

Aproximaciones a la comprensión de la degradación de la lignina

Approaches to understanding lignin degradation

Martha L. Ortiz¹

¹Facultad de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad de los Llanos. mlortizm@unillanos.edu.co

Recibido: Marzo 31 de 2009 Aceptado: Septiembre 17 de 2009

RESUMEN

El objetivo de esta revisión es reunir los hallazgos más recientes que aportan a la comprensión de las rutas metabólicas que intervienen en la degradación del biopolímero más recalcitrante del planeta: la lignina. Esta le proporcionó a las plantas resistencia mecánica en sus tejidos para colonizar la tierra y una barrera fisicoquímica ante la infección microbiana. Debido a su naturaleza recalcitrante, la lignina es el precursor principal para la síntesis de la reserva de materia orgánica del suelo, regulando el ciclo del carbono. Adicionalmente, el sistema enzimático extracelular inespecífico que usan los microorganismos para degradar la lignina, ofrece un sinnúmero de moléculas con potencial biotecnológico. Este trabajo pretende estimular la investigación en la degradación de lignina, especialmente en ambientes poco explorados como la Amazorinoquia para el desarrollo de la bioprospección en nuestro país.

Palabras clave: Lignina, enzimas, microorganismos, biotecnología.

ABSTRACT

This work was aimed at summarising our current knowledge regarding understanding the metabolic routes intervening in lignin degradation, this being the most recalcitrant biopolymer on earth. Lignin provides plant tissues with mechanic resistance for colonising the earth and represents a physicochemical barrier to microbial infection. Lignin is the main precursor for synthesising the reserve of soil organic matter due to its recalcitrant nature, thereby regulating the carbon cycle. The unspecific extracellular enzymatic system used by microorganisms for lignin degradation offers a large number of molecules having biotechnological potential. This work tries to stimulate research into lignin degradation, especially in little-explored environments such as the Amazon-Orinoquia region for developing bioprospecting in Colombia.

Key words: Lignin, enzyme, microorganism, biotechnology.

INTRODUCCIÓN

La pared celular vegetal esta compuesta principalmente de polisacáridos como celulosa, hemicelulosa y pectina, que están unidos con proteínas y lignina, formando una estructura rígida y compleja. Se estima que aproximadamente 4×10^9 ton de celulosa y $0,8 \times 10^9$ ton de lignina se producen anualmente en el planeta, sin embargo estos polímeros no se acumulan en la tierra debido a hongos y bacterias, que degradan eficientemente los componentes de la biomasa vegetal. Estos microorganismos tienen un rol clave en el reciclaje del carbono en los ecosistemas. La degradación de la biomasa vegetal es un proceso complejo que involucra la acción sinérgica de un gran número de enzimas extracelulares (Aro *et al.*, 2005).

Estas enzimas no sólo participan en el ciclo del carbono, también se consideran como factores de virulencia en microorganismos fitopatógenos, los cuáles son activados por señales ambientales y de quórum sensing (Dong *et al.*, 2000). Las enzimas degradadoras de polisacáridos adicionalmente, determinan la capacidad de ataque de los hongos

LOS POLISACÁRIDOS DE LA PARED CELULAR VEGETAL Y LA LIGNINA

La pared celular vegetal contiene celulosa, hemicelulosa, pectina y el polímero fenólico lignina. La Celulosa es el polisacárido más abundante en la naturaleza y el principal constituyente de la pared celular vegetal proveyéndole rigidez. La Celulosa esta formada por unidades de D-glucosa unidas por enlaces b 1-4 que forman cadenas poliméricas lineares de aproximadamente 8000-12000 unidades de glucosa (Alexander, 1967).

Las hemicelulosas, son los segundos polímeros en importancia, tienen una composición heterogénea de varios tipos de unidades de azúcar. Las hemicelulosas son usualmente clasificadas de acuerdo al residuo de azúcar principal en la estructura del polímero. Las más importantes son el xilan, encontrado en diferentes tipos de plantas y el (galacto)glucomanano de las maderas, están formados por D-xilosas o D-manosas

micoparasíticos, al permitirles hidrolizar la pared celular de su fitopatógeno fúngico blanco (Inglis & Kawchuk, 2002).

Muchas de las enzimas degradadoras de biomasa vegetal han recibido considerable atención por sus potenciales aplicaciones en las industrias de alimentos, concentrados, agropecuarias, textiles, del papel y petrolera (Buchert *et al.*, 1998; van Wyk, J., 2001; de Vries *et al.*, 2002; Penttilä, *et al.*, 2003; Lynd *et al.*, 2005; Couto & Sanromán, 2005).

Es de destacar que la importancia de los hongos en el ciclo del carbono y biotecnológica como vehículos de sobreexpresión de enzimas de interés industrial, han promovido el interés en la comprensión de la producción de las enzimas extracelulares lignocelulolíticas. Los hongos filamentosos más estudiados con respecto a sus enzimas degradadoras de biomasa vegetal son *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, *Penicillium sp* y el basidiomiceto lignolítico *Phanerochaete chrysosporium*.

unidas por enlaces b 1-4, respectivamente. Las hemicelulosas menos frecuentes son el arabinano formado por unidades de L-arabinosa con enlaces a 1-5 y galactano que posee unidades de D-galactosa asociadas por enlaces b 1-3. La cadena principal de azúcares de las hemicelulosas es modificada por varios grupos sustituyentes como el ácido 4-O-metilglucurónico, arabinosa, galactosa y acetil, haciendo a las hemicelulosas ramificadas y con estructura variable (Timell, 1967; Wilkie, 1979).

Las pectinas son una familia de polisacáridos complejos que contiene unidades de ácido D-galacturónico unidas por enlaces a 1-4. Las pectinas contienen dos diferentes tipos de regiones, de acuerdo a su apariencia en las microfotografías electrónicas. En la región "lisa" de la pectina, hay residuos de ácido D-galacturónico metilados o acetilados, mientras que

en la región "ramificada" hay D-xilosa sustituida con galacturano y ramnogalacturano, las cadenas de arabinano y galactano se unen por los residuos de ramnosa (Aro *et al.*, 2005).

La pared de celulosa es reforzada por la lignina, un polímero insoluble, complejo y ramificado de unidades fenilpropano sustituidas, las cuáles se unen por en-

ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA DEGRADACIÓN DE LA LIGNINA: LIGNINASAS

En la pared celular vegetal, la lignina forma una matriz que envuelve a la celulosa y hemicelulosa. La degradación de lignina es un prerrequisito para la hidrólisis de los demás componentes de la biomasa vegetal, los cuáles son la principal fuente de carbono y energía para los microorganismos. Sin embargo, la hidrofobicidad, la estructura aleatoria, compleja y carente de enlaces hidrolizables comunes, hacen de la lignina resistente a la degradación, por parte de la mayoría de microorganismos degradadores de celulosa.

Las enzimas que degradan la lignina son oxidativas, inespecíficas y actúa vía mediadores no-proteicos en contraste con las celulasas y hemicelulasas hidrolíticas. Las principales enzimas lignolíticas son las manganeso peroxidadas (MnP), Lignin peroxidadas (LiP) que catalizan una variedad de reacciones oxidativas que son dependientes de H₂O₂, y las laccasas que oxidan compuestos fenólicos reduciendo el oxígeno molecular a agua. Adicional a

EXPRESIÓN DE LIGNINASAS

La regulación de los genes codificantes para las enzimas lignolíticas ha sido estudiada a nivel del mRNA principalmente en *Phanerochaete chrysosporium*. Estudios en la expresión de los genes de la manganeso peroxidasa (*mnp*) y lignin peroxidasa (*lip* o *LIG*) son complicados por el hecho de que la mayoría hongos lignolíticos posee varios genes *lip* y *mnp*, cercanamente relacionados pero regulados de forma diferente. Por ejemplo, *P. chrysosporium* tiene al menos 10 genes *lip*

laces éter o carbono-carbono formando una extensa red dentro de la pared celular vegetal, estos enlaces hacen que sea un polímero recalcitrante. Este polímero es el producto de la condensación de varias moléculas y no es formado por una vía enzimática, lo cual determina que su estructura sea altamente variable, dependiendo el tipo de planta, su estado fenológico y tasa fotosintética (Leonowicz *et al.*, 1999).

estas también participan enzimas generadoras de peróxido de hidrógeno extracelular como la glioxal oxidasa y la glucosa2oxidasa que generan peróxido esencial para el funcionamiento de las peroxidadas.

Desde la clonación del primer gen *lip* codificante para una lignina peroxidasa de *P. chrysosporium* por Tien & Tu (1987), varios genes *lip* han sido caracterizados en *P. chrysosporium* (Gaskell, *et al.*, 1994; Gold & Alic, 1993), como también en otros basidiomicetos como *T. versicolor*, *P. radiata*, *Bjerkandera sp.*, y *Pleurotus sp* (Black & Reddy, 1991; Jonsson *et al.*, 1994; Saloheimo *et al.*, 1989; Kimura *et al.*, 1991; Ruiz-Duenas *et al.*, 1999). Comparados a los genes *lip*, el número de genes caracterizados que codifica para manganeso peroxidadas es pequeño (Lobos *et al.*, 1998; Alic *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1999). Los genes lignolíticos en basidiomicetos, generalmente están organizados en clusters en los genomas fúngicos como es el caso para los dos *lip* y gen de manganeso peroxidasa *mnp*, de *T. versicolor* (Johansson & Nyman, 1996).

designados desde *lip A* hasta *lip J* (Gaskell *et al.*, 1994) y tres genes *mnp*, *mnp1* a *mnp3* (Alic *et al.*, 1997; Mayfield *et al.*, 1994; Godfrey *et al.*, 1990).

Además del alto número de genes homólogos *lip*, *mnp* y laccasa encontrados en hongos lignolíticos; el estudio de la expresión de los genes de codificantes para laccasas por métodos tradicionales como el análisis Northern blot es problemático, debido a las dificultades para la selección de sondas específicas replicables. La técnica de transcripción

reversa acoplada a PCR (RT-PCR) recientemente ha sido usada para estudios cuantitativos de la expresión de genes lignolíticos, bajo diferentes condiciones ambientales. Sin embargo, la replicabilidad de esta técnica como método cuantitativo es controversial (Freeman *et al.*, 1999).

En general, la expresión de genes lignolíticos es activada por la disminución de nutrientes como el nitrógeno, carbono o azufre y es por ende una respuesta de estrés ante carencias nutricionales. En *P. chrysosporium*, la expresión del gen *mnp* es activada por la ausencia de nitrógeno en el cultivo (Gold & Alic, 1993; Li *et al.*, 1994).

También la presencia de Mn(II) en el medio de cultivo activa la expresión de *mnp* (Brown *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 1991; Gold & Alic, 1993; Gettemy *et al.*, 1998). La presencia de posibles elementos de respuesta metálicos, ha sido reportada en los promotores de la manganeso peroxidasa (Brown *et al.*, 1991; Gold & Alic, 1993; Gettemy *et al.*, 1998).

La expresión de *mnp* es también inducida por el choque térmico en condiciones de carencia en nitrógeno y se han encontrado secuencias del elemento consenso de choque térmico (CN₂GAAN₂TTCN₂G) en los promotores de genes *mnp* (Godfrey *et al.*, 1990; Mayfield *et al.*, 1994). Además, la adición de H₂O₂ y otras sustancias que participan en el estrés

ROL DE LOS HONGOS Y BACTERIAS COMO DEGRADADORES DE LIGNINA

La lignina esta presente en las plantas terrestres y les da la rigidez estructural necesaria para la colonización del ambiente terrestre (Fengel, D., 1971; Ewbank *et al.*, 1996). A pesar de su amplia distribución y temprana aparición en la vida terrestre, su descomposición es realizada por un número restringido de microorganismos, principalmente hongos y dentro de estos se destacan los Basidiomicetos que debido a su capacidad para mineralizar la lignina, se les denomina hongos de la podredumbre blanca (Rayner & Boddy, 1988; Worrall *et al.*, 1997; Leonowicz *et al.*, 1999; Tuomela *et al.*,

celular, también inducen la expresión de *mnp* in *P. chrysosporium* (Li *et al.*, 1995). Al parecer la regulación de los genes *mnp* ocurre al menos en dos vías diferentes: el choque térmico y la inducción causada por los factores de estrés que sólo se da en cultivos limitados en nitrógeno, dependiente de la presencia de Mn(II). De igual manera los genes *lip* de *P. chrysosporium* son regulados de varias maneras, por ejemplo la respuesta a la deficiencia de nitrógeno y carbono (Stewart *et al.*, 1992; Broda *et al.*, 1995; Stewart & Cullen, 1999).

La expresión de los genes codificantes para laccasas no es dependiente de la limitación nutricional. Las laccasas son expresadas de forma constitutiva en los hongos basidiomicetos (Eggert *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1998; Scheel *et al.*, 2000). Esta expresión constitutiva puede ser aumentada por inductores. Se ha reportado el aumento en la transcripción de la laccasa en respuesta a compuestos aromáticos como la 2,5-xilidina, para *T. versicolor* (Collins & Dobson, 1997), *Trametes villosa* (Yaver *et al.*, 1996) y *Agaricus bisporus* (Smith *et al.*, 1998). Se ha postulado que las laccasas, de expresión constitutiva, son las primeras enzimas degradadoras de lignina y que sus productos enzimáticos son inductores para el aumento de la síntesis de laccasas y la expresión de otros genes lignolíticos (Scheel *et al.*, 2000). Los factores de transcripción reguladores de los genes codificantes de enzimas involucradas en la degradación de lignina aún no han sido descritos.

2000). La degradación de la lignina sólo ocurre bajo condiciones aeróbicas.

La actividad lignolítica bacteriana es despreciable en ambientes terrestres, comparada con la de los hongos de la podredumbre blanca (Leonowicz *et al.*, 1999; Kirk & Farrell, 1987). Sin embargo, el crecimiento de bacterias filamentosas y no filamentosas en compuestos similares a la lignina ha sido reportada (Céspedes *et al.*, 1997; Falcón *et al.*, 1995; Vicuña *et al.*, 1993; Peng *et al.*, 2002). Varias especies de actinomicetos pueden solubilizar lignina, en particular la lignina de los pastos (Tuomela *et al.*, 2000; Trigo & Ball, 1994). Ellos pueden utilizar

una estrategia similar a la de los hongos de la podredumbre parda (es decir los que hacen oxidación parcial de la lignina), para ganar acceso a la celulosa (Tuor *et al.*, 1995; Leonowicz *et al.*, 1999; Lynd *et al.*, 2002).

Los hongos que causan la podredumbre parda, generalmente hongos filamentosos, producen finas hifas de penetración que les dan acceso a la segunda capa lignificada de la pared celular, formando cadenas de cavidades en forma de diamante alrededor de la hifa y que siguen la orientación de las microfibras de celulosa (Rayner & Boddy, 1988; Daniel & Nilsson, 1998). Los

hongos que causan la podredumbre parda oxidan parcialmente la lignina dentro de una extensión limitada alrededor de la hifa. La degradación de la celulosa implica la participación de enzimas hidrolíticas y una reducción del pH del medio (por la liberación de oxalato) y la excreción de glicopeptidos de bajo peso molecular que contienen hierro, adicional a la generación de peróxido de hidrógeno. Los radicales libres son producidos por la reacción de Fenton, reduciendo el Fe(II) a Fe(III), y presumiblemente difunden libremente en la segunda capa lignificada de la pared celular, donde participan en la depolimerización de la lignina (Goodell, 2003).

PERSPECTIVAS

La capacidad de los hongos filamentosos para degradar de manera eficiente polímeros vegetales es una característica importante que provee un tópico interesante para los estudios concernientes a la ecología microbiana y los mecanismos básicos de la regulación nutricional, también ofrece un sinnúmero de posibles aplicaciones industriales.

Para lograr llegar al establecimiento de procesos biotecnológicos, es necesario comprender a) como las enzimas lignocelulíticas producen a partir de sus sustratos, compuestos como los azúcares oligoméricos y monoméricos, ácidos y sustancias fenólicas, b) las señales intracelulares regulatorias de la expresión de las enzimas degradadoras de polímeros de origen vegetal y c) las respuestas metabólicas que estos compuestos provocan en los hongos.

Adicionalmente, se requiere evaluar como funcionan las rutas metabólicas en diferentes especies fúngicas con distintos roles ecológicos como los anaeróbicos ruminales, los saprofitos del suelo y los fitopatógenos altamente especializados, especialmente en

ecosistemas microbianos poco estudiados como los de la Amazonía y Orinoquía.

Por otro lado, se deben diseñar experimentos que sean más representativos del papel ecológico de los hongos degradadores de lignina utilizando mezclas de sustratos, inductores e inclusive de cepas, para obtener paquetes biotecnológicos a la medida de la industria.

Las técnicas de biología molecular y celular fúngica se han desarrollado rápidamente en los últimos 15 años. Sin embargo, la mayoría de técnicas aún siguen siendo complejas y dispendiosas con respecto a las de otros microorganismos, por lo tanto es menester de los investigadores perfeccionar estas técnicas para ponerlas al alcance de los ecólogos microbianos del mundo.

El número de genomas completamente secuenciados aumentará rápidamente en los próximos años, lo cuál permitirá disponer de información para realizar genómica comparativa y así dilucidar la estructura de las vías bioquímicas regulatorias involucradas en la degradación de la biomasa vegetal.

REFERENCIAS

Alexander M. 1967, Introduction to soil microbiology, pp. 197-215. Jhon Wiley & Sons, Inc., New York.

Alic M, Akileswaran L, Gold M. Characterization of the gene encoding manganese peroxidase isoenzyme

3 from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochimic and Biophysic Acta* 1997; 1338:1-7.

Aro N, Pakula T, Penttilä M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*. 2005; 29:719-739.

- Black A, Reddy C. Cloning and characterization of a lignin peroxidase gene from the White-rot fungus *Trametes versicolor*. Biochemistry and Biophysics Research Community. 1991; 179:428-435.
- Broda P, Birch P, Brooks P, Sims P. PCR-mediated analysis of lignocellulolytic gene transcription by *Phanerochaete chrysosporium*: substrate-dependent differential expression within gene families. Applied and Environmental Microbiology. 1995; 61: 2358-2364.
- Brown J, Glenn J, Gold M. Manganese regulates expression of manganese peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*. Journal of Bacteriology. 1990; 172: 3125-3130.
- Brown J, Alic M, Gold M. Manganese peroxidase gene transcription in *Phanerochaete chrysosporium*. Journal of Bacteriology. 1991; 173:4101-4106.
- Buchert J, Oksanen J, Pere J, Siika-Aho M, Suurnäkki A, Viikari L. 1998, Applications of *Trichoderma reesei* enzymes in the pulp and paper industry (Harman, G., and Kubicek, C., Eds) *Trichoderma and Gliocladium*, vol 2, pp. 343-364. Taylor & Francis, London.
- Céspedes R, González B, Vicuña R. Characterization of a bacterial consortium degrading the lignin model compound vanillyl-b-glucopyranoside. Journal of Basic Microbiology. 1997; 3: 175-180.
- Collins P, Dobson A. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. Applied and Environmental Microbiology. 1997; 63: 3444-3450.
- Couto S, Sanromán M. Coconut flesh: a novel raw material for laccase production by *Trametes hirsuta* under solid-state conditions. Application to Lissamine Green B decolourization. Journal of food engineering. 2005; 71:208-213.
- Daniel G, Nilsson T. 1998, Developments in the study of the soft rot and bacterial decay In: Forest products Biotechnology (Bruce, A., and Palfreyman, J., Eds), pp.37-62. Taylor & Francis, London.
- De Vries R, Benen J, de Graaff L, Visser J. 2002, Plant cell wall degrading enzymes produced by *Aspergillus* (Osiewacz, H., Ed.), The Mycota, vol 10, pp. 263-279. Springer Verlag, Berlin.
- Dong Y, Wang L, Xu J, Zhang H, Zhang X, Zhang L. Quenching quorum sensing dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. Nature 2001; 411:813-817.
- Eggert C, Temp U, Eriksson K. The ligninolytic system of the White-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. Applied and Environmental Microbiology. 1996; 62: 1151-1158.
- Falcón M, Rodríguez A, Carnicero A, Regalado V, Perestelo F, Milstein O, De la Fuente G Isolation of microorganisms with lignin transformation potential from soil of Tenerife Island. Soil Biology and Biochemistry. 1995; 27: 121-126.
- Freeman W, Walker S, Vrana K. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. Biotechniques. 1999; 26 (112-122):124-115.
- Gaskell J, Stewart P, Kersten P, Covert S, Reiser J, Cullen D. Establishment of genetic linkage by allele-specific polymerase chain reaction: application to the lignin peroxidase gene family of *Phanerochaete chrysosporium*. Biotechnology (NY). 1994; 12:1372-1375.
- Gettemy J, Ma B, Alic M, Gold M. Reverse transcription-PCR analysis of the regulation of the manganese peroxidase gene family. Applied and Environmental Microbiology. 1998; 64:569-574.
- Godfrey B, Mayfield M, Brown J, Gold M. Characterization of a gene encoding a manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Gene 1990; 93:119-124.
- Gold M, Alic M. Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Microbiology Reviews. 1993; 57:605-622.

- Goodell B. 2003, Brown-rot fungal degradation of Wood: our evolving view In: Wood deterioration and preservation (Goodell, B., Nicolas, D., Schultz, T., Eds), ACS Symposium Series, vol 845, pp.97-118. American Chemical Society, Washington D.C.
- Inglis G, Kawchuk L. Comparative degradation of oomycete, ascomycete, and basidiomycete cell walls by mycoparasitic and biocontrol fungi. Canadian Journal of Microbiology. 2002; 48:60-70.
- Johansson T, Nyman P. A cluster of genes encoding major isozymes of lignin peroxidase and manganese peroxidase from the White-rot fungus *Trametes versicolor*. Gene 1996; 170:31-38.
- Jonsson L, Nyman P. Characterization of a lignin peroxidase gene from the White-rot fungus *Trametes versicolor*. Biochimie 1992; 74:177-182.
- Jonsson L, Becker H, Nyman P. A novel type of peroxidase gene from the White-rot fungus *Trametes versicolor*. Biochimic and Biophysic Acta. 1994; 1207:255-259.
- Kimura Y, Asada Y, Oka T, Kuwahara M. Molecular analysis of a *Bjerkandera adusta* lignin peroxidase gene. Applied Microbiology and Biotechnology. 1991; 35:510-514.
- Kirk T, Farrell R. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. Annual Reviews of Microbiology . 1987; 41: 465-505.
- Leonowicz A, Matuszewska M, Luterek J, Ziegenhagen D, Wojtas-Wasilewska M, Cho N, Hofrichter M, Rogalski J. Biodegradation of lignin by White-rot fungi. Fungal Genetics and Biology. 1999; 27: 175-185.
- Li D, Alic M, Gold M. Nitrogen regulation of lignin peroxidase gene transcription. Applied and Environmental Microbiology. 1994; 60: 3447-3449.
- Li D, Alic M, Brown J, Gold M. Regulation of manganese peroxidase gene transcription by hydrogen peroxide, chemical stress, and molecular oxygen. Applied and Environmental Microbiology. 1995; 61:341-345.
- Li D, Li N, Ma B. Mayfield, M., Gold, M., Characterization of genes encoding two manganese peroxidases from the lignin-degrading fungus *Dichomitus squalens*. Biochimic and Biophysic Acta 1999; 1434(1):356-364.
- Lynd L, van Zyl W, Mc Bride J, Laser M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update, Current opinion in Biotechnology. 2005; 16:577-583.
- Lynd L, Weimer P, van Zyl W, Pretorius I. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2002; 66: 506-577.
- Lobos S, Larrondo L, Salas L, Karahanian E, Vicuna R. Cloning and molecular analysis of a cDNA and the Cs-mnp1 gene encoding a manganese peroxidase isozyme from the lignin-degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. Gene 1998; 206:185-193.
- Mayfield M, Godfrey B, Gold M. Characterization of the mnp2 gene encoding manganese peroxidase isozyme 2 from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Gene 1994; 142:231-235.
- Peng X, Masai E, Kitayama H, Harada K, Katayama Y, Fukuda M. Characterization of the 5-carboxyvanillate decarboxylase gene and its role in lignin-related biphenyl catabolism in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. Applied and Environmental Microbiology. 2002; 68: 4407-4415.
- Penttilä M, Limón C, Nevalainen H. 2003, Molecular biology of *Trichoderma* and biotechnological applications In: Handbook of Fungal Biotechnology (Arora, K., Ed), pp. 413-427. Marcel Dekker Inc., New York.
- Rayner A, Boddy L. 1988, Wood decomposition: its biology and ecology, pp.124-173. Jhon Wiley & Sons, New York.

- Ruiz-Duenas F, Martinez M, Martinez A. Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Molecular Microbiology*. 1999; 31:223-235.
- Saloheimo M, Barajas V, Niku-Paavola M, Knowles J. A lignin peroxidase-encoding cDNA from the White-rot fungus *Phlebia radiata*: characterization and expression in *Trichoderma reesei*. *Gene*. 1989; 85: 343-351.
- Scheel T, Hofer M, Ludwig S, Holker U. Differential expression of manganese peroxidase and laccase in White-rot fungi in the presence of manganese or aromatic compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2000; 54: 686-691.
- Smith M, Shnyreva A, Wood D, Thurston C. Tandem organization and highly disparate expression of the two laccase genes *lcc1* and *lcc2* in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Microbiology*. 1998; 144: 1063-1069.
- Stewart P, Kersten P, Vanden - Wymelenberg A, Gaskell J, Cullen D. Lignin peroxidase gene family of *Phanerochaete chrysosporium*: complex regulation by carbon and nitrogen limitation and identification of a second dimorphic chromosome. *Journal of Bacteriology* 1992; 174: 5036-5042.
- Stewart P, Cullen D. Organization and differential regulation of a cluster of lignin peroxidase genes of *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Bacteriology*. 1999; 181: 3427-3432.
- Tien M, Tu C. Cloning and sequencing of a cDNA for ligninase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Nature* 1987; 326:520-523.
- Timell T. Recent progress in the chemistry of Wood hemicelluloses. *Wood Science and Technology*. 1967;1:45-70.
- Tuomela M, Vikman M, Hattaka A, Itävaara M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology* 2000; 72: 169-183.
- Tuor U, Winterhalter K, Fiechter A. Enzymes of White-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants of Wood decay. *Journal of Biotechnology*. 1995; 41:1-17.
- Van - Wik J. Biotechnology and the utilization of biowaste as a resource for bioproduct development, *Trends in Biotechnology*. 2001; 19 (5):172-177.
- Wilkie K. Hemicelluloses of grasses and cereals, *Advanced Carbohydrate Chemistry*. 1979; 36:215-264.
- Worrall J, Anagnost S, Zabel R. Comparison of Wood decay among diverse lignicolous fungi. *Mycologia*. 1997; 89: 199-219.
- Yaver D, Xu F, Golightly E, Brown K, Brown S, Rey M, Schneider P, Halkier T, Mondorf K, Dalboge H. Purification, characterization, molecular cloning and expression of two laccases genes from the White-rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996; 62: 834-841.