* sp. production, purification and characterization of versatile peroxidase. *World J Microbiol Biotechnol* 27: 115-122.
- Tanaka K, Tsumura Y, Nakamura T. 1999. Development and polymorphism of microsatellite markers for *Fagus crenata* and the closely related species, *F. japonica*. *Theor Appl Genet* 99: 11-15
- TAPPI method. 1983. Acid insoluble lignin in wood and pulp T222 om-83.
- Tatarko M & Bumpus JA. 1998. Biodegradation of Congo Red by *Phanerochaete chrysosporium*. *Water Res* 32: 1713-1717.
- 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.
- Tekere M, Mswaka AY, Zvauya R, Read JS. 2001b. Growth, dye degradation and ligninolytic activity studies on Zimbabwean white rot fungi. *Enzyme Microbiol Technol* 28: 420-426.
- Teller JD. 1950. Measurement of amylase activity. *J Biol Chem* 185: 701-704.

- Tellez-Tellez M, Sanchez C, Díaz R, Díaz-Godinez G. 2012. Zymogram patterns of extracellular laccases of *Pleurotus* species grown on non-inducer agar medium. *Rev Mex Ing Quím* 11: 383-388.
- Tello M, Corsini G, Larrondo LF, Salas L, Lobos S, Vicuna R. 2000. Characterization of three new manganese peroxidase genes from the ligninolytic basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Biochim Biophys Acta* 1490: 137-44.
- 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.
- Tenkanen M, Makkonen M, Perttula M, Viikari L, Teleman A. 1997. Action of *Trichoderma reesei* mannanase on galactoglucomannan in pine kraft pulp. *J Biotechnol* 57: 191-204.
- Terrón MC, González T, Carbajo JM, Yagüe S, Arana-Cuenca A, Téllez A, Dobson AD, González AE. 2004. Structural close-related aromatic compounds have different effects on laccase activity and on lcc gene expression in the ligninolytic fungus *Trametes* sp. I-62. *Fungal Genet Biol* 41: 954-962.
- Thurston CF. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiol* 140: 19-26.
- Tien M & Kirk TK. 1983. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Science* 221: 661-663.
- Tien M. 1987. Properties of the ligninase from *Phanerochaete chrysosporium* and their possible applications. *CRC Crit Rev Microbiol* 15: 141-168.
- Tong P, Hong Y, Xiao Y, Zhang M, Tu X, Cui T. 2007. High production of laccase by a new basidiomycete, *Trametes* sp. *Biotechnol Lett* 29: 295-301.
- Tsujiyama S & Minami M. 2005. Production of phenol-oxidizing enzymes in the interaction between white-rot fungi. *Mycoscience* 46: 268-271.
- Unal YD & Pazarlioglu NK. 2011. Production and gelatin entrapment of laccase from *Trametes versicolor* and its application to quantitative determination of phenolic contents of commercial fruit juices. *Food Biotechnol* 25: 351-368.
- 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 Biotechnol* 39: 788-794.
- Urzúa U, Kersten PJ, 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.
- Urzua U, Fernando Larrondo L, Lobos S, Larrain J, Vicuna R. 1995. Oxidation reactions catalyzed by manganese peroxidase isoenzymes from *Ceriporiopsis subvermispora*. *FEBS Letters* 371: 132-136.

- Utkarsha S & Jadhav J. 2011. Detoxification of malachite green and textile industrial effluent by *Penicillium ochrochloron*. *Biotechnol Bioprocess Eng* 16:196.
- Uzan E, Nousiainen P, Balland V, Sipila J, Piumi F, Navarro D, Asther M, Record E, Lomascolo A. 2010. High redox potential laccases from the ligninolytic fungi *Pycnoporus coccineus* and *Pycnoporus sanguineus* suitable for white biotechnology: from gene cloning to enzyme characterization and applications. *J Appl Microbiol* 108: 2199-2213.
- Vaaje-Kolstad G, Bohle LA, Gaseidnes S, Bjorn D, Bjoras M, Mathiesen G, Eijsink VG. 2012. Characterization of the chitinolytic machinery of *Enterococcus faecalis* V583 and high-resolution structure of its oxidative CBM33 enzyme. *J Mol Biol* 416: 239-254.
- Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Horn SJ, Liu Z, Zhai H, Sorlie M, Eijsink VG. 2010. An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. *Science* 330: 219-222.
- Vaidya AA & Datye KV. 1982. Environmental pollution during chemical processing of synthetic fibers. *Colourage* 14: 3-10.
- van Beek TA, Kuster B, Claassen FW, Tienvieri T, Bertaud F, Lenon G, Petit-Conil M, Sierra-Alvarez R. 2007. Fungal biotreatment of spruce wood with *Trametes versicolor* for pitch control: influence on extractive contents, pulping process parameters, paper quality and effluent toxicity. *Bioresource Technol* 98: 302-311.
- Van de 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*. *Appl Microbiol Biotechnol* 54: 659-664.
- van der Brink J & de Vries RP. 2011. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Appl Microbiol Biotechnol* 91: 1477-1492.
- Vanholme R, Kris Morreel K, Ralph J, Boerjan W. 2008. Lignin engineering. *Curr Opin Plant Biol* 11: 278-285.
- Vanhulle S, Radman RR, Parra RR, Cui T, Bols CM, Tron T, Sannia G, Keshavarz T. 2007. Effect of mannan oligosaccharide elicitor and ferulic acid on enhancement of laccases production in liquid cultures of basidiomycetes. *Enzyme Microb Tech* 40: 1712-1718.
- Vanhulle S, Trovaslet M, Enaud E, Lucas M, Taghavi S, van der Lelie D, van Aken B, Foret M, Onderwater RCA, Wesenberg D, Agathos SN, Schneider Y, Corbisier A. 2008. Decolourisation, cytotoxicity and genotoxicity reduction during a combined ozonation/fungal treatment of dye-contaminated wastewater. *Environ Sci Technol* 42: 584-589.
- Vardakou M, Katapodis P, Samiotaki M, Kekos D, Panayotou G, Christakopoulos P. 2003. Mode of action of family 10 and 11 endoxylanases on water-unextractable arabinoxylan. *Int J Biol Macromol* 33: 129-134.

- Vares T. 1996. Ligninolytic enzymes and lignin-degrading activity of taxonomically different white-rot fungi. PhD Thesis. University of Helsinki, Finland, Helsinki.
- Velázquez-Cedeño M, Farnet AM, Billete C, Mata G, Savoie J-M. 2007. Interspecific interactions with *Trichoderma longibrachiatum* induce *Pleurotus ostreatus* defense reactions based on the production of laccase isoenzymes. *Biotechnol Lett* 29: 1583-1590.
- Vitali J, Schick B, Kester HC, Visser J, Jurnak F. 1998. The three-dimensional structure of *Aspergillus niger* pectin lyase B at 1.7 Å resolution. *Plant Physiol* 116: 69-80.
- Vlasenko E, Schulein M, Cherry J, Xu F. 2010. Substrate specificity of family 5, 6, 7, 9, 12, and 45 endoglucanases. *Bioresour Tech* 101: 2405-2411.
- Voragen AGJ & Pilnik W. 1989. Pectin degrading enzymes in fruit and vegetable processing. En: *Biocatalysis in agricultural biotechnology*. pp. 93-115. J. R. Whitaker y P. E. Sonnet (eds.). American Chemical Society, Washington.
- Vu VV, Beeson WT, Phillips CM, Cate JHD, Marletta MA. 2014. Determinants of region selective hydroxylation in the fungal polysaccharide monooxygenases. *J Am Chem Soc* 136: 562-565.
- Wang F, Hu J-H, Gou C, Liu C-Z. 2014. Enhanced laccase production by *Trametes versicolor* using corn steep liquor as both nitrogen source and inducer. *Bioresour Technol* 166: 602-605.
- Watanabe T, Katayama S, Enoki M, Honda Y, Kuwahara M. 2000. Formation of acyl radical in lipid peroxidation of linoleic acid by manganese-dependent peroxidase from *Ceriporiopsis subvermispota* and *Bjerkandera adusta*. *Eur J Biochem* 267: 4222-4231.
- Wei W, Yang C, Luo J, Lu C, Wu Y, Yuan S. 2010. Synergism between cucumber alpha-expansin, fungal endoglucanase and pectin lyase. *J Plant Physiol* 167: 1204-1210.
- Wesenberg D, Buchon F, Agathos SN. 2002. Degradation of dye containing textile effluent by the agaric white-rot fungus *Clitocybula dusenii*. *Biotechnol Letters* 24: 989-993.
- Westereng B, Ishida T, Vaaje-Kolstad G, Wu M, Eijsink VGH, Igarashi K, Samejima M, Ståhlberg J, Horn SJ, Sandgren M. 2011. The putative endoglucanase PcGH61D from *Phanerochaete chrysosporium* is a metal-dependent oxidative enzyme that cleaves cellulose. *PLoS One* 6: e27807.
- Wijesundera RLC, Bailey JA, Byrde JW. 1984. Production of pectin lyase by *Collectotrichum lindemuthianum* in culture and in infected bean (*Phaseolus vulgaris*) tissue. *J Gen Microbiol* 130: 285-290.
- Wong DW. 2009. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Appl Biochem Biotechnol* 157: 174-209.
- Wong E, Vaaje-Kolstad G, Ghosh A, Hurtado-Guerrero R, Konarev PV, Ibrahim AFM, Svergun DI, Eijsink VGH, Chatterjee NS, van Aalten DMF. 2012. The

- Vibrio cholerae* colonization factor GbpA possesses a modular structure that governs binding to different host surfaces. PLoS Pathog 8: e1002373.
- Wood TM & García Campayo V. 1990. Enzymology of cellulose degradation. Biodegradation 1: 147-161.
- Wood TM & McCrae SI. 1972. The purification and properties of the C 1 component of *Trichoderma koningii* cellulase. Biochem J 128: 1183-1192.
- Woodward B & De Groot R. 1999. Tolerance of *Wolfiporia cocos* isolates to copper in agar media. Forest Prod J 49: 87-94.
- Woodward J & Wiseman A. 1982. Fungal and other β -D-glucosidases-their properties and applications. Enzyme Microb Tech 4: 73-79.
- Wright JE & Deschamps JR. 1972. Basidiomycetes xilófagos de los bosques andinopatagónicos. Revista Trimestral de Investigaciones Agropecuarias de la Región Centro Occidental 9: 111-204.
- Wu M, Beckham GT, Larsson AM, Sandgren M, Kim S, Payne CM, Himmel ME, Crowley MF, Horn SJ, Westereng B, Igarashi K, Samejima M, Stahlberg J, Eijsink VGH. 2013. Crystal structure and computational characterization of the lytic polysaccharide monooxygenase GH61D from the Basidiomycota fungus *Phanerochaete chrysosporium*. J Biol Chem 288: 12828-12839.
- Wymelenberg AV, Gaskell J, Mozuch M, Sabat G, Ralph J, Skyba O, Mansfield SD, Blanchette RA, Martinez D, Grigoriev I, Kersten PJ, Cullen D. 2010. Comparative transcriptome and secretome analysis of wood decay fungi *Postia placenta* and *Phanerochaete chrysosporium*. Appl Environ Microbiol 76: 3599-3610.
- Xavier AMRB, Tavares APM, Ferreira R, Amado F. 2007. *Trametes versicolor* growth and laccase induction with by-products of pulp and paper industry. Electron J Biotechnol 10: 444-451.
- Xiao YZ, Hong YZ, Li JF, Hang J, Tong PG, Fang W, Zhou C-Z. 2006. Cloning of novel laccase isozyme genes from *Trametes* sp. AH28-2 and analyses of their differential expression. Appl Microbiol Biotechnol 71: 493-501.
- Xiao YZ, Chen Q, Hang J, Shi YY, Wu J, Hong YZ, Wang YP. 2004. Selective induction, purification and characterization of a laccase isozyme from the basidiomycete *Trametes* sp. AH28-2. Mycologia 96: 26-35.
- Xiao YZ, Tu XM, Wang J, Zhang M, Cheng Q, Zeng WY, Shi Y. 2003. Purification, molecular characterization and reactivity with aromatic compounds of a laccase from basidiomycete *Trametes* sp. strain AH28-2. Appl Microbiol Biotechnol 60: 700-707.
- Xin F & Geng A. 2010. Utilization of horticultural waste for laccase production by *Trametes versicolor* under solid-state fermentation. Appl Biochem Biotechnol 163: 235-246.
- Yakovlev I, Vaaje-Kolstad G, Hietala AM, Stefańczyk E, Solheim H, Fossdal CG. 2012. Substrate specific transcription of the enigmatic GH61 family of the

- pathogenic white-rot fungus *Heterobasidion irregulare* during growth on lignocellulose. *Appl Microbiol Biotechnol* 95: 979-990.
- Yan J, Chen Y, Niu J, Chen D, Chagan I. 2015. Laccase produced by a thermotolerant strain of *Trametes trogii* LK13. *Braz J Microbiol* 46: 59-65.
- Yan J, Niu J, Chen D, Chen Y, Irbis C. 2014a. Screening of *Trametes* strains for efficient decolorization of malachite green at high temperatures and ionic concentrations. *Int Biodeter Biodegr* 87: 109-115.
- Yan J, Chen D, Yang E, Niu J, Chen Y, Chagan I. 2014b. Purification and characterization of a thermotolerant laccase isoforma in *Trametes trogii* strain and its potential in dye decolorization. *Int Biodeter Biodegr* 93: 186-194.
- Yang Y, Wei F, Zhuo R, Fan F, Liu H, Zhang C, Ma L, Jiang M, Zhang X. 2013. Enhancing the laccase production and laccase gene expression in the white-rot fungus *Trametes velutina* 5930 with great potential for biotechnological applications by different metal ions and aromatic compounds. *PLoS ONE* 8: e79307.
- Yang X, Wang J, Zhao X, Wang Q, Xue R. 2011. Increasing manganese peroxidase production and biodecolorization of triphenylmethane dyes by novel fungal consortium. *Bioresour Tech* 102: 10535-10541.
- Yaoi K, Kondo H, Hiyoshi A, Noro N, Sugimoto H, Tsuda S, Miyazaki K. 2009. The crystal structure of a xyloglucan-specific endo-beta-1,4-glucanase from *Geotrichum* sp. M128 xyloglucanase reveals a key amino acid residue for substrate specificity. *FEBS J* 276: 5094-5100.
- Yaropolov AI, Skorobogat'ko OV, Vartanov SS, Varfolomeyev SD. 1994. Laccase: properties, catalytic mechanism, and applicability. *Appl Biochem Biotechnol* 49: 257-280.
- Yaver DS & Golightly EJ. 1996. Cloning and characterization of three laccase genes from the white-rot basidiomycete *Trametes villosa*: genomic organization of the laccase gene family. *Gene* 181:95-102.
- Yaver DS, Xu F, Golightly EJ, Brown KM, Brown SH, Rey MW, Schneider P, Halkier T, Mondorf K, Dalbøge H. 1996. Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Appl Environ Microbiol* 62: 834-841.
- Yemul O & Imae T. 2005. Covalent-bonded immobilization of lipase on Poly (phenylene sulfide) dendrimers and their hydrolysis ability. *Biomacromolecules* 6: 2809-2814.
- Yennawar NH, Li LC, Dudzinski DM, Tabuchi A, Cosgrove DJ. 2006. Crystal structure and activities of EXPB1 (*Zea m 1*), a beta-Expansin and group-1 pollen allergen from maize. *Proc Natl Acad Sci* 103: 14664-14671.
- Yildirim N, Tanyol M, Dere T, Cumurcu A, Yildiz A. 2012. The investigation on physico-chemical parameters of the textile effluents after treatment by white rot fungus *Pleurotus djamor*. *New Biotechnol* 29: S184.

- Yoshikawa K, Yamamoto K, Okada S. 1994. Classification of some alpha-glucosidases and alpha-xylosidases on the basis of substrate specificity. *Biosci Biotechnol Biochem* 58: 1392-1398.
- Yoshikawa K, Yamamoto K, Okada S. 1993. Isolation of *Aspergillus flavus* MO-5 producing two types of intracellular alpha-Dxylosidases: purification and characterization of alpha-D-xylosidase. *Biosci Biotechnol Biochem* 57: 1275-1280.
- Younes SB, Bouallagui Z, Sayadi S. 2012. Catalytic behavior and detoxifying ability of an atypical homotrimeric laccase from the thermophilic strain *Scytalidium thermophilum* on selected azo and triarylmethane dyes. *J Mol Catal B Enzymatic* 79: 41-48.
- Yuzhu F & Viraraghavan T. 2001. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. *Bioresource Technol* 79: 251-262.
- Zacchi L, Burla G, Zuolong D, Harvey PJ. 2000. Metabolism of cellulose by *Phanerochaete chrysosporium* in continuously agitated culture is associated with enhanced production of lignin peroxidase. *J Biotechnol* 78: 185-192.
- Zamocky M, Ludwig R, Peterbauer C, Hallberg BM, Divne C, Nicholls P, Haltrich D. 2006. Cellobiose dehydrogenase-a flavocytochrome from wood-degrading, phytopathogenic and saprotrophic fungi. *Curr Protein Pept Sci* 7: 255-80.
- Zarra I & Revilla G. 1993. *Fisiología y bioquímica vegetal*. Azcón-Bieto and Talon (eds). Interamericana, España.
- Zeng X, Cai Y, Liao X, Zeng X, Li W, Zhang D. 2011. Decolorization of synthetic dyes by crude laccase from a newly isolated *Trametes trogii* strain cultivated on solid agro-industrial residue. *J Hazard Mater* 187: 517-525.
- Zhang GQ, Wang YF, Zhang XQ, Ng TB, Wang HX. 2010. Purification and characterization of a novel laccase from the edible mushroom *Clitocybe maxima*. *Process Biochem* 45: 627-633.
- Zhang H, Hong YZ, Xiao YZ, Yuan J, Tu XM, Zhang XQ. 2006. Efficient production of laccases by *Trametes* sp. AH28-2 in cocultivation with a *Trichoderma* strain. *Appl Microbiol Biotechnol* 73: 89-94.
- Zhang YZ, Reddy CA, Rasooly A. 1991. Cloning of several lignin peroxidase (LIP)-encoding genes: sequence analysis of the LIP6 gene from the white-rot basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Gene* 97: 191-198.
- Zhuo R, Ma L, Fan F, Gong Y, Wan X, Jiang M, Zhang X, Yang Y. 2011. Decolorization of different dyes by a newly isolated white-rot fungi strain *Ganoderma* sp. En3 and cloning and functional analysis of its laccase gene. *J Hazard Mater* 192: 855-873.
- 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.

- Zille A, Ramalho P, Tzanov T, Millward R, Aires V, Cardoso MH, Ramalho MT, Gubitzi GM, Cavaco-Paulo A. 2004. Predicting dye biodegradation from redox potentials. *Biotechnol Progress* 20: 1588-1592.
- Zilly A, Coelho-Moreira JD, Bracht A, de Souza CGM, Carvajal AE, Koehnlein EA, Peralta RM. 2011. Influence of NaCl and Na₂SO₄ on the kinetics and dye decolorization ability of crude laccase from *Ganoderma lucidum*. *Int Biodeter Biodegr* 65: 340-344.
- Zouari-Mechichi H, Mechichi T, Dhouib A, Sayadi S, Martinez AT, Martinez MJ. 2006. Laccase purification and characterization from *Trametes troglia* isolated in Tunisia: decolorization of textile dyes by the purified enzyme. *Enzyme Microb Tech* 39: 141-148.