

ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS LIGNINOLITICAS DEL *PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM* Y SU VARIACIÓN CON LA ADICIÓN DE Mn^{+2}

por

Gloria Alicia Jiménez T¹, Amanda I. Mejía G² & Betty Lucy López O³

Resumen

Jiménez T. G.A., A. I. Mejía G. & B. L. López O.: Actividad de las enzimas ligninolíticas del *Phanerochaete chrysosporium* y su variación con la adición de Mn^{+2} . Rev. Acad. Colomb. Cienc. **23**(89): 587-594, 1999. ISSN 0370-3908.

La actividad de las enzimas ligninolíticas, lignina peroxidasa (LiP), manganoso peroxidasa (MnP) y lacasa, en cultivos sumergidos de *Phanerochaete chrysosporium*, con cantidades limitadas de carbono y nitrógeno, se vio afectada por la adición de Mn^{+2} . En los cultivos con 0 y 1,25 ppm de Mn^{+2} , solo se detectó la LiP y su mayor actividad se presentó en los que contienen 1.25 ppm de Mn^{+2} . En los cultivos con 40 ppm de Mn^{+2} se encontró actividad de LiP, de MnP y lacasa. La presencia de las tres enzimas en el mismo cultivo no había sido reportada y es de gran importancia porque amplía las opciones que tiene el hongo y su maquinaria ligninolítica para actuar secuencialmente en aplicaciones biotecnológicas.

Palabras clave: Ligninoperoxidasa, manganoperoxidasa, lacasa, *Phanerochaete chrysosporium*.

Abstract

The activity of the ligninolytic enzymes, lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP) and laccase, in submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium*, with limited amounts of carbon and nitrogen, were affected by the addition of Mn^{+2} . In cultures with 0 and 1,25 ppm of Mn^{+2} , only the LiP was detected and its higher activity level was observed in the cultures with 1.25 ppm of Mn^{+2} . The cultures with 40 ppm of Mn^{+2} showed activities of LiP, MnP and laccase. The presence of the three enzymes in the same culture had not been reported and it is of great importance because it shows that the fungus and its lignolytic machinery can act sequentially.

Key words: Lignin peroxidase, manganese peroxidase, laccase, *Phanerochaete chrysosporium*.

1 Unité de Physiologie et Ecologie Microbienne, Université Libre de Bruxelles; 642 rue Engeland, 1180 Bruxelles, Belgique.

2 Facultad de Química Farmacéutica. Departamento de Farmacia. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

3 Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Química. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. AA1226

Introducción

La degradación de la lignina por hongos de la pudrición blanca de la madera es producida por las enzimas ligninolíticas, lignina peroxidasa (LiP), (Tien *et al*, 1983; Glenn *et al*, 1983); de la manganosa peroxidasa (MnP) (Kuwahara *et al*, 1984) y de la lacasa (Morohoshi, 1990). Estas enzimas son producidas por diferentes microorganismos y su habilidad para oxidar un amplio rango de compuestos orgánicos tóxicos a metabolitos no tóxicos y/o CO₂ (Bumpus *et al*, 1987), es un tema de estudio por parte de muchos grupos de investigación, por su importancia en aplicaciones biotecnológicas.

El basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* ha sido el más ampliamente estudiado. Este hongo produce durante su metabolismo secundario bajo condiciones limitadas de nitrógeno o carbono (Jeffries *et al*, 1987), un gran número de enzimas oxidativas que se encuentran en el fluido extracelular, entre ellas la LiP y la MnP. Se tenía establecido hasta hace poco que la cepa del *Phanerochaete chrysosporium* no era productora de lacasa en medios con bajo contenido de glucosa y nitrógeno. Recientemente ha sido caracterizada a partir de cultivos con celulosa como fuente de carbono y alto contenido de nitrógeno (Srinivasan, 1995) y en cultivos con suficiente glucosa y nitrógeno, suplementados con cobre (Dittmer *et al*, 1997). La lacasa se ha encontrado principalmente en otros hongos tales como *Coriolus versicolor* (Morohoshi, 1990), el *Trametes versicolor* (Bourbonnais *et al*, 1990) y el *Phanerochaete flavido-alba* (Pérez *et al*, 1996).

El estudio de los diferentes factores que influyen a la producción de la LiP, la MnP y la lacasa, ha mostrado que las enzimas LiP y MnP son reguladas por carbono y nitrógeno. En ausencia de estos dos elementos, el *Phanerochaete chrysosporium* pasa a una fase de metabolismo secundario donde se producen las enzimas ligninolíticas (Paszczynski *et al*, 1986; Gold *et al*, 1989; ACS Symposium. Chapter 14,15,16,20, 1990; Pease *et al*, 1992; Orth *et al*, 1995). El nitrógeno tiene un fuerte efecto regulador sobre la maquinaria ligninolítica. En cultivos con alto contenido de nitrógeno, se ha encontrado la lacasa a partir del *Phanerochaete chrysosporium* (Thurston, 1994; Mester *et al*, 1995; Moilanen *et al*, 1996). Un alto contenido de nitrógeno también favorece la aparición de proteasas extracelulares (Eriksson *et al*, 1982; Kirk *et al*, 1986; Dosoretz *et al*, 1990; Feijoo *et al*, 1995; Penninckx *et al*, 1996), las cuales inactivan a las peroxidases y por tanto un aumento en nitrógeno reprime a la LiP y a la MnP (Kirk *et al*, 1986; Dosoretz *et al*, 1990; Penninckx *et al*, 1996).

Otro factor importante que regula la expresión de la LiP y la MnP en los hongos de la pudrición blanca es el Mn⁺² (Alic *et al*, 1995). Se ha demostrado que su presencia es necesaria para la obtención de la proteína MnP (Bonnarme *et al*, 1990), pero en exceso inhibe la LiP (Brown *et al*, 1990). El Mn⁺² adicionado a los medios donde se producen las enzimas peroxidases actúa a nivel de transcripción genética; además afecta los perfiles de las isoenzimas producidas. El Mn⁺² también está involucrado en la síntesis de la lacasa de diferentes microorganismos ligninolíticos (Pérez *et al*, 1990; Thurston, 1994; Srinivasan, 1995; Moilanen *et al*, 1996; Dittmer *et al*, 1997). Otros hongos pudridores de la madera son afectados de manera similar a la observada con el *Phanerochaete chrysosporium*, indicando que la regulación por el Mn⁺² no es idiosincrática. Estudios hechos sobre organismos como *Lentinula edodes* - donde la LiP no se había detectado - produjo una buena cantidad cuando se adicionó 0.35 ppm de Mn⁺². En la *Plebia brevispora* también se ha reportado que altos niveles de Mn⁺² (39.8 ppm), inducen la producción de lacasa (Pérez *et al*, 1990). Cuando se quiere producir la LiP como única enzima, se usan niveles bajos de Mn⁺² (0.3 a 1.6 ppm) (Gold *et al*, 1989; Orth *et al*, 1995). La MnP es formada casi exclusivamente cuando el Mn⁺² es alto (40 a 190 ppm) (Gold *et al*, 1988; Orth *et al*, 1995) y la producción de ambas enzimas se da con un nivel intermedio (aproximadamente 11 ppm) (Paszczynski *et al* 1986; ACS Symposium, 1990; Gold *et al*, 1993).

Ajustando los niveles de Mn⁺² puede ser posible maximizar la producción de estas enzimas. El manganeso se encuentra en todos los tejidos de la madera y juega un rol importante en la degradación de la lignina por los hongos ligninolíticos. Grandes depósitos de MnO₂, los cuales se reconocen como manchas oscuras, se han encontrado en las paredes celulares de las maderas después de la colonización fúngica (Blanchette, 1984).

El efecto del manganeso en la regulación de la expresión de estas enzimas es una variable de gran importancia a estudiar. Otros factores que inciden en la producción de estas enzimas son la temperatura, el pH, la agitación (Tien *et al*, 1983; Paszczynski *et al*, 1986; Bumpus *et al*, 1987; Jeffries *et al*, 1987; Orth *et al*, 1995; Morohoshi, 1990; ACS Symposium, 1990; Pease *et al*, 1992), cantidad de inóculo y forma en que crece el micelio (Jiménez *et al*, 1997); la concentración de trazas minerales, específicamente el manganeso (Brown *et al*, 1990; Bonnarme *et al*, 1990; Pease *et al*, 1992), así como la adición de determinados metabolitos específicos como el alcohol veratrílico, o el tween 80 (Paszczynski *et al*,

1986; Orth *et al*, 1995; ACS Symposium, 1990; Moilanen *et al*, 1996).

La utilización del *Phanerochaete chrysosporium* en bioremediación y aplicaciones biotecnológicas requiere el control específico de cada uno de las variables del sistema degradativo de éste hongo para maximizar su expresión enzimática (Gary *et al*, 1983; Valli *et al*, 1990; Boyle *et al*, 1992; Thompson *et al*, 1998).

En éste trabajo se encontró actividad de la LiP, la MnP y la lacasa, las tres enzimas ligninolíticas mas importantes, con la cepa de *Phanerochaete chrysosporium*, en cultivos sumergidos con carbono y nitrógeno limitado y la adición de 40 ppm de Mn^{+2} .

Materiales y métodos

Microorganismo y condiciones del cultivo para replicarlo. Se utilizó la cepa *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 (ATCC 24725) replicada en medio YMPG, el cual contiene: extracto de levadura al 1%, extracto de malta al 1%, peptona bacteriológica al 0.2%, glucosa al 1%, asparagina al 0.1%, KH_2PO_4 al 0.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ al 0.1%; tiamina clorhidrato 1 mg % y agar al 2%. Se esterilizó y se colocó en cajas de Petri estériles; la cepa se replicó sobre este medio e incubó a 37°C por 5 días y se mantuvo a 4°C (Tien *et al*, 1983; Glenn *et al*, 1983).

Medio de cultivo o fluido de expresión enzimática. El fluido donde se van a producir las enzimas contiene: glucosa al 1%, tartrato de amonio al 0.02%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ al 0.05 %; $CaCl_2 \cdot 12H_2O$ al 0.01%; Tween 80 al 0.05%; tiamina clorhidrato 0.1 mg %; alcohol veratrílico 2,5 mM; solución de elementos traza 70 ml/L (la cual contiene por litro: ácido nitriloacético 1,5 g; $MgSO_4 \cdot 5H_2O$ 3 g; NaCl 1 g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1 g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,1 g; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1 g; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,01 g; $ALK(SO_4) \cdot 12H_2O$ 0,01 g; HBO_3 0,01 g; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0,01 g.). (Penninckxs *et al*, 1996). Se llevó a pH 4.5 con buffer de tartrato de sodio.

En erlenmeyers de 500 ml se adicionaron 70 ml de fluido de expresión, se taparon con torunda de algodón y se esterizaron a 121°C por 15 minutos. Se les adicionó una suspensión estéril de esporas de la cepa recién replicada (tres semanas de replicada como máximo) en tween 80 al 0,1%, hasta una concentración final entre (10×10^4) y (18×10^4) esporas por ml. (Jiménez *et al*, 1997). Se colocaron en un agitador orbital a 150 rpm a temperatura ambiente (entre 25 y 28°C). Pasadas 48 horas, se les adicionó manganeso (como se describe a continuación) y nuevamente se dejaron bajo esas condiciones durante el desarrollo del experimento.

Efecto del Mn^{+2} sobre la producción enzimática. Se estudió el efecto de una baja y una alta concentración del manganeso, de acuerdo al efecto en diferentes microorganismos reportado en la literatura citada (Gold *et al*, 1989; Pérez *et al*, 1990; Bonnarme *et al*, 1990; Orth *et al*, 1995). Se realizaron tres repeticiones por cada concentración de manganeso. A tres de los erlenmeyers se les adicionó 1.25 ppm de Mn^{+2} y se marcaron con A (baja concentración); a los tres marcados con B se les adicionó 40 ppm de Mn^{+2} (alta concentración) y los marcados con C, 0 ppm de Mn^{+2} (control).

Actividad de la LiP, MnP y lacasa. De los diferentes medios de cultivo ensayados se tomaron muestras de 2 ml de cada fluido extracelular, se filtraron a través de membranas de 0.45 mm y se les determinó la actividad de las diferentes enzimas.

La actividad de la LiP se determinó como lo describen Kirk *et al*, (1986). Se mezclan entre 200 y 500µl del fluido extracelular en una cubeta de cuarzo de 1 ml, se adicionan entre 200 y 700 ul de buffer de tartrato de sodio 0.3 mM, de pH=3 necesarios para completar 900 µl, dependiendo de la cantidad usada de fluido; se adicionan 50 µl de alcohol veratrílico 10 mM y se inicia la reacción con la adición de 50 µl de H_2O_2 (50 µl/50 ml recién preparado), monitoreando el cambio en la absorbancia a 310 nm. La cantidad de LiP requerida para oxidar 1 mmol de alcohol veratrílico por minuto, se define como una unidad. El coeficiente de absortividad molar $e = 9.300 M^{-1} cm^{-1}$.

La actividad de la MnP se determinó como se describe por Paszcynski *et al*, (1986). Se mezclan entre 300 y 400 µl del fluido extracelular con una cantidad de buffer de tartrato de sodio 0.1 mM, pH=5, necesarios para obtener 800 µl en total; se adicionan 75 µl de vanililacetona 1 mM, 75 µl de solución de $MnSO_4$ 1 mM y se inicia la reacción adicionando 50 µl de H_2O_2 (50 µl/50 ml recién preparado), monitoreando el cambio en la absorbancia a 334 nm. Una unidad de MnP se define como la cantidad de enzima requerida para oxidar 1 µmol de Mn^{+2} a Mn^{+3} en un minuto. El coeficiente de absortividad molar $e = 18.300 M^{-1} cm^{-1}$.

La actividad de la lacasa se realizó según lo descrito por Borbonnais *et al*, (1995) preincubando 250 ml de fluido con 100 U (100ml) de Fermcolase Genecor^R por 5 minutos (Boyle *et al*, 1992), con 50 ml de 2,2'-azino-bis-(3-etiltiazolina-6-sulfonato) (ABTS) 0.5 mM como sustrato y 600 ml de solución reguladora de acetato de sodio 50 mM, pH 5.0, monitoreando el incremento de absorbancia a 420 nm. La actividad en unidades se

calculó asumiendo 1 U como la cantidad de enzima que cataliza la oxidación de 1 mmol de ABTS por minuto. El coeficiente de absorptividad molar $\epsilon = 36.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

La actividad de la LiP, la MnP y la lacasa se expresan en unidades por litro (U/L).

Previamente a la determinación de la actividad de las enzimas lignolíticas se descartó la presencia de la enzima aril-alcohol oxidasa, la cual puede ocasionar reacciones de inhibición enzimática. Para tal efecto, se monitorea la absorbancia a 310 nm a una mezcla de 300 ml de fluido extracelular, 50 ml de alcohol veratrflico 10 mM, 600 ml de buffer acetato de sodio pH 5.0, sin adición de H_2O_2 durante 60 segundos. Su ausencia es confirmada si la absorbancia permanece constante. (Rodríguez *et al*, 1996).

Para confirmar la presencia de la lacasa, se determinó su efecto oxidante sobre el alcohol veratrflico mediado por el ABTS, monitoreando el aumento de la absorbancia a 310 nm en otra alícuota de la mezcla anterior adicionando además 50 ml de ABTS 0.5 mM.

Espectros UV-VIS. Utilizando un espectrofotómetro UV-VIS Beckman DU-6, se determinó este espectro a:

- A 400 ml de cada uno de los fluidos A y C, el día de máxima actividad de la LiP (día 8) diluidos a 1 ml con solución buffer de tartrato de sodio pH 3.0 usando esta misma solución buffer como blanco (Paszczynski *et al*, 1986).
- A alícuotas de cada una de los fluidos: A, B y C a los 13 días.
- A 400 ml del fluido B, los días de mínima y máxima actividad de la lacasa (días 8 y 12) diluidos a 1 ml con solución buffer de tartrato de sodio pH 3.0 usando esta misma solución buffer como blanco (Paszczynski *et al*, 1986).

Gel para determinar el peso molecular de la proteína lacasa: El día 13, día de máxima actividad de la lacasa, todo el contenido de uno de los erlenmeyer con el fluido B previamente filtrado por membranas de 0.45 mm, se liofilizó, se redisolvió en 10 ml de buffer de tartrato de sodio pH 3.0 y se cargó sobre geles de poli(acrilamida)-dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Las bandas fueron reveladas con azul de coomassie.

Reactivos Químicos. La peptona microbiológica usada es marca Oxoid Ltda; el ABTS es marca Sigma; todos los demás reactivos son grado reactivo disponibles por diferentes casas comerciales.

Resultados

No se detectó presencia de la enzima aril-alcohol oxidasa en ningún cultivo.

Los resultados de las actividades en U/L de la LiP, MnP y lacasa, se presentan en la figura 1.

En los experimentos donde se usaron cultivos sin Mn^{+2} con 1.25 ppm sólo se detectó la LiP, la cual presentó su máxima actividad el día 8 (29.2 y 61.1 U/L respectivamente).

En los cultivos con una mayor cantidad de Mn^{+2} - 40 ppm - la LiP se presentó solo el día 9 y su actividad se redujo a 11.2 U/L (Figura 1), lo cual se debe a una represión causada por el Mn^{+2} , como lo han reportado algunos autores (Paszczynski *et al* 1986; Gold *et al* 1988; ACS Symposium, 1990; Bonnarme *et al* 1990; Brown *et al* 1990; Pease *et al* 1992; Gold *et al*, 1993; Moilanen *et al* 1996). En estos cultivos (con 40 ppm de Mn^{+2}), la MnP se manifestó entre los días 6 y 12 con máxima actividad el día 10 (99.1 U/L). La lacasa empezó a mostrar actividad desde el día 9, la cual fue aumentando hasta alcanzar su máximo valor el día 13 (71 U/L), cuando la MnP decayó a cero.

En la figura 2 se observan, los espectros de absorción de los cultivos con 0 y 1.25 ppm de Mn^{+2} (cultivos donde sólo se detectó la LiP), el día de su máxima actividad (día 8) a pH 3.0 (pH óptimo para la actividad de ésta enzima). Ambos cultivos muestran el máximo de absorbancia a 407 nm, longitud de onda a la cual la absorción de éste grupo hemo ha sido reportada (Paszczynski *et al*, 1986; ACS Symposium, 1990), lo que corrobora la presencia de la LiP no complejada.

Los espectros de absorción a los 13 días (día de máxima actividad de la lacasa), de los fluidos A (1.25 Mn^{+2}), B (40 ppm Mn^{+2}) y C (0 ppm Mn^{+2}) se muestran en la figura 3. En ellos se observa:

- Cultivo sin Mn^{+2} : No presenta absorción a 407 nm, lo cual corrobora la ausencia de la LiP en este fluido el día 13, como se observa en la figura 1.
- Cultivo con 1.25 ppm de Mn^{+2} : La absorción a 407 nm corrobora que todavía subsiste la actividad de la LiP el día 13.
- Cultivo con 40 ppm de Mn^{+2} : Presenta una banda de absorción ancha entre 390 y 460 nm. (Espectro B de Figura 3) y también presenta una pequeña banda a 600 nm, la cual indica la presencia de la lacasa, cuyo espectro UV ha sido reportado pre-

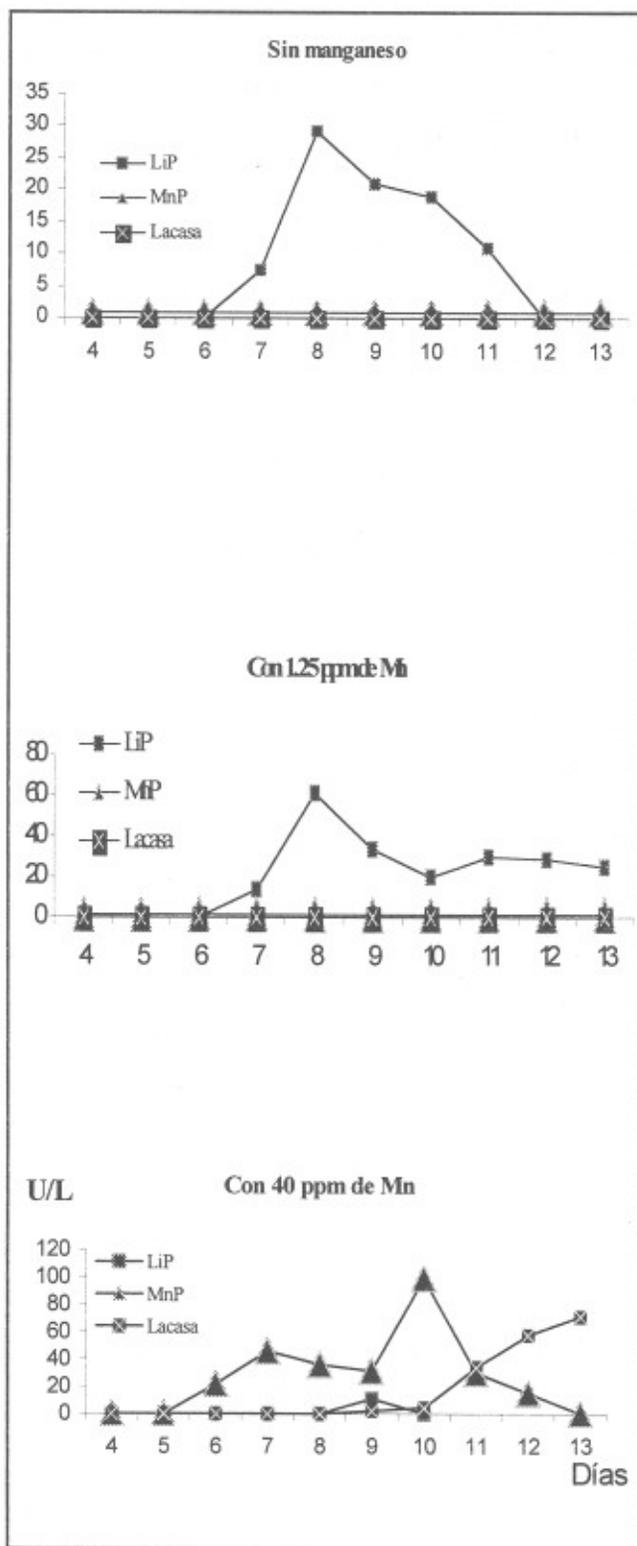


Figura 1. Actividad de las enzimas LiP, MnP y lacasa, en cultivos sumergidos de *Phanerochaete chrysosporium*, con diferentes cantidades de manganeso.

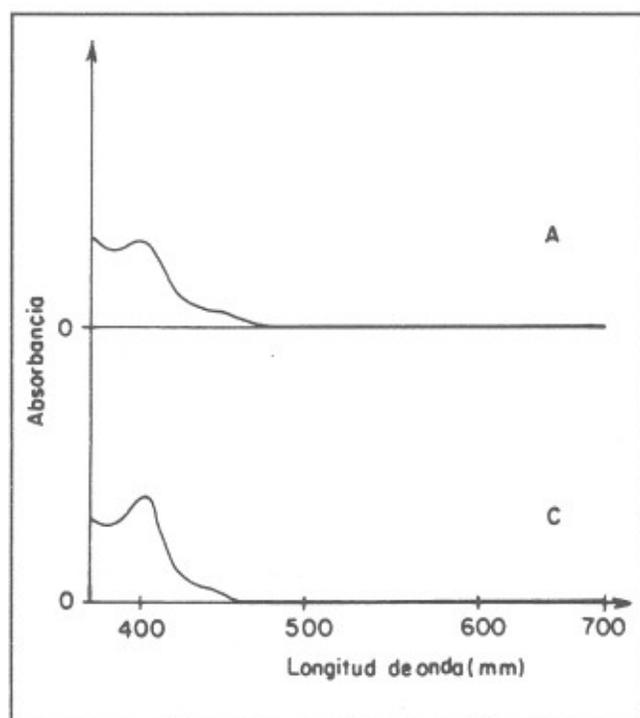


Figura 2. Espectros de absorción de los cultivos con bajo contenido de Mn^{2+} . A (1.25 ppm) y C (0 ppm) a los 8 días (día de máxima actividad de la LiP), con solución buffer de tartrato de sodio $pH=3.0$ como blanco

viamente (Morohoshi, 1990; Thurston, 1994; Pérez *et al*, 1996).

La presencia de lacasa se confirmó comparando el espectro de los cultivos con 40 ppm del día 8 (B_I) y del día 12 (B_{II}), donde hay ausencia y presencia de la lacasa respectivamente (Figura 4) por la aparición de la pequeña banda a 600 nm en el fluido B_{II} . La banda de absorción ancha entre 390 y 460 nm., que se presenta en éstos cultivos, puede ser atribuible a los diferentes estados de oxidación de las enzimas complejadas con Mn^{2+} o Mn^{3+} o con H_2O_2 . (Paszczynski *et al*, 1986; Gold *et al* 1988; ACS Symposium, 1990; Gold *et al*, 1993; Pérez *et al*, 1996) (tanto el día 8 como el día 12, se detectó actividad de la MnP y la lacasa). Aunque el día 13 no se detectó actividad de la MnP en el cultivo con 40 ppm de Mn^{2+} , la banda ancha sigue apareciendo, lo cual indica que puede estar aún presente pero de forma inactiva.

La presencia de la lacasa en los cultivos con 40 ppm de Mn^{2+} también se confirma al monitorear el cambio en la absorbancia a 310 nm producida por la reacción del alcohol veratrílico y la lacasa inducida por ABTS. Este

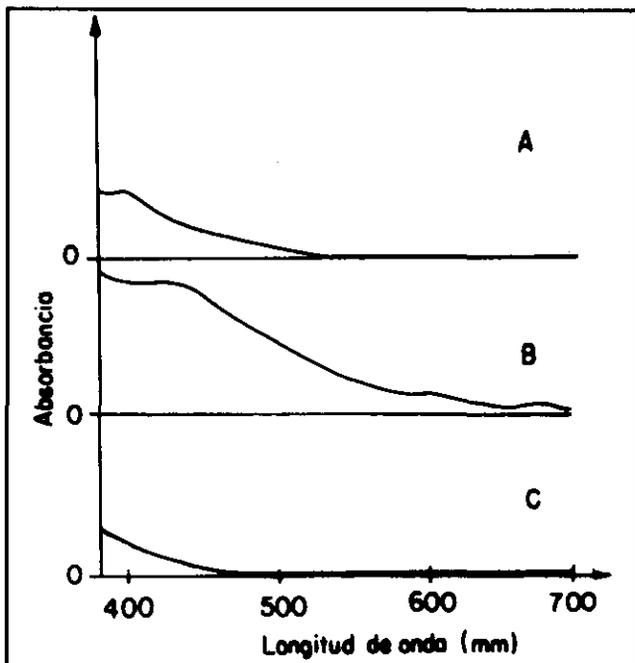


Figura 3. Espectros de absorción de los cultivos con diferentes cantidades de Mn^{2+} . A (1.25 ppm); B (40 ppm) y C (0 ppm), a los 13 días (día de máxima actividad de la lacasa), con agua como blanco

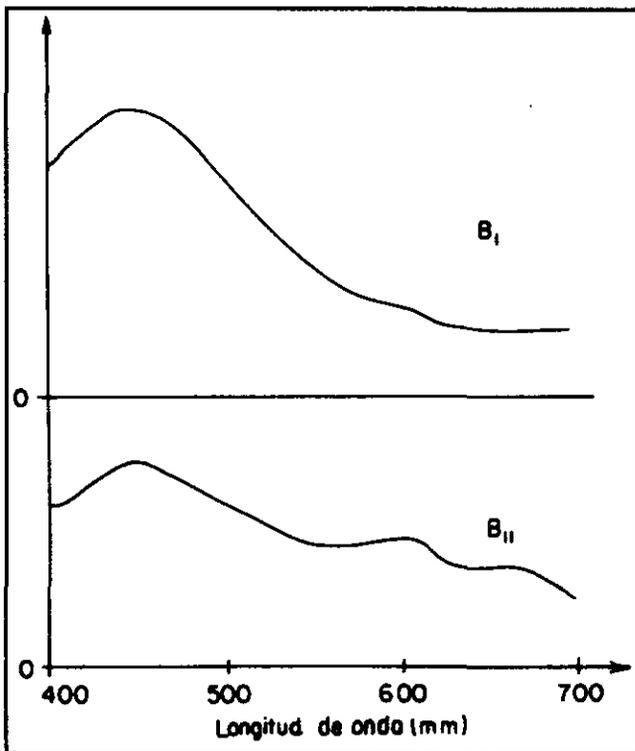


Figura 4. Espectros de absorción de cultivo con alto contenido Mn^{2+} . Fluído B (40 ppm de Mn^{2+}) el día 8 (B_I) y el día 12 (B_{II}) con solución buffer de tartrato de sodio pH 3.0 como blanco

último actúa como un mediador de la actividad de la lacasa, para oxidar compuestos no fenólicos tales como el alcohol veratrílico (Bourbonnais *et al*, 1995; Eggert *et al*, 1996; Collins *et al*, 1998). El aumento en la absorbancia a 310 nm. esta indicando la formación del aldehído veratrílico, corroborando la oxidación del alcohol veratrílico por acción de la lacasa inducida por el ABTS. (Eggert, *et al*, 1996; Collins *et al*, 1998).

El resultado de los geles SDS-PAGE del fluído B a los 13 días, (no se muestra) presentó una sola banda, correspondiente a una proteína de peso molecular aproximado de 46 KD, la cual no puede ser ni LiP, ni MnP, puesto que ese día no se detectó actividad de estas enzimas, pero puede ser atribuida a la lacasa, dado que del *Phanerochaete chrysosporium*, se ha obtenido una lacasa con peso molecular 46.5 KD usando celulosa como fuente de carbono (Srinivisan, 1995).

Discusión

La producción de estas tres enzimas, bajo las condiciones descritas en este estudio, no ha sido reportada. Aunque la producción enzimática obtenida no es alta, la presencia de las tres enzimas en un mismo cultivo es muy interesante de resaltar, porque amplía las opciones que tiene este hongo y su maquinaria enzimática en bioremediación, dado que las enzimas podrían actuar secuencialmente sobre un sustrato dado.

Como se anotó anteriormente son varios los factores que afectan la presencia y o ausencia de la actividad de estas enzimas. La presencia de ellas en el mismo cultivo se puede atribuir a cambios en la relación nitrógeno/manganeso, ya que estos dos nutrientes afectan notablemente la actividad de las enzimas ligninolíticas. Una relación óptima entre estos dos elementos favorece su presencia y puede haberse logrado, por la peptona hidrolizada utilizada en éste estudio, dado que la peptona produce algunos péptidos tales como glicina, cisteína y glutamato, los cuales son poderosos agentes quelantes de metales, entre ellos el manganeso (Eggert *et al*, 1996). Por tanto, en los cultivos con manganeso, parte del manganeso adicionado se compleja y no esta disponible para el microorganismo. De ahí que la inhibición de la LiP no fué total, en los cultivos con alto manganeso (40 ppm), debido a que el manganeso disponible no era tan alto para inhibirla. Pero además, el alcohol veratrílico adicionado inicialmente a los fluídos, pudo jugar un rol protector de esta enzima (Mester *et al*, 1995; Valli *et al*, 1990). El alcohol veratrílico previene de la inactivación que puede causarle el H_2O_2 presente en el cultivo, el cual es producido por la oxidación de la glucosa por la glyoxal oxidasa

(Kersten, 1990; Kurek *et al*, 1995). Se conoce además que el *Phanerochaete chrysosporium* sintetiza alcohol veratrílico por la vía metabólica del ácido shikímico, aunque su producción es menor en cultivos con alto contenido de manganeso (Jensen *et al*, 1994, Dittmer *et al*, 1997).

En cuanto al nitrógeno, en la peptona hidrolizada está más disponible y por tanto su efecto puede ser similar al que se da cuando el medio tiene suficiente nitrógeno, causando disminución de la actividad de las enzimas LiP y MnP, las cuales se encontraron con muy baja actividad y a su vez esa mayor disponibilidad del nitrógeno favoreció la presencia de la lacasa.

Referencias

- ACS Symposium. Series 460. 1990 "Enzymes in biomass conversion". Ed. Gary F. Leathan. Chapter 14,15,16,20. Pag 181-223.
- Alic Li D., Brown M. J. A. & Gold, M. H. 1995. "Regulation of Manganese Peroxidase Gene transcription by hydrogen peroxide, chemical stress and molecular oxygen". Appl. Environm. Microb. **61**: 341-345.
- Blanchette R.A. 1984 "Manganese in wood decayed by white rot fungi". Phytopathology, **74**: 725-730.
- Bonnarme P. & Jeffries T.W. 1990. "Mn(II) regulation of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidases from lignin-degrading white rot fungi". Appl. Environm. Microb. **56**: 210-217.
- Bourbonnais R. & Paice M.G. 1990. "Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation". FEBS Lett. **267**: 99-102.
- _____, Reid I. D., Lanthier P. & Yaguchi M. 1995 "Lignin oxidation by laccase isoenzymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-Azinobis (3-Ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization" Appl. Environm. Microb., **61** (5): 1876-1880.
- Boyle C.D., Kropp B. R., & Reid I.D. 1992. "Solubilization and mineralization of lignin by white rot fungus" Appl. Environm. Microb. **58** (10): 3217-3224.
- Brown J. A.; Glenn J. K. & Gold M. H. 1990. "Manganese regulates the expression of manganese peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*" J. Bacter. **172**: 3125-3130.
- Bumpus J. A. & Aust S. D. 1987. "Biodegradation of environmental pollutants by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* involvement of the lignin-degrading system". Bioessays **6**: 166-170.
- Collins P., Bobson A.D. & Field J. 1998. "Reduction of 2,2'-Azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) cation radical by physiological organic acid in the absence and presence of manganese", Appl. Environm. Microb. **64** (6): 2026-2031.
- Dittmer J. K., Patel N. J., Dhawale S. W. & Dhawale S. S. 1997) "Production of multiple laccase isoforms by *Phanerochaete chrysosporium* grown under nutrient sufficiency" FEMS Microb., **149**: 65-70.
- Dosoretz C.G., Chen H-C & Grethlein H.E. 1990. "Effect of environmental conditions on extracellular protease activity in lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*", Appl. Environm. Microb., **56** (2): 395-400.
- Eggert C., Temp U., Jeffrey F.D. & Eriksson K-E. L. 1996 "A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase". FEBS Letters **391**: 144-148.
- Eriksson K.E. & Pettersson B. 1982. "Purification and partial characterization of two acidic proteases from the white rot fungus *Sporotrichum pulvurulentum*" Eur. J. Biochem., **124**: 635-642.
- Feljoo A.V., Rothschild G., Dosoretz N. & Lema J.M. 1995."Effect of addition of extracellular culture fluid on lignolytic enzyme formation in *Phanerochaete chrysosporium*" J. Biotech., **40** (1): 21-29.
- Gary F. L., Crawford R. L. & Kirk T. K. 1983. "Degradation of Phenolic compounds and ring cleavage of catechol by *Phanerochaete chrysosporium*" Appl. Environm. Microb. **46** (1): 191-197.
- Glenn J. K.; Morgan M. A.; Mayfield M.B.; Kuwahara M. & Gold M. H. 1983. "An extracellular H₂O₂-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*". Biochem. Biophys. **114**: 1077-1083.
- Gold M. H. & Glenn J. K. 1988. "Manganese Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*". Methods in Enzymology, **161**: 258-264.
- _____; Wariishi H. & Valli K. 1989. "Extracellular peroxidases involved in lignin degradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*". ACS Symposium, **389**: 127-140.
- _____ & Alic M. 1993. "Molecular biology of the lignin-degradin basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*". Microb. Reviews **57** (3): 605-622.
- Jeffries T. W.; Choi S. & Kirk T. K. 1987. "Nutritional regulation of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*". Appl. Environm. Microb. **42**: 290-296.
- Jensen K. A., Jr, Evans M.C., Kirk T.K. & Hammel K.E. 1994) "Biosynthetic pathway for veratryl alcohol in lignolytic fungus *Phanerochaete chrysosporium*" Appl. and Environm. Microb. **60**: 709-714.
- Jiménez G.A., Penninckx M.J. & Lejeune R. 1997. "The relationship between pellet size and production of Mn(II) peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium* in submerged culture". Enzyme and Microb. Technol. **21**: 537-542.
- Kersten P. J. 1990. "Glyoxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: Its characterization and activation by lignin peroxidase". Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **87**: 2936-2940.
- Kirk T. K.; Tien M.; Kersten P. J.; Mozuch M. D. & Kalyanaraman B. 1986. "Ligninase of *Phanerochaete chrysosporium*. Mechanism of its degradation of the non-phenolic arylglycerol B-aryl ether substructure of lignin". Biochem J. **236**: 279-287.
- Kurek B., & Kersten P. J. 1995. "Physiological regulation of glyoxal oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* by peroxidase systems". Enzyme and Microbial Technology, **17**: 751-756.
- Kuwahara M.; Glenn J. K.; Morgan M. A. & Gold M. H. 1984. "Separation and characterization of two extracellular H₂O₂

- dependent oxidases from lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*". FEBS Lett., 169: 247-250.
- Mester T., De Jong E. & Field J.A. 1995. "Manganese regulation of veratryl alcohol in white rot fungus and its indirect effect on lignin peroxidase" Appl. and Environm. Microb. 61 (5): 1881-1887.
- Moilanen A.M., Lundell T., Vares T. & Hatakka A. 1996 "Manganese and malonate are individuals regulators for the production of lignin and manganese peroxidase isoenzymes and in the degradation of lignin by *Phlebia radiata*". Appl Microb. Biotechnol., 45: 792-799.
- Morohoshi N. ACS Symposium. Series 460. 1990 "Enzymes in biomass conversion". Ed. Gary F. Leathan. Chapter 17: 207-223.
- Orth A. B. & Tien M. 1995 "Biotechnology of lignin degradation. In Ulrich Kuck (Ed.), The Mycota. A comprehensive treatise on fungi as experimental system for basic and applied research. Genetics and Biotechnology II. K. Esser and P. A. Lemke, 287-302.
- Paszczynski, A. ; Huynh V. B. & Crawford R. 1986. "Comparison of ligninase-1 and peroxidase M-2 from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*". Arch. Biochem. Biophys. 244: 750-765.
- Pease E. A. & Tien M. 1992. "Heterogeneity and regulation of manganese peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*". J. Bacter. 174: 3532-3540.
- Penninckx M. & Jiménez G.A. 1996 "Transformación Microbiológica de la Biomasa, Curso teórico-práctico". Université Libre de Bruxelles and Universidad de Antioquia. Medellín, Abril 22-27.
- Perez J. & Jeffries TW. 1990. "Mineralization of ¹⁴C ring-labeled synthetic lignin correlates with the production of lignin peroxidase, not of manganese peroxidase or laccase" Appl. Environm. Microb. 56: 1806-1812.
- , Martínez J. & De la Rubia T. 1996 "Purification and partial characterization of a laccase from the white rot fungus *Phanerochaete flavido-alba*", Appl. Environm. Microb. 62(11): 4263-4267.
- Rodríguez A. , Falcón M. A., Carnicero A., Perestelo F., De la Fuente G. & Trojanowski J. 1996. "Laccase activities of *Penicillium chrysogenum* in relation to lignin degradation" Appl. Microb. Biotech. 45: 399-403.
- Srinivasan, P. 1995 "Production the lacasse of *Phanerochaete chrysosporium*" Appl. and Environ. Microb, 60(2): 349-356.
- Tien M. & Kirk T. K. 1983. "Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* burds". Science. 221: 661-663.
- Thurston, F. Christopher. 1994. "The structure and function of fungal laccases". Microb. 140: 19-26.
- Thompson D. N., Hames B. R., Reddy C. A. & Grethlein H.E. 1998. "In vitro degradation of natural insoluble lignin in aqueous media by the extracellular peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*" Biotech. And Bioeng. 57 (6): 704-717.
- Valli K., Waritshi H. & Gold M. H. 1990. "Oxidation of monomethoxylated aromatic compounds by lignin peroxidase: role of veratryl alcohol in lignin biodegradation", Biochemistry, 29: 8535-8539.