

# AISLAMIENTO Y SELECCION DE BASIDIOMICETES NATIVOS CON CAPACIDAD LIGNINOLITICA

(Isolation and selection of native Basidiomycetes with a lignolytic capacity)

Maribel Parada<sup>1</sup>, Hernán Arias<sup>1</sup> y Gladys Vidal<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Depto. de Cs. Agronómicas y Recursos Naturales.

<sup>2</sup>Depto. de Ingeniería Química. Universidad de La Frontera, Casilla 54-D, Temuco-Chile.

**Palabras clave:** Basidiomycetes, selección, enzimas ligninolíticas, decoloración.

**Key words:** Basidiomycetes, selection, lignolytic enzymes, bleaching.

## RESUMEN

En este trabajo se seleccionaron y aislaron cepas nativas de hongos *Basidiomycetes* que poseen la capacidad de sintetizar enzimas ligninolíticas. Se evaluó la velocidad de desarrollo y decoloración sobre un compuesto modelo (Poly R-478), en función de la disponibilidad de nutrientes y temperatura. Las cepas seleccionadas (*Merilius* sp. *Poria placenta* y *Trametes versicolor*), fueron sometidas a cultivos estáticos (sistema «batch») evaluándose la actividad enzimática de cada una de ellas. Se encontró que todas las cepas sintetizaban peroxidasa tal como manganeso peroxidasa (MnP); sin embargo, sólo en uno de los cultivos fue posible detectar actividad de lacasa en el medio. Con estos resultados, se pudo confirmar el poder degradativo de las cepas nativas seleccionadas, sobre compuestos tipo lignina o de estructura cíclica como Poly R-478.

## SUMMARY

This paper shows the selections and isolation of native *Basidiomycetes* strains having the ability to synthesize lignolytic enzymes. Based on the availability of nutrient and temperature, the rate of growth and bleaching on a test compound (Poly R-478) could be evaluated.

Selected strains (*Merilius* sp. *Poria placenta* and *Trametes versicolor*) were submitted to static batch cultures and then the enzymatic activity of each of them was studied. It was concluded that all the strains synthesized peroxidase, such as manganese peroxidase (MnP); however only one of the cultures revealed a laccase activity in the media. As for these results, the degrading capacity of strains selected on lignine-type or cyclic structure compounds, such as Poly R-478 could be confirmed.

## INTRODUCCION

La biodegradación de la lignina, así como de compuestos orgánicos hidrófobos de alto peso molecular es ampliamente estudiada debido a su estructura compleja y su carácter recalcitrante. La mayoría de los compuestos hidrófobos son sintetizados por el hombre, y son productos contaminantes de elevada toxicidad, generados en procesos de combustión, producción de pasta de celulosa, fabricación de pesticidas, tintes industriales, etc. (Lema *et al.*, 1996).

Los compuestos antes señalados poseen una baja solubilidad y debido a su elevada masa molecular, no pueden atravesar la pared celular y/o membrana plasmática de muchos microorganismos, impidiendo por lo tanto, la acción de sus sistemas enzimáticos intracelulares. Por otro lado, la mayoría de los sistemas bacterianos no son capa-

ces de atacar enlaces tan diversos como los que se presentan en este tipo de compuestos, por lo que se necesita un sistema de degradación enzimática no específico. El interés por la investigación sobre los microorganismos que tengan la característica de degradar y transformar dichos compuestos, se ha visto obstaculizado por el desconocimiento del mecanismo involucrado en la degradación (Paice *et al.*, 1995).

Los hongos son los microorganismos responsables de un ataque más extensivo de la lignina, clasificándose en función de la colonización o putrefacción de la madera, como hongos de podredumbre blanda, café y blanca. Dentro de los hongos de putrefacción blanca se encuentran cientos de especies de *Basidiomycetes*, siendo los más importantes degradadores de lignina y el grupo más extensamente estudiado (Bajpai *et al.*, 1992; Deacon, 1988). Una característica importante de los hongos de putrefacción blanca, es su capacidad de producir diversas



fenoloxidasas y peroxidasas. Se han descrito cuatro clases de enzimas extracelulares que juegan un papel importante en la degradación de la lignina: lignina peroxidasa (LiP); Manganese peroxidasa (MnP), Lacasas y Oxidasas, que generan peróxido de hidrógeno, como glioxal oxidasa, aril-alcohol oxidasa y celobiosa oxidasa ( Wariishi *et al.*, 1989, Paice *et al.*, 1995).

Muchos otros hongos además del *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor* pueden rápidamente producir enzimas ligninolíticas que pueden actuar sobre compuestos lignínicos o precursores del color (Lema *et al.*, 1996; Mester & Field, 1997). La selección de cepas nativas que produzcan enzimas ligninolíticas ha sido objeto de varios estudios (Esposito *et al.*, 1991; De Jong *et al.*, 1992; Field *et al.*, 1993). Todos ellos han considerado un rápido crecimiento de la cepa seleccionada y al mismo tiempo, elevadas velocidades de degradación de la lignina o porcentaje de disminución de color (Feijoo *et al.*, 1995; Esposito *et al.*, 1991). Factores nutricionales, fisiológicos y medioambientales que pueden estar relacionados con la activación del sistema ligninolítico, han sido considerados en los distintos estudios realizados. Dentro de ellos se puede considerar, la necesidad de un sustrato de crecimiento aparte de los sistemas complejos existentes, efecto del oxígeno, nutrientes, agitación, temperatura, etc. (Moreira, 1997).

Se ha comprobado que el oxígeno es un factor estimulante para la biodegradación de la lignina y la activación del sistema ligninolítico. Por otro lado, es sabido que la mayoría de los hongos son mesófilos y presentan un crecimiento máximo entre 25 a 30°C. Sin embargo, aún dentro de esta categoría hay diferencias en cuanto al comportamiento (Deacon, 1988) ya que existen hongos que pueden vivir a bajas temperaturas (10°C) y otros pueden superar los 30°C. Esto implica una disminución de la actividad metabólica y una reducción en las capacidades reproductivas, las cuales pueden activarse en condiciones ambientales favorables. Por otra parte, el pH también influye en la velocidad máxima de desarrollo, muchas cepas crecen en un intervalo de pH de 4,5 a 8,0, y muestran un intervalo de pH óptimo entre 5,5 a 7,5 (Deacon, 1988).

La relación carbono/nitrógeno, así como el origen orgánico o inorgánico de la fuente de carbono y/o nitrógeno, constituyen factores decisivos que influyen en la tasa de crecimiento del hongo, la inducción del metabolismo secundario y la subsecuente activación del sistema ligninolítico (Viacava, 1998; Kaal *et al.*, 1993). La actividad ligninolítica puede activarse también tras la limitación de la fuente de carbono, lo cual coincide con un rápido descenso del peso seco y un considerable incremento del nitrógeno total. La limitación de azufre puede influenciar la aparición de actividad ligninolítica, pero no ocurre así para el caso del fósforo.

El objetivo de este trabajo, fue seleccionar y aislar cepas nativas de **Basidiomycetes** que posean la capacidad de producir enzimas ligninolíticas, evaluando tanto la velocidad de desarrollo, como su producción de enzimas, bajo tres medios de cultivos y dos temperaturas diferentes.

## MATERIALES Y METODOS

**1.- Muestreo.** El área de estudio comprendió el predio Rucamanque, ubicado a unos 12 km al Nor-oeste de la ciudad de Temuco, Provincia de Cautín IX Región de la Araucanía (Chile), con una superficie de 435,1 Há. Se recolectaron 35 muestras al azar, provenientes de diferentes especies de árboles, que consistieron en carpóforos del suelo, adheridos a árboles en pie o en madera en descomposición; también se recolectaron trozos de madera en descomposición que presentaban micelios visibles. Dichas muestras, fueron llevadas al laboratorio y guardadas en frascos de vidrio o bolsas de polietileno transparente e identificadas con un número de colecta. Todas ellas, fueron conservadas en refrigerador a 4°C hasta el momento de realizar las siembras. *Poria placenta* se obtuvo del cepario micológico del laboratorio de Patología Forestal de la Universidad de La Frontera.

**2.- Microorganismos e inóculo.** Antes de la siembra se realizó una limpieza cuidadosa en cada una de las muestras recolectadas que presentaban basidiocarpos, con el objeto de eliminar el máximo de suciedad y posibles contaminantes y así asegurar sólo la multiplicación del hongo de interés. Posteriormente, mediante cortes transversales en los basidiocarpos, se tomó un trozo del himenio de cada una de las muestras. De aquellas con estructura más leñosa, se tomaron directamente desde el himenio. Estos trozos fueron sembrados en Agar Extracto de Malta al 2% e incubados en estufa de cultivo a 30 °C durante 5 días. La presencia de cultivos puros fue determinada mediante observaciones macro y microscópicas.

**3.- Ensayos de crecimiento y decoloración.** Para evaluar el desarrollo de las diferentes cepas obtenidas en cultivo puro se sembraron en agar extracto de malta al 2% (AEM) incubándose por 20 días a 30 °C. Al mismo tiempo, se evaluó la capacidad de producción de enzimas ligninolíticas de las cepas en AEM 2% adicionado de 20 mg/L de Poly R-478, bajo las mismas condiciones de incubación antes señaladas. La decoloración de dicho compuesto en el medio, que varía de rosa intenso a incoloro (de Jong *et al.*, 1992), se debe a la síntesis de enzimas ligninolíticas por los **Basidiomycetes** estudiados. Como patrón de referencia, se utilizaron las características, tanto de desarrollo como de decoloración que posee la cepa *Trametes versicolor*



52J, cepa altamente estudiada y donada por el Paprican (Institute of Pulp and Paper Canada) para investigaciones realizadas anteriormente (Viacava, 1998).

Con la finalidad de estudiar el efecto del medio de cultivo y temperatura sobre el desarrollo de la cepa, se consideraron dos temperaturas ( $13 \pm 3^\circ\text{C}$  y  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ ) en tres medios de cultivo. Todos los ensayos se realizaron por triplicado, durante 20 días. Los tres medios de cultivo fueron seleccionados considerando el aporte nutritivo de cada uno de ellos. Se consideró como medio carente de nutrientes al medio Agar-Agua (AA, 2%); mientras que uno rico en carbohidratos, al medio Agar Papa Dextrosa (APD, 2%) y uno con aporte equilibrado en nutrientes, el medio Agar Extracto de Malta, (AEM, 2%). El control del desarrollo en el tiempo de cada cepa fue realizado a través del promedio de 2 medidas radiales de las colonias fúngicas, realizadas directamente sobre la placa sin exponer el cultivo al medio, para evitar una posible contaminación.

#### 4.- Producción de enzimas en sistema batch.

La formación del inóculo se realizó en medio estático en matraces fernbatch de 1,8 L en el que se incubaron 5 cilindros (de 5 cm de diámetro cada uno) de agar con micelio de cada uno de los hongos positivos que se mantenían en medio de cultivo Kirk para crecimiento (Tien & Kirk, 1988), durante 14 días a  $30^\circ\text{C}$ . Luego de cultivado el hongo en matraces fernbatch se incubó al 10% (v/v) en Erlenmeyer de 250 mL a 150 rpm y  $30^\circ\text{C}$ , en un medio mineral modificado (Tien y Kirk, 1988) (medio de cultivo con suficiencia de nitrógeno, relación C/N 12,5:1) durante 8 días. Diariamente se realiza la extracción de 1 ml de muestra para evaluar la actividad enzimática. Como se mencionó anteriormente, basándose en trabajos anteriores (Viacava 1998), se realizaron ensayos de producción de enzimas en sistema batch, con una cepa conocida (*T. versicolor* 52J) a fin de tener un comportamiento patrón.

**5.- Métodos analíticos.** La actividad enzimática fue determinada espectrofotométricamente a  $30^\circ\text{C}$ . La actividad de la lacasa y MnP fue medida por la oxidación de 2,6-dimetoxifenol DMP a 468 nm (Field *et al.*, 1993). El coeficiente de extinción usado para el producto de la oxidación de DMP fue  $49.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Los azúcares reductores fueron determinados por el método del ácido dinitrosalicílico usando D-glucosa como estándar de acuerdo a Ghose, (1987). El peróxido de hidrógeno residual fue medido por indicadores analíticos (Merckoquant peroxid-test).

## RESULTADOS Y DISCUSION

**1.- Evaluación de la capacidad ligninolítica de las cepas aisladas.** Se realizaron a las 35 cepas aisladas, dos evaluaciones por duplicado y la combinación de los distintos

efectos resultantes fueron los siguiente: 13 cepas no presentaron decoloración en ambas evaluaciones, 5 no presentaron desarrollo y en 10 no se evidenció desarrollo ni decoloración en forma alternada. Mientras que 4 de ellas presentaron decoloración en la primera y segunda evaluación y se observó desarrollo de las colonias fúngicas. Sólo dos de los hongos aislados *Trametes versicolor* y *Merulius* sp, presentan características de desarrollo y capacidades ligninolíticas óptimas para su posterior trabajo en medio líquido. El ensayo de la capacidad ligninolítica de las cepas manifestada por el cambio del color del medio, es una técnica ampliamente usada en la literatura (De Jong *et al.* 1992).

*Poria placenta* se obtuvo del cepario micológico del laboratorio de Patología Forestal (Universidad de La Frontera). *Trametes versicolor* y *Merulius* sp., fueron identificados a nivel de género y especie (Pacioni, 1982), de acuerdo a las características de color, forma, textura, tamaño, tipo de adhesión al sustrato, tipo de sustrato y por la observación microscópica de sus basidiosporas (de color crema, cilíndricas con tamaños entre  $4,2-6,5 \times 1,5-2,8 \mu\text{m}$  y basidiosporas blancas levemente curvadas y con tamaños entre  $3-4,1 \times 1-1,4 \mu\text{m}$  respectivamente). Estas dos últimas cepas son conocidas como hongos de pudrición blanca (white-rot fungi), mientras que *Poria placenta* es un hongo de pudrición café (brown-rot fungus)

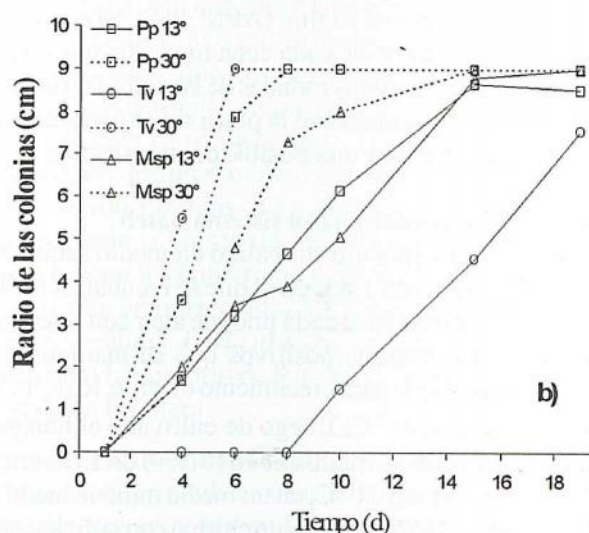
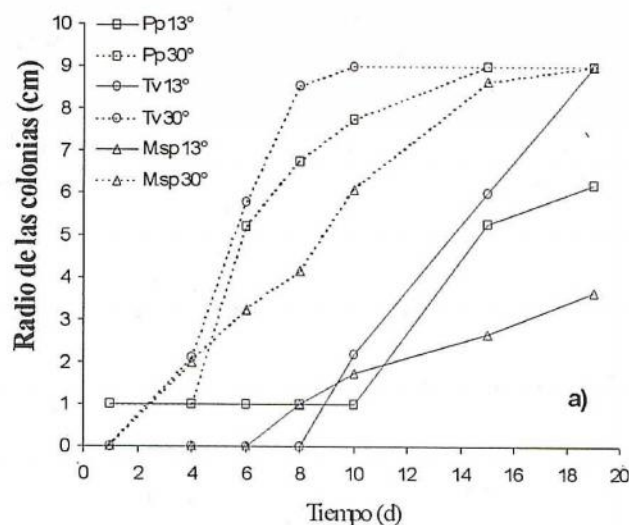
Las Figuras 1 y 2, muestran las distintas cinéticas de crecimiento en función de 2 temperaturas y 4 medio de cultivos en las 3 cepas fúngicas en estudio. Se observa que existe desarrollo en todos los medios de cultivo, sin embargo, en Agar-Agua, se observaron mayores etapas de latencia y menores velocidades de desarrollo (Figura 1a). La temperatura influye directamente en el desarrollo de las cepas y en todos los casos la de  $30^\circ\text{C}$ , favorece el desarrollo de las colonias fúngicas de las cepas.

La Tabla 1, muestra la velocidad máxima de crecimiento de las tres cepas en función del medio de cultivo y la temperatura. Esta velocidad fue obtenida de la mayor pendiente de cada curva mostrada en las Figuras 1 y 2. Al igual que en las figuras señaladas, se observa que la velocidad de crecimiento depende fuertemente de la temperatura, y del medio de cultivo. Comprobándose que los mayores valores de desarrollo se obtienen a  $30^\circ\text{C}$  y en presencia de nutrientes se favorece el desarrollo de las distintos cepas. Sorprendentemente, en el medio AA las cepas tienen velocidades de desarrollo comparativamente elevadas, probablemente debido a los niveles de humedad y pH óptimos para el crecimiento, tal como lo indica Deacon (1988). Además se observa que *T. versicolor* puede desarrollarse y crecer a niveles de nitrógeno extremadamente

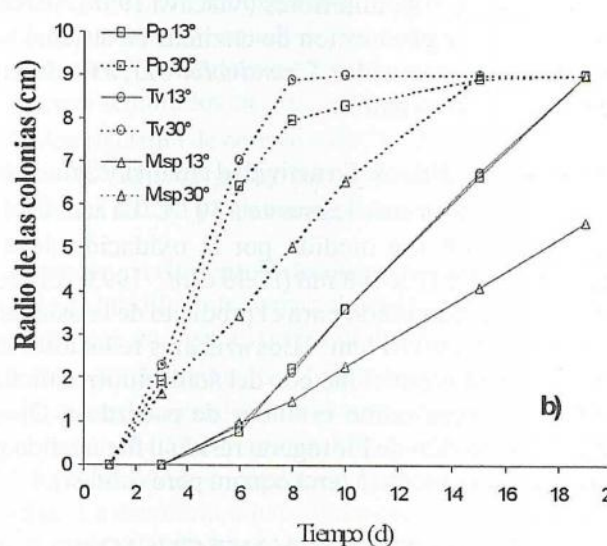
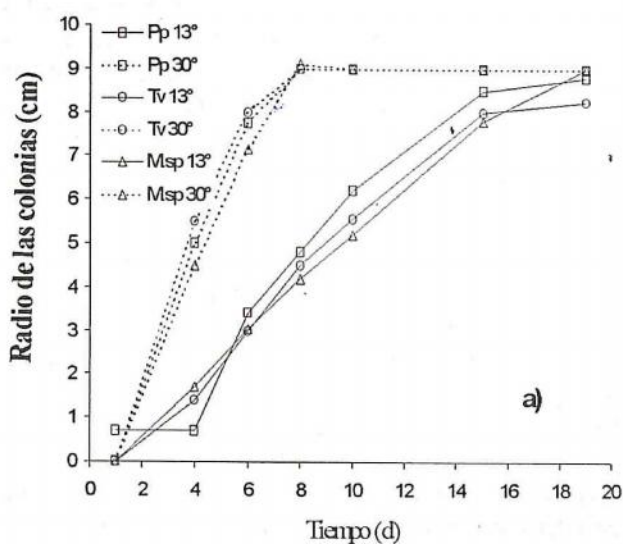


**Tabla 1. Velocidad máxima de crecimiento(cm/día) de las cepas seleccionadas en función del medio de cultivo y la temperatura.**

Cepa	Velocidad máxima de crecimiento (cm/día)							
	AA		APD		AEM		Poly R-478	
	13 ± 3 °C	30 ± 1 °C	13 ± 3 °C	30 ± 1 °C	13 ± 3 °C	30 ± 1 °C	13 ± 3 °C	30 ± 1 °C
<i>Poria placenta</i>	1,1	1,15	0,68	1,20	0,57	1,38	0,63	1,15
<i>Trametes versicolor</i>	1,4	1,20	0,67	1,79	0,59	1,50	0,63	1,50
<i>Merulius sp.</i>	1,0	0,58	0,70	1,10	0,52	1,40	0,38	0,67



**Figura 1. Radio de las colonias de *Poria placenta* (Pp), *Trametes versicolor* (Tv) y *Merulius sp.* (M sp.) en Agua (a) y Agar Papa Dextrosa (b) a dos temperaturas distintas (13 y 30 °C).**



**Figura 2. Radio de las colonias de *Poria placenta* (Pp), *Trametes versicolor* (Tv) y *Merulius sp.* (M sp.) en Ag Extracto de malta (a) y Poly R-478 (b) a dos temperaturas distintas (13 y 30 °C).**



bajos, como es en este caso AA y APD, en cambio *Poria placenta* y *Merulius* sp. tienen un comportamiento muy similar tanto en APD como en AEM, indicando que requieren una fuente de C o de N para su desarrollo.

La evaluación de la velocidad máxima de las colonias fúngicas de las tres cepas en presencia de Poly R-478, indican que: *T. versicolor* presenta la mayor velocidad de crecimiento (1,5 cm/d) a 30° C. Más aún en la Tabla 2, se muestra que bajo estas condiciones, dicha cepa presenta la mayor área de decoloración en la placa Petri al cabo de diez días de incubación. Se observa al mismo tiempo que la temperatura influye fuertemente en la activación del sistema ligninolítico; de este modo es posible comprobar que a 13 °C el efecto de la decoloración sobre Poly R-478 por *T. versicolor* es un 60% menor, que el inducido por esta cepa a una temperatura de 30 °C.

Bajo las mismas condiciones de nutrientes, la generación de enzimas ligninolíticas por *Poria placenta* y *Merulius* sp. son respectivamente, un 60% y 30% menor a la generada por *T. versicolor* a 30 °C. Se observó que *T. versicolor* presenta un metabolismo primario y secundario casi en forma paralela, es decir, que a medida que se observa aumento de la biomasa, se produce la decoloración del compuesto Poly R-478. El área de decoloración está estrictamente relacionada con la activación del metabolismo secundario del hongo, que en muchos casos puede activarse tras la limitación de la fuente de carbono. En este caso específico, la presencia de enzimas oxidativas tales como oxidasa y peroxidasas indicarían el inicio del ciclo catalítico de enzimas ligninolíticas tales como MnP y lacasas entre otras (Moreira, 1997). Desde un punto de vista de la aplicación de las enzimas, es importante considerar los factores nutricionales y fisiológicos en el cultivo de los hongos, también es importante considerar los factores medioambientales tales como la agitación, efecto del oxígeno, entre otros (Moreira et al., 1988). Los ensayos en placas, forman parte de la etapa inicial de propagación de la cepa para su posterior cultivo en medio líquido y obtención de enzimas. Existe una cantidad de estudios centrados en la identificación y producción de estas enzimas (Feijoo et al., 1995) para ser utilizadas directamente en procesos, tales como, el blanqueo en la industria de celulosa (Bajpai, 1992) o en la degradación de compuestos tóxicos y aromáticos o compuestos de carácter lignínicos (Archibal et al., 1990).

**2.- Síntesis de enzimas ligninolíticas.** Las tres cepas (*Poria placenta*, *Merulius* sp. y *T. versicolor*) evaluadas en el apartado anterior, fueron evaluadas de acuerdo a la metodología para la síntesis de enzimas ligninolíticas. Como se observa en la Figura 3, *Poria placenta*, *T. versicolor* y *Merulius* sp., presentan síntesis de enzimas oxidativas desde que se detecta concentración de peróxido

de hidrógeno. Las concentraciones máximas de enzimas son detectadas cuando la concentración del sustrato, en este caso, glucosa, disminuye a concentraciones menores que un 50% de la concentración inicial. En todas las cepas se detectó distintas concentraciones de manganeso peroxidasa (MnP). Existen trabajos en que se ha encontrado que la efectividad de la decoloración está afectada por la presencia o ausencia de la enzima en cuestión, pero no está relacionada con la concentración de ésta en el medio. Esto confirmaría lo obtenido en el presente trabajo, pues como se observa en la Figura 3, los niveles de MnP son variables, sin embargo, en el cultivo en placas en presencia de Poly-R478 las tres cepas estudiadas degradan el compuesto cíclico Poly R-478. *Poria placenta*, presenta la máxima actividad de la enzima MnP de 92,20 U/L en el sexto día de síntesis.

**Tabla 2.- Radio de las colonias (cm) y decoloración máxima(cm) en el medio Poly R-478 a los 10 días de incubación**

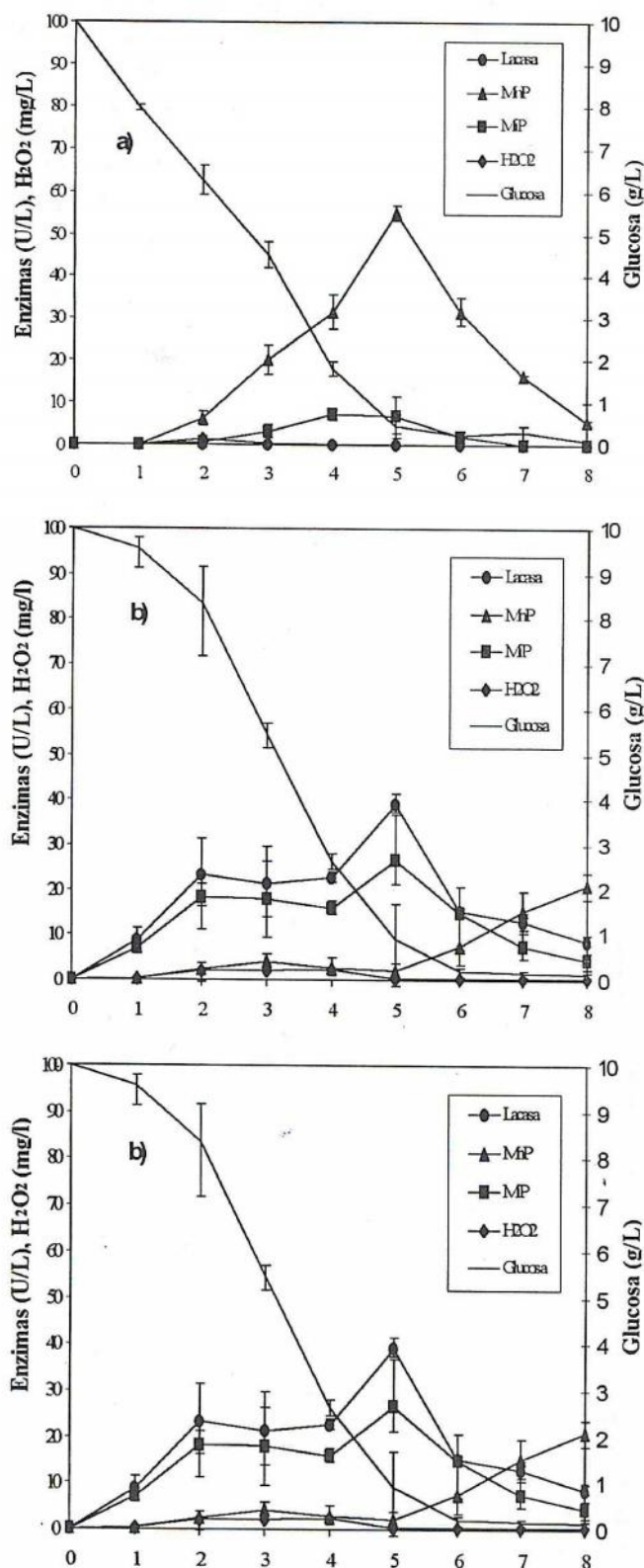
Cepa	Radio (cm)		Decoloración (cm)	
	13±3°C	30±1°C	13±3°C	30±1°C
<i>P.placenta</i>	3,59	8,3	0,56	2,71
<i>T.versicolor</i>	3,6	9.0	2,68	9,0
<i>Merulius</i> sp.	2,27	6,54	0,42	5,11

La presencia de lacasa (40 U/L) fue detectada sólo en presencia de *T. versicolor*, la concentración máxima (40 U lacasa/L) se produjo al quinto día del proceso; esto es concordante con trabajos realizados por Paice et al. (1995), que indican que *T. versicolor* es uno de los hongos que puede sintetizar abundantemente lacasa. No se observa síntesis de lacasa por *Poria placenta* ni por *Merulius* sp.

## CONCLUSIONES

Se aisló y seleccionó dos cepas nativas de Basidiomycetes con características ligninolíticas. Las velocidades de crecimiento máximo y de decoloración, dependen estrechamente de la temperatura y disponibilidad de nutrientes. Los valores máximos de velocidad de crecimiento se obtuvieron a 30 °C y en medio de cultivo AEM. En el sistema batch, todas las cepas seleccionadas sintetizaron MnP, el máximo de actividad detectado fue de 90 U MnP/L, por *Poria placenta*. En los productos del metabolismo de la cepa identificada como *T. versicolor*, fue





posible detectar actividad de enzima lacasa en niveles hasta 40 U/L.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el proyecto FONDECYT 1970868 y por la Agencia de Cooperación Internacional Española, Proyecto ICI/USC-UFRO 1997-1.

## REFERENCIAS

Archibald, F.; Paice, M.G. & Jurasek, L. (1990). Decolorization of kraft bleachery effluent chromophores by *Coriolus (Trametes) versicolor*. *Enzyme Microb. Technol.* 12:846-853

Bajpai, P.; Mehna, A. & Bajpai, P.K. (1992). Decolorization of kraft bleach plant effluent with the white rot fungus *Trametes versicolor*. *Process Biochem.* 28:377-384

Deacon, J.W. (1988). Introducción a la micología moderna. Departamento de Microbiología Universidad de Edimburgo. (Ed) Lin. Primera Edición. México.

De Jong, E.; de Vries, F.P.; Field, J.A.; Rick, van der Zande Bont, J. (1992). Isolation and screening of Basidiomycetes with high ligninolytic activity. Comparison of different screening methods. *Mycological Research.* 96:1098-1104

Esposito, E.; Canhos, V. & Durán, N. (1991). Screening of lignin degradation fungi for removal of color kraft mill wastewater without additional extra carbon source. *Biotechnol. Lett.* 13:571-5

Field, J.A.; De Jong, E.; Feijoo-Costa, G.; de Bont, J. (1993). Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Biotechnol.* 11:44-49

Feijoo, G.; Vidal, G.; Moreira, M.T.; Méndez, R.; Lema, J. (1995). Degradation of high molecular weight compounds of kraft pulp mill effluent by combined treatment with fungi and bacteria. *Biotechnol. Lett.* 11:1261-1266

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

Kaal, E.; De Jong, E. & Field, J. (1993). Simulation of ligninol peroxidase activity by nitrogen nutrients in the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. BOS55. *Appl Environ Microbiol.* 59:4031-40

Lema, J.M.; Moreira, M.T.; Feijoo, G.; Palma, C. (1996). Producción y empleo de enzimas ligninolíticas para la degradación de compuestos xenobióticos. En: Fronteras en Biotecnología y Biotecnología. Galindo (editor) Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. pp 287-293

Mester, T. & Field, J.A. (1997). Optimization of manganese peroxidase production by the white rot fungus *Bjerkandera* strain BOS55. *FEMS-Microbiol. Lett.* 155(2):161-168.

**Moreira, M.T.** (1997). Producción en continuo de MnP por *Phanerochaete chrysosporium* y *Bjerkandera* sp. BOS55. Aplicación al bioblanqueo de pasta de celulosa. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela (España).

**Moreira, M.T.; Palma, C.; Feijoo, G.; Lema, J.M.** (1998). Strategies for the continuous production of ligninolytic enzymes in fixed and fluidised bed reactors. *Journal of Biotechnol.* 66:27-39

**Pacioni, G.** (1982). Guía de Hongos. Grijalbo S A. Barcelona

**Paice, M.G.; Bourbonnais, R.; Reid, I.D.; Archibald, F.S.; Jurasek, L.** (1995). Oxidative bleaching enzymes: A review. *J. Pulp and Paper Sci.* 21:280-284

**Tien, M. & Kirk, T.** (1988). Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. In: Wood, W.A, and Kellogg, S.T., (Eds), *Methods in Enzymology* 161. Biomass B: Lignin. Pectin and Chitin. Academic Press. New York. pp. 238-249

**Viacava, C.** (1998). Producción y aplicación de enzimas ligninolíticas para la decoloración de efluentes de la industria de celulosa. Tesis Ingeniero Civil Industrial Mención Agroindustria, Universidad de La Frontera (Temuco, Chile).

**Wariishi, H.; Valli, K. & Gold, M.H.** (1989). Oxidative cleavage of a phenolic diarypropane lignin model dimer by manganese peroxidase from the basidiomycetes *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry* 28:6017-6023