



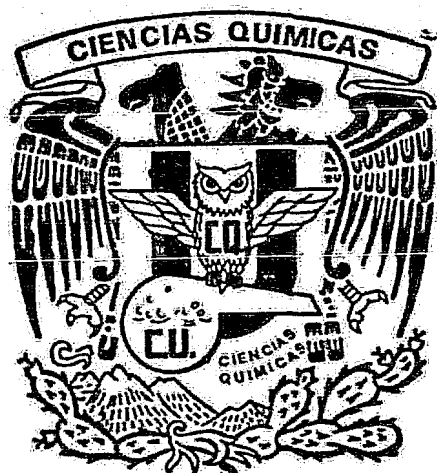
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**Facultad de Química**

**TRABAJO MONOGRAFICO**

**BIODEGRADACION DE LA LIGNINA**

**CORLAY CHEE LANGEN**



**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**1983**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## CONTENIDO

Indice de Cuadros	vÉ
Indice de Figuras	vii
<b>1. INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>2. GENERALIDADES SOBRE LIGNINA</b>	<b>2</b>
2.1 Definición de Lignina	2
2.2 Estructura	4
2.3 Distribución y Función	6
2.4 Clasificación	11
2.5 Propiedades Físicas de la Lignina	11
2.6 Importancia Ecológica e Industrial	12
<b>3. BIOSINTESIS DE LA LIGNINA</b>	<b>15</b>
3.1 A Nivel Celular	15
3.2 Formación y Polimerización de los Precursores	15
3.2.1 Formación de Precursores	15
3.2.2 Polimerización de los Precursores	17
3.3 Preparaciones de Lignina Útiles en Estudios Microbiológicos	19
3.3.1 Métodos que No Solubilizan Lignina	21
3.3.2 Métodos que Solubilizan Lignina	21
3.3.3 Otros Métodos	22
3.3.3.1 Lignina de Brauns	22
3.3.3.2 Ligninas Liberadas Enzimáticamente	23
3.3.3.3 Lignina Bjorkman	23
3.3.3.4 Ligninas Sintéticas	24
3.3.3.5 Compuestos Marcados Radioisotópicamente	24
3.3.3.5.1 DHP's marcados con $^{14}\text{C}$	24
3.3.3.5.2 Ligninas Naturales marcadas con $^{14}\text{C}$	25
3.3.3.5.3 MWL's marcadas con $^{14}\text{C}$	27
<b>4. BIODEGRADACION DE LIGNINA</b>	<b>28</b>
4.1 Métodos para Estudiar la Biodegradación de Lignina	28
4.1.1 Espectrofotométricos	28
4.1.2 Medio de Cultivo	29
4.1.3 Técnica del Bloque de Suelo	29

4.1.4 Observación Directa a Simple Vista . . . . .	30
4.1.5 Observación Directa por Métodos Microscópicos . . . . .	30
4.1.6 Métodos Radioactivos . . . . .	30
4.2 Microorganismos Lignolíticos . . . . .	31
4.2.1 Hongos de Pudrición Blanca . . . . .	32
4.2.2 Hongos de Pudrición Parda . . . . .	41
4.2.3 Hongos de Pudrición Blanda . . . . .	45
4.2.4 Otros Hongos . . . . .	48
4.2.5 Bacterias . . . . .	52
4.3 Enzimas que Intervienen en la Biodegradación de Lignina . . . . .	59
4.3.1 Enzimas Demetilantes . . . . .	59
4.3.2 Enzimas que Rompen Enlaces éter aril- $\beta$ -alquilo . . . . .	59
4.3.3 Fenoloxidasas . . . . .	59
4.3.4 Oxigenasas . . . . .	60
4.3.5 Celobiosa: quinona oxido reductasa . . . . .	60
5. APLICACIONES DE LA LIGNINA Y COMPUESTOS DERIVADOS . . . . .	64
5.1. Uso Directo . . . . .	64
5.1.1. Como Fuente de Energía . . . . .	64
5.1.2 Adición a Otros Productos . . . . .	64
5.1.3 Producción de Proteína Unicelular . . . . .	65
5.2 Uso de Ligninas Químicamente Modificadas . . . . .	65
5.2.1 Fabricación de Adhesivos y Resinas . . . . .	66
5.2.2 Como Antioxidante y Anticorrosivo . . . . .	66
5.2.3 Como Dispersante . . . . .	66
5.2.4 Como Quelatante . . . . .	67
5.3 Producción de Compuestos de Bajo Peso Molecular . . . . .	69
5.3.1 Indicadores Geoquímicos . . . . .	72
6. LITERATURA CITADA . . . . .	74

## INDICE DE CUADROS

CUADRO		PAGINA
1	<i>Composición química de algunas plantas superiores . . . . .</i>	9
2	<i>Especies representativas de Hongos de Pudrición Blanca . . . . .</i>	33
3	<i>Análisis elemental de ligninas con y sin pudrición blanca . . . . .</i>	35
4	<i>Algunos de los cambios que presenta la madera de abeto atacada por hongos de pudrición blanca, comparados con madera intacta . . . . .</i>	36
5	<i>Especies representativas de Hongos de Pudrición Parda . . . . .</i>	43
6	<i>Especies representativas de Hongos de Pudrición Blanda . . . . .</i>	46
7	<i>Especies representativas de otros hongos con capacidad lignolítica . . . . .</i>	49
8	<i>Especies representativas de Bacterias lignolíticas . . . . .</i>	54
9	<i>Liberación de <math>^{14}\text{CO}_2</math> por <u>Nocardia</u> sp. a partir de DHP's y lignina de rastrojo de maíz marcados con <math>^{14}\text{C}</math> con respecto al tiempo . . . . .</i>	55
10	<i>Procesos a través de los que se obtienen compuestos de bajo peso molecular a partir de lignina . . . . .</i>	68
11	<i>Aplicaciones de algunos compuestos derivados de vainilina . . . . .</i>	71

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA		PAGINA
1	Estructura química de los alcoholes precursores de la lignina . . . . .	3
2	Estructura de lignina de abeto propuesta por Adler et al. [1969] . . . . .	5
3	Estructura de lignina de softwood, modelo propuesto por Glasser y Glasser (1974) . . . . .	7
4	Mecanismo de Reacción de las reacciones colonizadas específicas que se emplean para determinar presencia y distribución de lignina en tejido vegetal . . . . .	10
5	Relación de las Lignocelulosas con el ciclo del carbono. . . . .	13
6	Vía metabólica de biosíntesis de lignina . . . . .	16
7	Metilación del ácido cafeico a ácido ferúlico y del ácido 5-hidroxiferúlico a ácido sinápico por la enzima <i>Catecol-O-metil Transferasa</i> . . . . .	18
8	Formación de Radicales fenoxilo por la enzima peroxidasa . . . . .	20
9	Estructura hipotética de una porción de lignina después de haber sido atacada por hongos de pudrición blanca . . . . .	38
10	Principales productos de degradación que se obtienen al incubar los sustratos indicados con <i>P. versicolor</i> y <i>F. fomentarius</i> . . . . .	39
11	Esquema de la biodegradación del éter guayacilglicerol- $\beta$ -coníferilo por hongos de pudrición blanca . . . . .	40
12	Ruta de degradación del alcohol dehidrodiconíferilo por <i>Fusarium solani</i> postulada por Higuchi [1981b] . . . . .	50
13	Ruta de degradación del éter guayacilglicerol- $\beta$ -coníferilo por <i>Fusarium solani</i> . . . . .	51
14	Esquema hipotético de la biodegradación de un compuesto modelo de lignina de 7 unidades por <i>Fusarium solani</i> . . . . .	53

FIGURA		PAGINA
15	<i>Metabolismo del ácido vanílico . . . . .</i>	57
16	<i>Vía metabólica de degradación del ácido protocatequínico por microorganismos . . . . .</i>	58
17	<i>Representación esquemática de las actividades de las en- zimas fenoloxidasas . . . . .</i>	61
18	<i>Actividades enzimáticas de las oxigenasas . . . . .</i>	62
19	<i>Estructuras químicas de vanilina y algunos de sus compues- tos derivados . . . . .</i>	70
20	<i>Estructuras químicas de algunos compuestos derivados de lignina . . . . .</i>	73

## 1. INTRODUCCION

Hasta hace pocos años se ha empezado a reconocer el valor de la lignina como elemento principal en la formación del humus del suelo y como posible producto de utilidad industrial para el futuro, ya que se trata de un recurso natural renovable.

La investigación sobre biodegradación de lignina se ha incrementado últimamente debido al interés por conocer el papel que desempeñan la lignina y sus productos de degradación en la humificación de la materia orgánica del suelo, las diferentes conversiones que sufre al ser degradada, la identificación de los microorganismos que intervienen, así como la fisiología del catalismo de la misma por tales microorganismos.

También se ha intentado dilucidar las vías metabólicas por las que este biopolímero aromático complejo es descompuesto en fragmentos más pequeños, formando a veces  $\text{CO}_2$  y agua.

No obstante, el mecanismo de la biodegradación aún no está completamente establecido solo se sabe con certeza que ciertos hongos la degradan y las rutas metabólicas de degradación no están perfectamente explicadas. Las causas por las que existe esta carencia de información básica son numerosas siendo la principal el hecho de que su estructura química sólo ha sido recientemente bien establecida (después de 140 años de estudio), debido a la complejidad de la misma, indica Higuchi (1981a).

Los análisis realizados para cuantificar la degradación de lignina han sido poco confiables debido a las interferencias que causan otros materiales biológicos y por tanto sujetos a malinterpretación de los datos obtenidos.

Como resultado del establecimiento de su estructura química se han desarrollado numerosos métodos más confiables para el estudio de su biodegradación; se ha ampliado el conocimiento del número de microorganismos capaces de degradarla, como bacterias y hongos que antes no se consideraban como tales y se empiezan a dilucidar las vías por las que se produce enzimáticamente la biodegradación.

Menciona Crawford (1981) que en los últimos años, se han publicado gran cantidad de reportes sobre biodegradación de lignina; pero en forma aislada, de tal manera que considera de importancia hacer una recopilación de los últimos avances que se han publicado, para que en un solo trabajo se encuentre todo lo relacionado (principalmente información metodológica) que sirva para orientar a las personas interesadas y que en las investigaciones futuras exista continuidad.



## 2. GENERALIDADES SOBRE LIGNINA

### 2.1 Definición de Lignina

Considerando que tiene cierta relevancia la forma como fué evolucionando la definición de lignina, a continuación enlisto cronológicamente las definiciones más representativas:

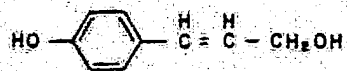
De acuerdo a Brauns (1952) la lignina ha sido definida como "ese material incrustante de las plantas que está constituido principalmente, si no completamente, de monómeros fenilpropano, lleva la proporción del contenido metoxilo de la madera, es rápidamente oxidable, soluble en álcali caliente y bisulfito, no es hidrolizable por ácidos y se condensa rápidamente con fenoles y tio-compuestos".

En base a la morfología de la lignina, Freudenberg (1955) la define como una sustancia que penetra los polisacáridos de la membrana y los espacios intercelulares, reforzándolos (algo semejante al cemento en el concreto reforzado).

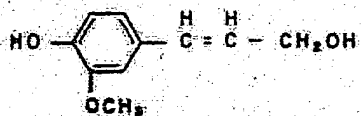
El término lignina no puede ser usado para designar a un compuesto químicamente definido; pero sí es un término que se otorga a un grupo de compuestos amorfos, muy relacionados químicamente entre sí, según Schubert y Nord (1957).

Freudenberg (1965) considera que el criterio para designar a una sustancia como lignina debe estar basado en un análisis químico y que, químicamente la lignina es un co-policondensado de los productos de deshidrogenación - obtenidos de los alcoholes p-cumarilo, coniferilo y sinapilo. Cuyas estructuras químicas podemos observar en la figura 1.

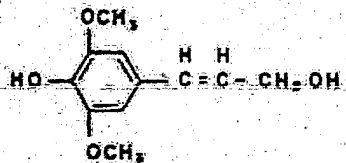
Pearl (1967) indica que la definición de lignina varía de acuerdo a lo que cada investigador considere más adecuado, por ejemplo: para un botánico, es un metabolito del crecimiento de las plantas, o bien un elemento estructural que contribuye a darles rigidez u que puede ser localizado a través de reacciones coloridas específicas (ver distribución); para el fabricante de pulpa y papel es el ingrediente que le ocasiona la mayoría de los problemas en el proceso de producción de pulpa. Para un microbiólogo es un residuo de la descomposición vegetal, mientras que para enzimólogos y bioquímicos vegetales es un producto final de la deshidrogenación enzimática de monómeros de fenilpropano. Añade que la lignina no es un compuesto constitucionalmente definido, pero que sí es un "polímero de cadena larga, probablemente ramificada, el cual -como la celulosa- varía en longitud de cadena y tamaño molecular".



alcohol p-cumarilo



alcohol coniferilo



alcohol siringilo

Figura 1. Estructura química de los alcoholes precursores de la lignina, tomado de Freudenberg (1965).

De acuerdo a Sarkanen y Ludvig (1971) es un producto natural polimérico, proveniente de una polimerización enzimática deshidrogenativa de los tres precursores primarios: alcohol trans p-cumarilo, alcohol trans coníferilo y alcohol trans sinapilo.

De acuerdo a Higuchi (1981a) es un polímero aromático cuya función es cementar los componentes polisacáridos de la pared celular, física y químicamente, y por tanto, incrementar en la madera su resistencia mecánica y su resistencia a la degradación por microorganismos.

## 2.2 Estructura

Harris y col. (1938) demostraron por hidrogenación catalítica (hidrogenólisis) de lignina aislada, que es un polímero de fenilpropano. Además, estudios realizados con hidrólisis alcalina, etanolólisis, ruptura con sodio y amoníaco líquido, etc. han liberado como productos finales a unidades fenilpropano (Brauns y Brauns, 1960; Hurst y Burges, 1967).

No se ha podido determinar la estructura química exacta de la lignina, -según Brown (1961, 1966), Glanville y McCarthy (1974), Kirk et al. (1977), debido a tres factores:

a) La lignina es difícil de aislar y purificar sin que se altere su estructura, ya que utilizando diferentes métodos de aislamiento se han obtenido preparaciones de lignina -partiendo del mismo material- con propiedades considerablemente diferentes, de tal manera que los investigadores no pueden afirmar que estén trabajando con lignina o algún artificial (ver distribución).

b) La molécula de lignina no es homogénea, debido a que todos sus monómeros no son idénticos, ni están unidos entre sí de la misma forma. Si se consideran sólo polímeros simples, existen tres tipos de lignina (ver clasificación); pero si aceptamos la existencia de polímeros mixtos formados por más -de uno de los tres monómeros conocidos, el número potencial de ligninas puede ser enorme.

c) La lignina es un polímero que no puede ser convertido a sus monómeros sin que se alteren sus unidades estructurales. A pesar de la gran variedad de procedimientos degradativos efectuados no ha sido posible recuperar cuantitativamente productos de reacción purificados, debido a que la mayoría de éstos no soportan purificaciones sucesivas.

Investigaciones realizadas sobre la polimerización de los principales -- productos de degradación de la lignina, han dado origen a la postulación de --

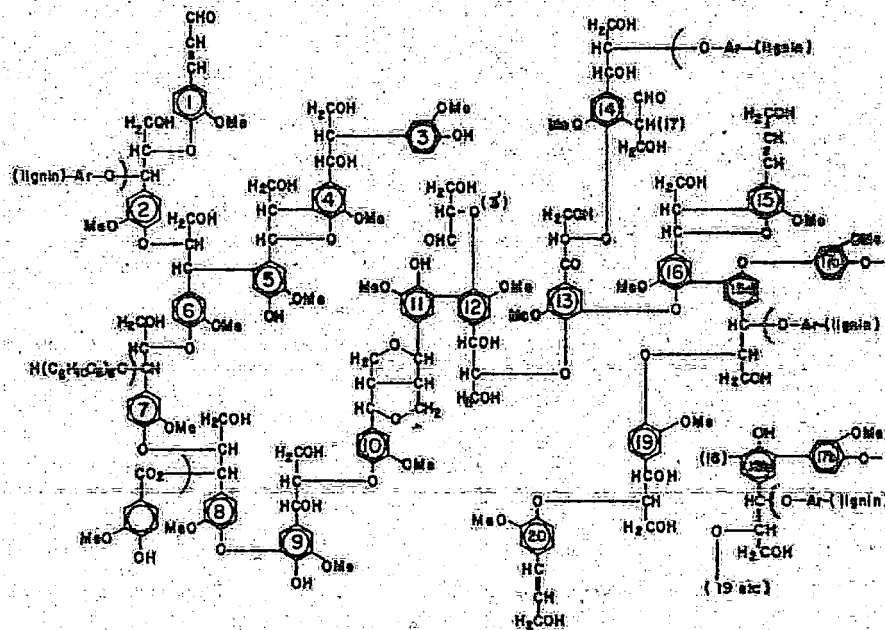


Figura 2. Estructura de lignina de obato, propuesta por Adler et al (1969), tomada de Higuchi (1981a).

modelos experimentales acerca de su configuración estructural (figura 2). Un gran número de modelos han sido propuestos y están basados en la teoría de polimerización deshidrogenativa (ver biosíntesis) de los alcoholes p-hidroxici-namilos, según Freudenberg y Neish (1965), Sarhanen y Ludwig (1971) y Adler - (1977).

La estructura más grande es un modelo basado en 81 unidades fenilpropano con peso molecular alrededor de 15,000 (ver figura 3). Este modelo fue desa-rrollado por simulación computarizada por Glasser y Glasser (1974), citados - por Glasser (1980). Aunque después de su publicación han sido sugeridos cam-bios y revisiones para explicar diversos fenómenos analíticos (Glasser, 1980)

En el diseño de una estructura configuracional para lignina, este mismo autor indica que a falta de una configuración cristalina altamente regular, - un modelo estructural debe ser contruido en base a:

a) Los mecanismos de polimerización probados y/o aceptados.

b) Todas las observaciones experimentales hechas sobre la lignina, duran-te su aislamiento, análisis y reacciones.

Sakakibara (1977) considera que estas fórmulas son temporales y deben es-tar siendo modificadas conforme se disponga de mayor información. Aunque la - estructura química de la lignina nunca sea tan claramente definida como un mo-deló estadístico proveniente de la información que se tenga sobre los tipos - de enlaces presentes entre las unidades fenilpropano.

### 2.3 Distribución y Función

Se cree que en las plantas leñosas, la lignina está químicamente combina-da con las moléculas de carbohidratos presentes en las mismas, aunque también existen evidencias de que está en forma no combinada, como una mezcla mecáni-ca (Brauns, 1952; Harris, 1953).

La lignina se localiza con la celulosa y hemicelulosa como componente in-tegral de los tejidos vegetales leñosos. Freudenberg (1965) y Glasser (1980) indican que alrededor de la cuarta parte de madera seca es lignina, en parte depositada en las paredes celulares del xilema y en parte localizada en los - espacios intercelulares o lamella media, donde puede constituir más del 70% - de los sólidos presentes. Una gran proporción de la lignina, quizá toda, está en combinación química con polisacáridos vegetales.

Va que la lignina existe en las plantas en asociación íntima con los po-lisacáridos estructurales, solamente puede ser separada por métodos severos - de extracción, por lo que Brauns y Brauns (1960) postulan que invariablemente

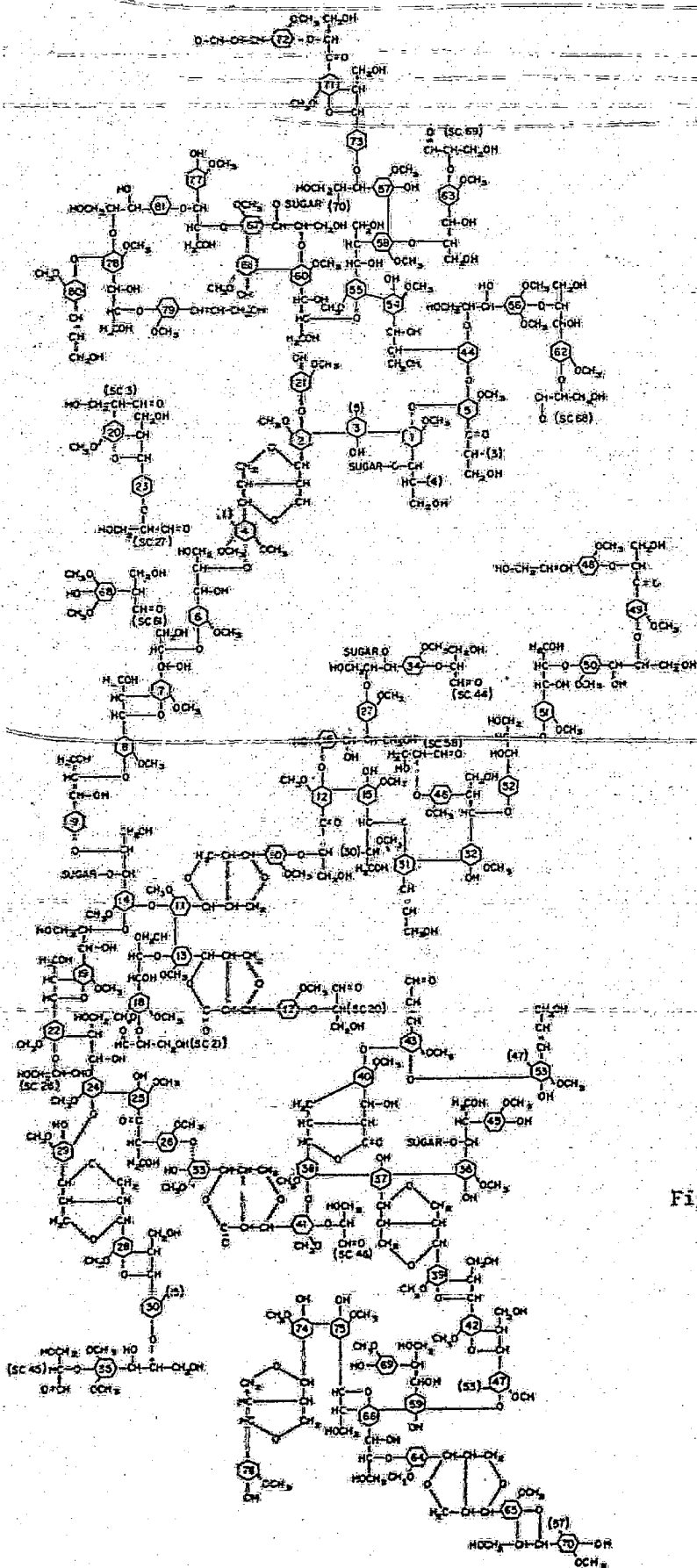


Figura 3. Estructura de lignina de softwood, modelo propuesto por Glasser y Glasser (1974) cit por Glasser (1980).

se alterará la estructura química de la lignina.

Bellamy (1974), Hess (1975), Ander y Eriksson (1978) opinan que de acuerdo a su abundancia, la lignina es la segunda sustancia más importante, después de la celulosa. Pero a diferencia de esta, que es sintetizada por todas las plantas, la formación de lignina es esencialmente única en plantas vasculares (plantas que desarrollan tejidos especializados en el transporte de soluciones acuosas y el soporte mecánico). Erickson y Miksche (1974), Miksche y Yasuda (1978) y Glasser (1980) reportan que las plantas primitivas, sin tejidos celulares diferenciados, como hongos, algas y musgos, no contienen lignina evidentemente porque su aglomeración celular no requiere de las características de protección y soporte que proporciona la lignina. El cuadro 1 resume la composición química de algunas plantas superiores representativas.

Además de evitar que los elementos vasculares se colapsen por reforzamiento mecánico de sus paredes celulares, la lignina es un importante agente de reforzamiento mecánico para todo el árbol. Glasser (1980) indica que la lignina es un componente estructural que proporciona a la madera, sus propiedades únicas de elasticidad y resistencia. Además de sus funciones reconocidas como sellante y agente de reforzamiento estructural, la lignina ha sido también descrita por Neish (1961) y Wardrop (1976) como un mecanismo regulador de los desechos metabólicos.

La presencia y distribución de la lignina en tejido vegetal puede ser observada fácilmente por reacciones coloridas específicas (figura 4), indica Higuachi (1971, 1981a), las cuales son:

- Reacción con Floroglucinol y ácido clorhídrico diluido
- Reacción de Maule
- Reacción de Cross y Beavan

En la primera reacción las ligninas comúnmente dan un color rojo púrpura que se atribuye a los grupos p-hidroxicinamaldehído presentes en las ligninas al hacer reaccionar los tejidos vegetales con una mezcla de floroglucinol y ácido clorhídrico diluido.

En la reacción de Maule, el tejido vegetal es tratado sucesivamente con permanganato diluido, ácido clorhídrico y amoníaco; mientras que en la reacción de Cross y Beavan, el tejido vegetal es clorinado y después se le agrega solución de sulfito de sodio. Estas dos últimas reacciones sirven para diferenciar lignina de angiospermas de la de gimnospermas, ya que en ambas reacciones, las primeras producen un color rojo-rosáceo y las segundas un color par-

Cuadro 1. Composición química de algunas plantas superiores

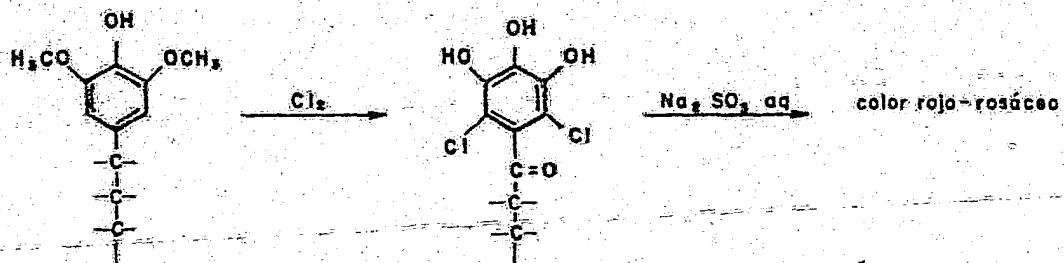
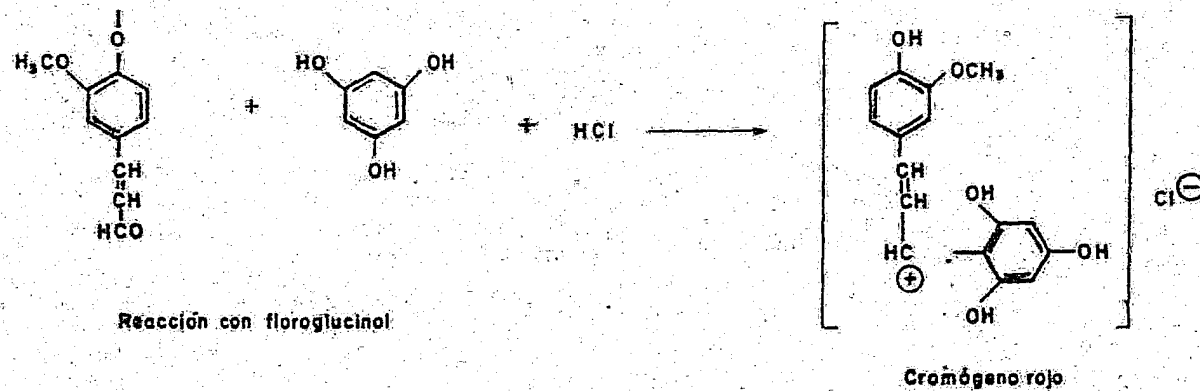
Planta	Holocelulosa <sup>1</sup> % en peso seco	Lignina <sup>2</sup>	Otros <sup>3</sup>	Referencia
Abedul ( <i>Betulla alleghaniensis</i> )	77.6	19.3	3.1	Cowling y Kirk (1976)
Abeto americano ( <i>Tsuga canadensis</i> )	64.0	33.0	3.0	Kirk (1973)
Abeto rojo ( <i>Picea excelsa</i> )	70.7	26.3	3.0	Cowling y Kirk (1973)
Alamo ( <i>Populus balsamifera</i> )	66.7	22.3	11.0	Eslyn et al. (1975)
Aliso rojo ( <i>Alnus rubra</i> )	63.1	25.4	11.5	Eslyn et al. (1975)
Haya ( <i>Fagus grandifolia</i> )	72.0	22.0	6.0	Kirk (1973)
Muérdago ( <i>Viscum album</i> )	—	22.0	—	Kuroda y Higuchi (1976)
Olmo ( <i>Ulmus americana</i> )	74.0	24.0	2.0	Kirk (1973)
Pino ( <i>Pinus strobus</i> )	68.0	29.0	3.0	Kirk (1973)

1 = celulosa y hemicelulosa

2 = lignina determinada por el método Klason (ver preparaciones)

3 = ceniza + proteína + compuestos solubles en agua, acetona, etanol y benceno.





Reacción de Cross y Beavan.

Figura 4. Mecanismos de reacción de las reacciones coloridas específicas que se emplean para determinar presencia y distribución de lignina en tejido vegetal. Tomado de Higuchi (19810).

do. El mecanismo principal de ambas reacciones es semejante, se ha atribuido a la presencia de monómeros *siringilo* en la lignina de angiospermas (ver clasificación).

#### 2.4 Clasificación

De acuerdo a Pearl (1967) las ligninas vegetales de interés pueden ser divididas en tres grandes clases:

- a) Ligninas de maderas blandas o coníferas (gimnospermas)
  - b) Ligninas de maderas duras (angiospermas dicotiledóneas)
  - c) Ligninas de pastos o plantas anuales (angiospermas monocotiledóneas)
- también incluyen a plantas como bambú y palma.

De estas clases, las ligninas de coníferas son consideradas por Freudenberg (1955) como derivados del alcohol coníferilo o su monómero similar, el guayacilpropano o 4-hidroxí-3-metoxifenil propano.

Pearl (1967) indica que debe hacerse hincapié en que las ligninas de madera dura difieren del prototipo de la lignina de abeto en que además de los polímeros de guayacilpropano antes mencionados, contienen polímeros de 3,5--dimetoxi-4-hidroxifenil propano.

Y que las ligninas de angiospermas monocotiledóneas contienen además de los dos anteriores, polímeros de 4-hidroxifenil propano.

#### 2.5 Propiedades Físicas de la Lignina

Debido a que Brauns y Brauns (1960) consideran que "en la evaluación de los resultados obtenidos en pruebas físicas realizadas a preparaciones de lignina, debe considerarse que es un polímero constituido por unidades estructurales que varían con la especie vegetal de que procede y que pueden ser combinadas en diferentes formas; siendo por tanto susceptible a cualquier reactivo químico suave, durante el proceso de aislamiento puede sufrir cambios estructurales que alteren sus propiedades físicas. Aunado al actual desconocimiento de su estructura, nos conduce a concluir que no debe ponerse mucho énfasis en las mismas", y a que las propiedades físicas de preparaciones de lignina varían notablemente dependiendo del método usado para aislarlas y de la fracción de lignina total que representen indican Glennie y McCarthy (1974), solamente señalaremos que se han publicado muchos reportes respecto a las propiedades físicas de ligninas pero que datos verdaderos y definitivos son escasos debido a que las ligninas estaban incompletamente purificadas o a que no representaban a la lignina total, o ambas razones, y -

que los datos existentes se resumen en Brauns y Brauns (1960).

### 2.6 Importancia Ecológica e Industrial

La importancia ecológica de la lignina reside en que forma parte del ciclo del carbono, esquematizado en la figura 5, ya que las plantas superiores al formar parte del mismo y sintetizar grandes cantidades de macromoléculas aromáticas insolubles, tales como taninos y ligninas, indica Evans (1977), - hacen que las ligninas intervengan de alguna manera en el ciclo del carbono, algunas razones que apoyan esto son:

1) Como su biodegradación se produce muy lentamente, es posible que la lignina sea el paso que limita la velocidad del ciclo del carbono, se requieren de varios miles de años para que los polímeros aromáticos sean convertidos en sustancias húmicas del suelo, según Crawford (1981).

2) Como se encuentra en asociación íntima con los polisacáridos vegetales (Freudenberg, 1955; Sarhanen y Ludwig, 1971), denominándosele material lignocelulósico, representa un obstáculo para la remoción y utilización de los carbohidratos presentes. Kirk et al. (1977) indican que la mayoría de los microorganismos que pueden degradar polisacáridos aislados de madera, no pueden atacar tejidos lignificados, a menos que sean lignolíticos. Otra forma por la cual los materiales lignocelulósicos pueden volverse susceptibles al ataque microbiano de microorganismos no lignolíticos, es venciendo el obstáculo que representa la lignina por medios físicos, v.gr. moliendo finamente el material lignocelulósico, o por medios químicos, v.gr. pre-tratamiento con hidróxido de sodio.

Estas razones hacen más relevante la importancia de la lignina, debido a que es un componente del ciclo del carbono que regula la velocidad de descomposición de los carbohidratos vegetales más abundantes (disminuyéndola). Además el proceso de lignificación es un mecanismo de resistencia de las plantas contra enfermedades, según Vance et al. (1980).

Las industrias existentes, que utilizan materiales lignocelulósicos, como la industria agrícola, la industria maderera y la manufacturera de papel, producen directa o indirectamente grandes cantidades de desechos lignocelulósicos que comúnmente no son utilizados y que representan un desperdicio de recursos naturales. De acuerdo al Manual de Conservación de Suelos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (1974), Los desechos agrícolas son útiles en el control de la erosión del suelo y en el reabastecimiento de nutrientes del mismo.

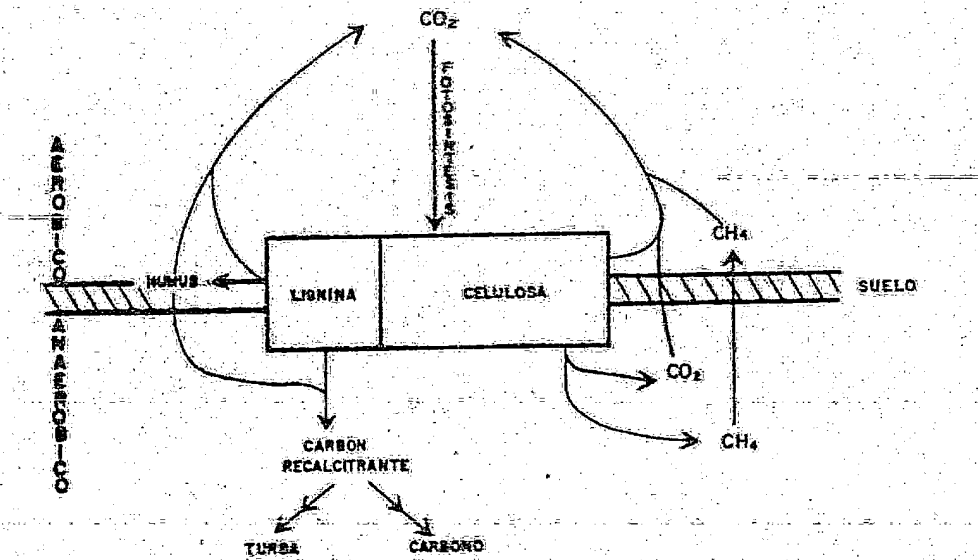


Figura 5. Relación de las lignocelulosas con el ciclo de carbono, tomado de Zeikus (1981).

Al no ser reciclados estos desperdicios lignocelulósicos son acumulados en los ríos creando un riesgo de contaminación, reportan Markin (1969) y Dolenko y Clark (1978).

Aún cuando la lignina es un obstáculo para la biodegradación de los materiales lignocelulósicos, existen investigaciones que auguran el uso potencial de los desechos lignocelulósicos, v.gr. conversión microbiana de ligninas industriales a ácidos orgánicos (Scott et al., 1930; Hajny et al., 1951), a glucosa (Mandels et al., 1971), a alcoholes o proteína unicelular (Bellamy, 1974; Stuntzenberg, 1979; Rosenberg y Wilke, 1981), a polifenoles (Goldstein, 1975a), a metano (Hashimoto et al., 1979; Robbins et al., 1979); al designificar residuos de plantas superiores, éstos podrían ser más fácilmente digeridos por los rumiantes (Church, 1974; Mc Donald et al., 1979); o simplemente acumularla en un lugar apropiado donde no sea un contaminante en potencia (Wani y Shinde, 1977; Schweers y Vorher, 1977).

### 3. BIOSÍNTESIS DE LA LIGNINA

#### 3.1 A Nivel Celular

Glasser (1980) menciona que durante muchos años, la hipótesis de Freudenberg explicó las observaciones experimentales que se tenían acerca de la biosíntesis de lignina. Esta hipótesis, está fundamentada en evidencias químicas y citológicas e indica que la lignificación se inicia con la formación de los precursores de lignina en la región del cambium. Estos precursores estando en su forma glucosídica o sea enlazados covalentemente con glucosa y siendo por tanto hidrosolubles, difunden centripetamente a través de varias capas celulares del xilema diferenciante. Posteriormente, por medio de enzimas hidrolíticas (beta-glucosidasas) localizadas en la pared celular, los precursores se separan de la glucosa con que estaban unidos y ya liberados se polimerizan catalizados por enzimas del tipo de las peroxidadas, dando origen a la lignina.

Sin embargo, en estudios posteriores se encuentra que esta hipótesis no explica totalmente el proceso de biosíntesis (Ruberly y Northcote, 1968; Gross 1977). Así Wardrop (1976) propone otra hipótesis en la que considera que la biosíntesis es un proceso intracelular, ya que encuentra indicios de que la beta-glucosidasa se acumula principalmente en citoplasma celular y que por tanto, la polimerización y oxidación de los precursores debe ser intracelular.

Glasser (1980) considera que esta hipótesis es cuestionable porque es contraria a las evidencias que indican que la lignificación se inicia en la lamella media y en las esquinas celulares.

#### 3.2 Formación y Polimerización de los Precursores

Han sido realizadas excelentes revisiones sobre la formación de los precursores, su polimerización y mecanismos enzimáticos, por Freudenberg y Neish (1968), Higuchi (1971), Gross (1977), Higuchi et al. (1977), Hanson y Havir (1979) y Gross (1979) entre otros. En forma breve el proceso se esquematiza en la figura 6.

##### 3.2.1 Formación de Precursores

Los precursores de la lignina son sintetizados por las plantas a partir de dióxido de carbono por la vía del ácido shikémico, el cual es un importante intermediario en la biosíntesis de los aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptofano según Rodwell (1978) y Floss (1979), además de serlo en la biosíntesis de vitamina K (Young, 1975), de antibióticos como Rifamicina, Nitomi

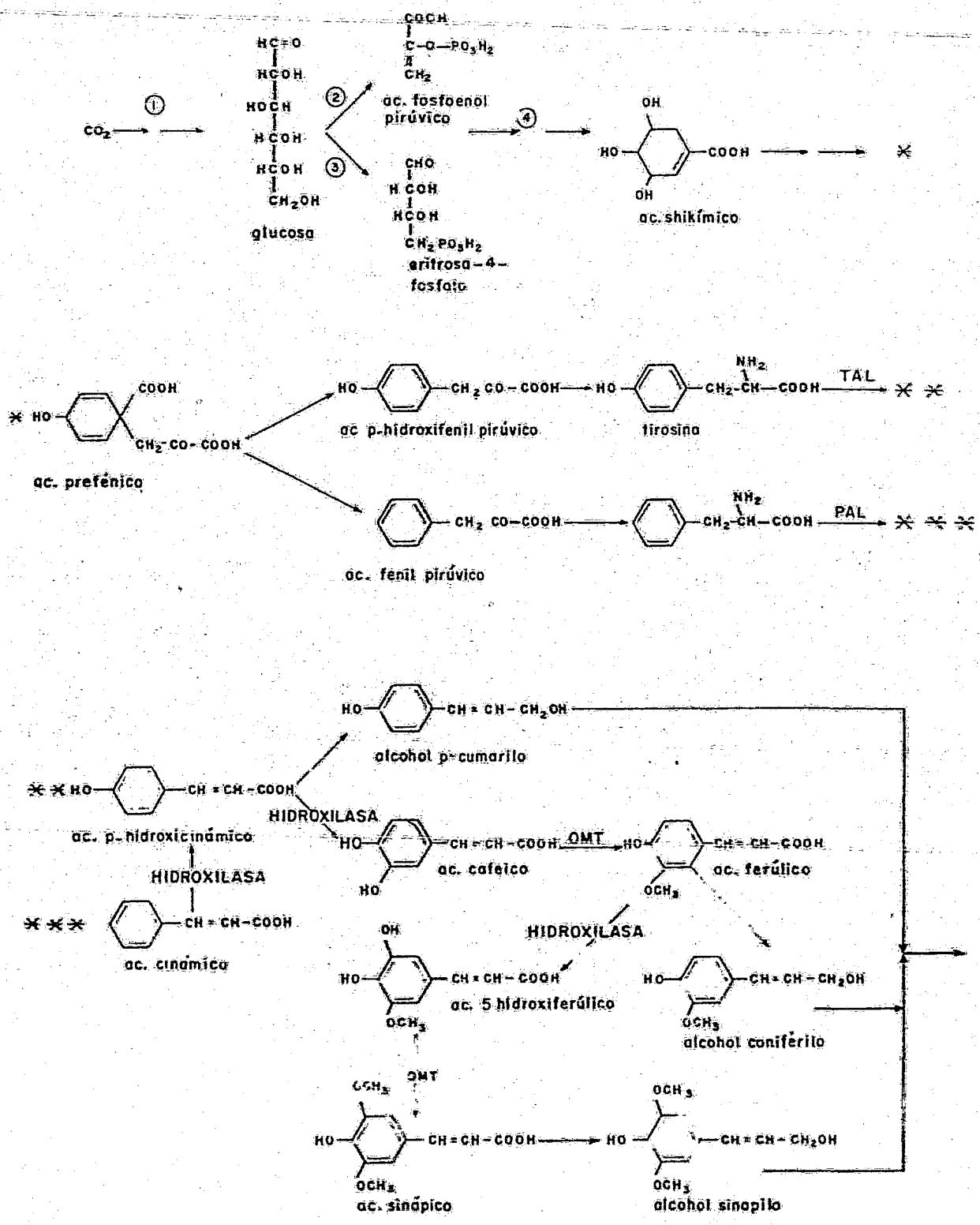


Figura 6. Vía metabólica de biosíntesis de lignina a partir de  $\text{CO}_2$  modificada de Higuchi (1981), donde 1= FOTOSÍNTESIS, 2 = VIA EMBDEN-MEYERHOF, 3= VIA PENTOSAS-FOSFATO, 4=AROMATIZACIÓN, PAL = Fenilalanina amoniaco ilasa, TAL = Tirosin amoniaco ilasa, OMT = Orto metil transferasa.

cina y Cloramfenicol entre otros, y en la formación del ácido p-hidroxibenzoico, el cual es un componente del ácido fólico (Floss, 1979).

Yoshida y Towers (1963) citados por Higuchi (1971) obtienen evidencias de que el ácido shikónico es formado por la condensación del ácido fosfoenol pirúvico y de D-eritrosa-4-fosfato, derivados de la vía de Embden-Meyerhoff y de la vía de la pentosa-fosfato, respectivamente.

Como se menciona con anterioridad, el ácido shikónico da origen a los aminoácidos tirosina y fenilalanina, siendo demostrado por Neish (1961) que el aminoácido tirosina puede ser convertido a ácido cumárico y amoníaco por la enzima denominada Tirosin amonía liasa (TAL). También el aminoácido fenilalanina es desaminado y convertido a ácido cinámico por la enzima Fenilalanina amonía liasa (PAL) según trabajos realizados por Koukol y Conn (1961). Más información sobre el mecanismo anterior puede ser encontrado en Hanson y Havir (1972), Camm y Towers (1973) y Hanson y Havir (1979).

De acuerdo a Higuchi (1971, 1981a) y Gross (1977) el ácido cinámico formado es hidroxilado sucesivamente a los ácidos p-cumárico y cafeico a través de hidroxilasas específicas, la conversión de ácido cafeico a ácido ferúlico es catalizada por orto metil transferasas (OMT) como se muestra en la figura 7.

Hipotéticamente, Gross (1977) reporta que el ácido ferúlico formado es entonces convertido por una hidroxilasa específica a ácido 5-hidroxi ferúlico ya que Higuchi (1981a) reporta que este compuesto no se ha encontrado como tal en la naturaleza.

Al ser el ácido 5-hidroxi ferúlico metilado por orto metil transferasas, se origina el ácido sinápico, como se muestra en la figura 7.

Los ácidos ferúlico y sinápico formados son posteriormente reducidos a los alcoholes coniferilo y sinapilo respectivamente a través de la actividad sucesiva enzimática de 3 enzimas: Coenzima A ligasa (Co A ligasa), Hidroxicinamil Co A reductasa e Hidroxicinamil alcohol oxido reductasa también llamada Cinamil alcohol deshidrogenasa, de acuerdo a Mansell et al. (1972) citados por Zenk (1979); Ebel y Grisebach (1973) citados por Higuchi (1981a) y Gross (1977, 1979).

### 3.2.2 Polimerización de los Precursores

De acuerdo a Gross (1977, 1979) el paso final de la biosíntesis de lignina es la polimerización de los alcoholes p-cumarilo, coniferilo y sinapilo, y es iniciada al ser oxidados los mencionados alcoholes por una peroxidasa. Han



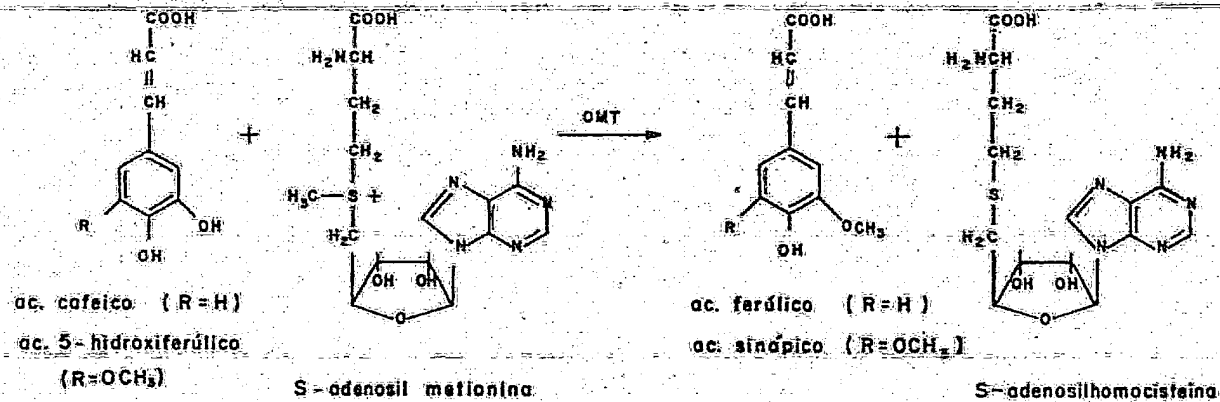


Figura 7. Metilación del ácido cafeico a ácido ferúlico y del ácido 5-hidroxisinápico a ácido sinápico por la enzima Catecol-O-metil Transferasa (OMT). Tomado de Gross (1977).

kin y Obst [1973] comprobaron lo antes dicho, al determinar que la actividad de la peroxidasa da origen a la formación de radicales libres fenoxilo, como se observa en la figura 8.

Los radicales formados, denominados Lignoles por Freudenberg [1965], se dimerizan al azar según Higuchi [1981a] formando dilignoles; por cálculos teóricos, los radicales que predominantemente se dimerizan son Ra, Rb y Rd de la figura 8 (Higuchi, 1971; Gross, 1977).

Finalmente los dilignoles, a través de reacciones de deshidrogenación y polimerización dan origen a la molécula de Lignina, por medio de intermediarios oligoméricos o sea tri- y oligo-lignoles (Higuchi, 1971).

### 3.3 Preparaciones de Lignina Útiles en Estudios Microbiológicos

Brauns [1952] recomienda preparar el material vegetal antes de proceder a efectuar cualquier método de aislamiento de lignina, eliminando previamente los nudos, corteza y conductos resinosos de la madera; y de las plantas anuales como pajas, bagazos, etc., solamente los nudos. Añade que debe desmenuzarse y molerse lo más finamente posible, porque cuanto más fino esté molido el material, será más efectiva la extracción y la acción de los reactivos será más uniforme.

Brauns [1952] y Brauns y Brauns [1960] consideran de gran importancia el eliminar sustancias asociadas a la lignina, como lípidos, resinas, pigmentos, etc., por medio de extracciones con diversos solventes como éter, acetona, alcohol, benceno, dioxano, o bien mezclas de éstos; ya que pueden causar reacciones indeseables que interfieran en el aislamiento de la lignina. Una vez que al material se le han extraído las sustancias solubles en solventes orgánicos, éstos deben ser completamente eliminados para evitar que se condensen con la lignina en el proceso de aislamiento con la consecuente alteración de la estructura de la lignina. Posteriormente se le hace otra extracción opcional al material, esta vez para eliminar sustancias hidrosolubles como taninos, azúcares, ácidos orgánicos, etc.

Se han reportado gran cantidad de métodos para aislar la lignina, pero no en todos se obtiene lignina con utilidad microbiológica, por lo que sólo serán mencionados someramente y se profundizará en aquellas que sí sean de uso microbiológico. Pearl [1967] considera que los diversos métodos reportados pueden ser clasificados en:

a) Los que solubilizan a los componentes asociados con la lignina, pero no a ésta, dejándola como un precipitado insoluble, y

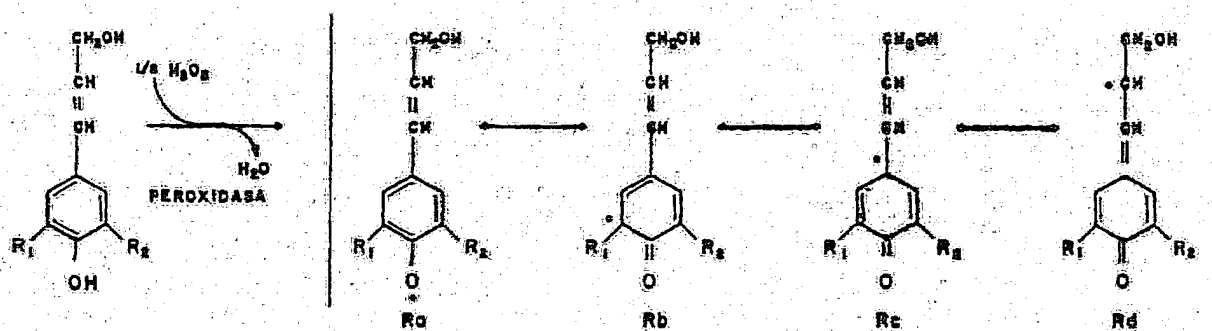


Figura 8. Formación de radicales fenoxilo (monolignoles) por la enzima peroxidasa. Tomado de Gross (1977).

Donde:

$R_1 = R_2 = H$  corresponde a alcohol p-cumarilo.

$R_1 = OCH_3$ ,  $R_2 = H$  corresponde a alcohol coniferilo.

$R_1 = R_2 = OCH_3$  corresponde a alcohol sinapilo.

b) Los que selectivamente solubilizan a la lignina

### 3.3.1 Métodos que No Solubilizan Lignina

Este tipo de procedimientos se fundamenta en la extracción de celulosa y sustancias similares por medio de hidrólisis (para convertirlas en azúcares) o por solubilización selectiva en hidróxido de Cupro-amonio. Pearl [1967] agrega que se obtienen Ligninas ácidas, siendo las principales:

Lignina al ácido clorhídrico o Lignina Willstater

Lignina al ácido sulfúrico o Lignina de Klason

Lignina al peryodato o Lignina Purves

Lignina Cuproxam o Lignina Freudenberg

### 3.3.2 Métodos que Solubilizan Lignina

El fundamento de estos procedimientos reside en la solubilización selectiva de la lignina, obteniéndose una solución a partir de la cual, la lignina puede ser precipitada. Pearl (1967) los subdivide en: métodos que emplean reactivos inorgánicos y métodos que emplean reactivos orgánicos.

#### 3.3.2.1 Métodos que emplean Reactivos Orgánicos

Emplean solventes como alcoholes, polioles, aldehidos, cetonas, dioxano, fenoles, tio-compuestos, ácidos orgánicos, etc., comúnmente en presencia de un catalizador, por tanto según Pearl (1967) se les denomina Lignina de organosolventes, entre ellas están: Ligninas al alcohol (metanol, etanol, etc.), Lignina al dioxano, al fenol, etc.

#### 3.3.2.2 Métodos que emplean Reactivos Inorgánicos

Estos procedimientos son los que se utilizan en la industria manufacturera de pulpa y papel, en los que la lignina es obtenida en grandes cantidades como subproducto de desecho. A las ligninas aisladas por estos métodos se les denomina Ligninas industriales. Los procesos a nivel mundial que predominantemente son usados, son el Proceso Kraft y el Proceso al Sulfito, que producen Lignina Kraft y Lignosulfonatos, respectivamente según Crawford [1981], en cantidades tan grandes que resulta interesante investigar la biodegradación de las Ligninas industriales por ser contaminantes en potencia.

Pearl (1967) menciona que las Ligninas obtenidas por estos procedimientos son siempre heterogéneas debido a que se utilizan mezclas de maderas y al proceso en sí.

Lundquist y Kirk (1980) indican que en los estudios realizados con lig-

ninas industriales por lo general se han usado preparaciones sin purificar o con mínima purificación, siendo común que contengan materiales derivados de sustancias diferentes de lignina y productos de degradación de lignina de bajo peso molecular, siendo por tal motivo difícil de interpretar los datos experimentales obtenidos. Obviamente, este tipo de preparaciones no puede ser utilizada para investigaciones fundamentales, porque sería erróneo extrapolar las conclusiones obtenidas sobre biodegradación de ligninas industriales al proceso de biodegradación de ligninas naturales. Lundquist y Kirk (1980) describen un procedimiento sencillo para eliminar contaminantes de preparaciones industriales de Lignina Kraft.

De acuerdo a Herrick y Hergert (1977), la separación de lignina de la madera por el proceso al sulfito está basada en la sulfonación de la lignina junto con hidrólisis parcial y despolimerización, de los que se obtiene una mezcla de lignosulfonatos hidrosolubles y azúcares resultantes de la hidrólisis de hemicelulosa. Mientras que en el proceso Kraft, la lignina es totalmente despolimerizada o degradada por hidrólisis alcalina y oxidación, siendo hidrosoluble sólo bajo esas condiciones fuertemente alcalinas, las cuales también convertirían las hemicelulosas a derivados de ácidos sacarínicos. Estos últimos son producidos por el proceso llamado "peeling" en el que los azúcares formados son fragmentados y rearrreglados.

Las ligninas al ser aisladas por los métodos antes mencionados, lamentablemente son sometidas a condiciones drásticas, motivos por los que Pearl (1967) considera que no conservarán su estructura original y pueden ser consideradas de valor dudoso para trabajos microbiológicos según Crawford (1981), aunque Egfland (1977) considera que el método Klason es una buena técnica para cuantificar el contenido de lignina a grosso modo y de uso frecuente.

### 3.3.3 Otros Métodos

Existen otros procedimientos que no pueden ser clasificados dentro de la selección anterior, porque las ligninas aisladas por estos métodos presentan diferentes características, las ligninas que se obtienen son: Lignina de Brauns, Ligninas liberadas enzimáticamente, Lignina Bjorkman, Ligninas sintéticas y compuestos marcados radioisotópicamente. Rápidamente analizaremos estas preparaciones:

#### 3.3.3.1 Lignina de Brauns

La lignina de Brauns es un polvo color crema que se obtiene al extraer madera molida u otro tejido lignificado, con etanol a temperatura ambiente, y posterior purificación de los extractos etanólicos por medio de una serie de solubilizaciones y precipitaciones en diversos solventes, según Brauns (1939). Pearl (1967) considera que sólo se aísla un bajo porcentaje de la lignina total por este procedimiento, mientras que Kirk (1971) y Crawford (1981) consideran que puede ser útil para algunos estudios microbiológicos, como lo respaldan los trabajos realizados por Day et al. (1949), Gottlieb et al. (1950), Pelczar et al. (1950) e Ishikawa et al. (1963a, 1963b), entre otros.

### 3.3.3.2 Ligninas Liberadas Enzimáticamente

Existen dos maneras de obtener ligninas liberadas enzimáticamente, las cuales son:

a) Por degradación del material lignocelulósico mediante hongos de pudrición parda, de acuerdo a los reportes efectuados por Schubert y Nord (1950) y Kirk y Adler (1970), y

b) Por tratamiento con preparaciones comerciales de celulasa, se degrada la celulosa dejando libre a la lignina del material lignocelulósico, según reportan Pew y Wejma (1962).

En ambos procedimientos, tanto la utilización de microorganismos como la de enzimas celulolíticas tienen la finalidad de eliminar selectivamente a los carbohidratos dejando intacta a la lignina. Las desventajas del tratamiento con hongos de pudrición parda son: es un proceso que requiere de mucho tiempo (13-15 meses) y posiblemente los microorganismos causen alteraciones a la estructura de la lignina durante el periodo de incubación señala Pearl (1967), razones por las que Crawford (1981) considera que puede ser usada en investigaciones donde las modificaciones de la molécula no interfieran con la interpretación de los resultados, v.gr. como fuente de carbono para aislar microorganismos lignolíticos.

En el caso del tratamiento con celulasa, Crawford (1981) indica que se obtiene lignina con un alto porcentaje de carbohidratos contaminantes, los que a su vez pueden causar limitantes experimentales, v.gr. desarrollo microbiano debido a la presencia de los carbohidratos y no a la lignina.

### 3.3.3.3 Lignina Bjorkman

La lignina Bjorkman o Lignina de Madera Molida (HML) se obtiene a par--

En de madera finamente molida como su nombre lo indica, en un molino vibratorio de bola, mediante diversas extracciones y precipitaciones con solventes, según Bjorkman (1954), Pearl y Busche (1950a, 1960b), Glennie y McCarthy (1974), Pearl (1967), Kirk (1971) y Crawford (1981) consideran que este tipo de lignina es relativamente invariable y que es una de las mejores preparaciones de que se dispone para estudios microbiológicos.

#### 3.3.3.4 Ligninas Sintéticas

También denominadas DHP's (polímeros de deshidrogenación), se preparan *in vitro* por polimerización oxidativa de los alcoholes p-cumarilo, coniferilo o sinapilo (Kirk, 1971) en un medio amortiguado que contenga peroxidasa y peróxido de hidrógeno (Crawford, 1981). Higuchi (1971) describe un procedimiento de preparación de DHP's a partir del alcohol coniferilo. Al igual que la lignina de madera molida (MWL) es considerada por Kirk (1971) y Crawford et al. (1981a) de considerable valor para estudios microbiológicos.

#### 3.3.3.5 Compuestos Marcados Radiosotópicamente

Existen otras preparaciones de lignina de gran utilidad microbiológica, las cuales son compuestos marcados con isótopos, especialmente  $^{14}\text{C}$ , entre ellos tenemos DHP's marcados con  $^{14}\text{C}$  o ligninas sintéticas marcadas, ligninas naturales marcadas y MWL's marcadas con  $^{14}\text{C}$ .

##### 3.3.3.5.1 DHP's marcados con $^{14}\text{C}$

De manera similar a la indicada para DHP's anteriormente, este tipo de preparaciones pueden ser obtenidas con la única excepción de requerir alcoholes marcados isotópicamente. Sarkanen y Ludwig (1971), Kirk et al. (1975), Haider y Trojanowski (1975), Haider et al. (1977) y Haider y Trojanowski (1981) han publicado manuales detallados para preparar DHP's marcados con  $^{14}\text{C}$ , en lugares específicos como carbono de cadena lateral, de anillo aromático o bien de grupo metoxilo, usando el correspondiente alcohol adecuadamente marcado. Ha sido demostrado por Nimz et al. (1974) citado por Iwahara (1981), y Kirk et al. (1975) que los DHP's marcados con  $^{14}\text{C}$  preparados adecuadamente a partir de alcohol coniferilo contienen en esencia las mismas unidades que su correspondiente lignina natural, por tanto y de acuerdo con Kirk et al. (1975), Crawford y Crawford (1976), Hackett et al. (1977), Crawford et al. (1977) y Haider y Trojanowski (1981), las ligninas sintéticas marcadas con  $^{14}\text{C}$  son útiles como modelo en la elucidación del proceso de de-

gradación de lignina en la naturaleza. Crawford y Crawford (1976) añaden que este tipo de preparaciones carecen de carbohidratos asociados, por el procedimiento que se usa para sintetizarlas y no son representativas de la lignina en forma natural, aunque esto puede ser una ventaja en investigaciones fisiológicas.

Crawford (1981) considera que las ligninas sintéticas marcadas son los mejores modelos de que se dispone en investigación sobre biodegradación; -- Kirk et al. (1975) indican que con ellas puede estudiarse la habilidad de los microorganismos para atacar determinados lugares de la estructura de la lignina y que la producción de  $^{14}\text{CO}_2$  es una evidencia indudable de la descomposición biológica de lignina.

Las desventajas que presenta son:

- a) Se requiere de experiencia y habilidad para prepararlas, de acuerdo a Sarkanen y Ludwig (1971) y Crawford et al. (1981a),
- b) No están en contacto con pared celular intacta como las ligninas naturales (Crawford, 1981),
- c) En términos de economía son caras y difíciles de preparar, señala Crawford (1981).

### 3.3.3.5.2 Ligninas Naturales marcadas con $^{14}\text{C}$

También denominadas materiales lignocelulósicos marcados radioactivamente en la porción que es lignina y sin marca radioactiva en la porción celulósica, en forma abreviada se conocen como  $^{14}\text{C}$ -lignina-lignocelulosas.

Han sido preparadas suministrando precursores de lignina, a plantas a través de cortes en sus tallos o por inyección, como  $^{14}\text{C}$ -fenilalanina (Crawford y Crawford, 1976),  $^{14}\text{C}$ -ácido ferúlico (Haider y Trojanowski, 1975), --  $^{14}\text{C}$ -ácido cinámico (Phelan et al., 1979), o bien  $^{14}\text{C}$ -ácido p-cumárico (Haider et al., 1977; Phelan et al., 1979).

Crawford et al. (1981) indican que algunas vías de administración, como corte en tallo, que se usan en la aplicación de los precursores pueden causar daños a la planta y por ende inducir cambios fisiológicos en el metabolismo vegetal, incluyendo alteraciones en la biosíntesis de lignina, de tal manera que algunos investigadores prefieren usar otras vías de administración, por ejemplo: Haider y Trojanowski (1975) y Haider et al. (1977) efectúan el suministro por inyección; Kuroda y Higuchi (1976) por absorción; -- Crawford y Crawford (1976), Reid (1979) y Phelan et al. (1979) por corte en tallos, Crawford et al. (1981a) proponen como un procedimiento que causa me



nos alteraciones fisiológicas, la administración de los precursores durante la primavera por medio de cortes en vástagos y después de un año de crecimiento, cosechar el vástago.

El paso siguiente a la cosecha es moler el tejido vegetal y secarlo, ya sea por liofilización según Haider et al. (1977) y Trojanowski et al. (1977) o bien a 60°C de acuerdo a Crawford y Crawford (1978). Posteriormente se le hace una serie de extracciones con diversos solventes y soluciones, siendo el material remanente:  $^{14}\text{C}$ -lignina-lignocelulosas.

El uso de fenilalanina marcada con  $^{14}\text{C}$  como precursor de lignina en el paso inicial de obtención de las  $^{14}\text{C}$ -lignina-lignocelulosas, puede acarrear problemas debido a que puede ser incorporado el aminoácido a la síntesis de proteínas vegetales, sobre todo cuando se usan plantas de alto contenido proteico. Esto puede evitarse según Reid (1979) y Crawford et al. (1981a) usando precursores que no sean aminoácidos o bien eliminando las proteínas contaminantes con enzimas proteolíticas, siendo la primera alternativa la más recomendada por Crawford (1981).

Crawford et al. (1981a) indican que las lignocelulosas marcadas con  $^{14}\text{C}$  pueden ser empleadas de modo similar a los  $^{14}\text{C}$ -DHP's, con la ventaja de que las primeras constituyen sustratos más naturales que los segundos y que son de valor para cierto tipo de experimentos microbiológicos, v.gr. en la selección de microorganismos lignolíticos, ya que consideran que es mejor usar un sustrato donde la lignina esté asociada a polisacáridos en condiciones semejantes a las naturales, i.e. lignocelulosas, que usar una lignina libre de carbohidratos, i.e. DHP's.

Además, en los estudios sobre cinética de la humificación de la lignina deben utilizarse  $^{14}\text{C}$ -lignina-lignocelulosas más que DHP's por las razones antes mencionadas, indican Crawford y Crawford (1978). Kirk et al. (1976) opinan que cuando se desean determinar las concentraciones adecuadas de los co-sustratos necesarios para que se efectúe la degradación de lignina, lo más adecuado es usar DHP's.

Kirk et al. (1977) y Crawford (1981) las consideran como herramientas de gran ayuda en estudios microbiológicos, especialmente en la selección de microorganismos lignolíticos y en la definición de las relaciones que existen entre las degradaciones de lignina y celulosa, como lo confirman los trabajos realizados con  $^{14}\text{C}$ -lignocelulosas, entre ellos los de Trojanowski et al. (1977), Haider et al. (1978) y Gradziel et al. (1978).

### 3.3.3.5.3 MWL's marcadas con $^{14}\text{C}$

Como se indicó con anterioridad, las MWL's son una de las mejores preparaciones de que se dispone en Microbiología, cualidad que se incrementa cuando se preparan con marca radioactiva. Se preparan suministrando  $^{14}\text{C}$ -precursores, marcados en el anillo aromático, cadena lateral o grupo metoxilo, a las plantas. A las  $^{14}\text{C}$ -lignina-lignocelulosas formadas se les hace el proceso de extracción reportado por Bjorkman (1954), para así obtener  $^{14}\text{C}$ -MWL's

Crawford et al. (1981a) indican que al igual que las  $^{14}\text{C}$ -lignina-lignocelulosas preparadas con marca radioactiva específica, las  $^{14}\text{C}$ -MWL's pueden ser preparadas suministrando precursores específicamente marcados a la planta. Crawford (1981) opina que las ligninas de madera molida marcadas con  $^{14}\text{C}$  ofrecen las ventajas de los  $^{14}\text{C}$ -DHP's y  $^{14}\text{C}$ -lignina-lignocelulosas a un mismo tiempo.

#### 4. BIODEGRADACION DE LIGNINA

Como se ha mencionado con anterioridad, la lignina no es como otros biopolímeros que poseen unidades estructurales idénticas unidas por enlaces del mismo tipo, esto impide el diseño de experimentos en los que puedan ser definidas las biotransformaciones que sufre la lignina durante su biodegradación (Crawford, 1981). Teóricamente este problema se resuelve usando compuestos modelo; estudiando su biodegradación y extrapolando la información obtenida a la molécula de lignina, sin embargo Crawford (1981) señala que "se sabe que los microorganismos lignolíticos degradan compuestos modelo; pero no se sabe si las biotransformaciones que sufren tales compuestos modelo son similares a las que sufre la molécula". Otras razones que proporciona este autor son el hecho de que los compuestos modelo utilizados son de bajo peso molecular y solubles en agua, mientras que la lignina no es hidrosoluble y sí de alto peso molecular. Se han empleado diversos compuestos modelo y métodos para estudiar su biodegradación, a continuación se presenta una recopilación de los mismos que si bien no es exhaustiva, es representativa.

##### 4.1 Métodos para Estudiar la Biodegradación de Lignina

###### 4.1.1 Espectrofotométricos

Johnson et al. (1961) describen un método en el que todos los componentes de la madera son solubilizados en acetilbromuro, sin que sea alterado el espectro de absorción ultravioleta (UV) de la lignina y la absorbancia que presente tal solución a 280 nm será proporcional a la cantidad de lignina presente en la misma. Johnson et al. (1961) lo proponen como método para estudiar la biodegradación de lignina ya que el decremento de absorbancia a esa longitud de onda, indicará la cantidad de lignina atacada; al mismo tiempo señalan que las ventajas que presenta el método son: rapidez, fácil ejecución, pueden usarse muestras pequeñas y disminuye o elimina las interferencias que pudieran causar otros compuestos presentes.

Sin embargo, vanZyl (1978) citado por Crawford (1981) reporta que este procedimiento tiene muy baja reproducibilidad. Crawford et al. (1981a) también señalan que carece de especificidad, sensibilidad y adaptabilidad que poseen los métodos radioisotópicos.

Otros trabajos en los que se utilizan métodos espectrofotométricos son los de Odier y Monties citados por Crawford et al. (1981a), y Akin (1980). Odier y Monties en 1977 describen un método semejante al de Johnson et al. --

1961), diferenciándose de éste en que el solvente usado es una mezcla de dióxano-agua (1:1). Mientras que Akín (1980) usa como sustrato a compuestos modelo: ácidos ferúlico y sinápico en presencia de microorganismos aislados de líquido ruminal, comparando las diferencias de absorción a 200 y 244 nm antes y después de la fermentación.

Los inconvenientes que presentan los métodos espectrofotométricos son: la lignina puede adherirse a las células microbianas por lo que será errónea la determinación de la cantidad de lignina presente en la solución (Kirk, 1971) y posiblemente los cambios que presente la solución se deban a modificaciones estructurales de la lignina, sin que necesariamente se trate de biodegradación causada por los microorganismos (Crawford et al., 1981a).

#### 4.1.2 Medio de Cultivo

Consiste en preparar medios de cultivo a base de lignina y sales minerales en solución acuosa, los cuales una vez esterilizados son inoculados con microorganismos lignolíticos e incubados bajo determinadas condiciones. Periódicamente se hacen análisis para determinar los productos de degradación formados ya sea por métodos cromatográficos (Ishikawa et al., 1963a, 1963b; Ban et al., 1979), o bien por Resonancia Magnética Nuclear y Espectrometría de Masas (Ohta et al., 1979 citado por Higuchi, 1981c). También puede determinarse la cantidad de biomasa formada y considerarla proporcional a la cantidad de lignina degradada (Ban et al., 1979; Wicklow et al., 1980). Crawford (1981) señala que debe considerarse que las preparaciones de lignina que se utilicen no estén en contacto con sustancias que puedan servir como fuente de energía a los microorganismos, incluyendo solventes y residuos de carbohidratos.

#### 4.1.3 Técnica del Bloque de Suelo

Consiste en colocar material lignocelulósico sobre la superficie de suelo estéril o vermiculita dentro de una cámara, en la que se regulan la temperatura y la humedad reportan Mangenot y Reisinger (1972), Eslin et al. (1975) Ander y Eriksson (1977), Crawford et al. (1981a). El material lignocelulósico es inoculado con microorganismos lignolíticos, generalmente hongos y se incuba durante varios meses. Periódicamente se le hacen análisis, determinando pérdida de peso (Feist et al., 1971) y diversos análisis químicos tales como determinación del contenido de lignina Klason (Mangenot y Reisinger, 1972; Eßfand, 1977; Settleff y Eudy, 1981), variación del contenido de holocelulosa (Kirk, 1973), o bien de azúcares (Kirk y Highley, 1973; Eslin et al., 1975).

Las desventajas que presenta este método son que requiere de gran número de réplicas, mucho tiempo de incubación, la determinación del contenido de lignina por el método Klason sólo proporciona resultados aproximados de la verdadera concentración de lignina existente en la muestra, y que se forman gradientes de concentración, señala Crawford (1981), siendo la ventaja más importante de esta técnica que permite observar la velocidad con que son degradadas la lignina y la celulosa.

#### 4.1.4 Método de Observación Directa a Simple Vista

Consiste en preparar un medio de cultivo solidificado con sílica gel, lignina y sales minerales, reporta Sorensen (1962). El medio esterilizado es inoculado con microorganismos lignolíticos contenidos en una suspensión de suelo, después de cierto tiempo de incubación en determinadas condiciones de incubación, se observan manchas transparentes en el lugar donde la lignina ha sido degradada. Sorensen (1962) considera a este procedimiento como una herramienta útil en la selección de microorganismos lignolíticos y en la cuantificación de lignina biodegradada.

Sundman y Nase en 1971 citados por Crawford et al. (1981a) reportan la elaboración de un medio de cultivo a base de lignina y otras fuentes de energía, solidificado con agar. De manera similar a la técnica de Sorensen (1962) el medio de cultivo es inoculado e incubado, sólo que en este caso las zonas de biodegradación son observadas al cubrir la placa de agar con una solución de cloruro férrico-ferricianuro de potasio. Estas zonas son periféricas a las colonias y se observan translúcidas.

Crawford (1981) señala que este método solamente es cualitativo y muy útil para seleccionar microorganismos lignolíticos, como lo corroboran Ander et al. (1981) y Settliff y Eudy (1981).

#### 4.1.5 Observación Directa por Métodos Microscópicos

Consiste en dejar que microorganismos lignolíticos ataquen astillas o residuos de madera, durante cierto tiempo. Posteriormente el material, con diversos grados de biodegradación es preparado de acuerdo a diferentes técnicas microscópicas especiales y examinadas por Microscopía de Barrido (Blanchette y Shaw, 1978; Akin, 1980; Eriksson y Vallander, 1981) o por Microscopía Electrónica (Akin, 1980; Ruel y Barnoud, 1981).

#### 4.1.6 Métodos Radioactivos

Consisten en preparar compuestos marcados radioisotópicamente (ver pre-

paraciones de lignina], ya sea DHP's, lignocelulosas u otros compuestos modelo. Cantidades conocidas de ellos son incubados con microorganismos lignolíticos bajo determinadas condiciones en recipientes equipados de tal modo que permitan aereación continua o intermitente y muestreo de los gases producidos durante la incubación. El  $^{14}\text{CO}_2$  producido es señal inequívoca de que la lignina se está degradando (Crawford et al., 1981a), este  $^{14}\text{CO}_2$  puede ser recogido en solución acuosa de hidróxido de sodio o de potasio, o bien en un vehículo especial para determinaciones radioisotópicas, comúnmente Técnicas de Cuantificación por Centelleo en Líquidos; otros gases como  $^{14}\text{C-CH}_4$  pueden ser cuantificados por Técnicas de Dosificación proporcionales al flujo de gases en un cromatógrafo de gases (Hackett et al., 1977).

Los productos de la fermentación marcados con  $^{14}\text{C}$  pueden ser cuantificados por técnicas de dosificación por centelleo en líquidos o bien identificados y aislados por técnicas cromatográficas (Crawford et al., 1981b; Crawford, 1981).

Algunos de los trabajos que utilizan DHP's de alcohol coníferilo principalmente, con marca radiactiva ya sea en anillo, cadena lateral o grupo metoxilo son los de Kirk et al. (1975), Haider y Trojanowski (1975), Trojanowski et al. (1977), Hackett et al. (1977), Haider y Kladiško (1979), Norris (1980), Kaplan y Hartenstein (1980), Kirk (1981), Gold et al. (1981), entre otros.

Trabajos reportados que utilizan lignocelulosas son los de Haider y Trojanowski (1975), Crawford y Crawford (1976), Crawford et al. (1977), Trojanowski et al. (1977), Haider y Kladiško (1979), Maccubbin y Hodson (1980), Federle y Vestal (1980).

El uso de ácidos fenolcarboxílicos y cinámicos es reportado por Haider y Martín (1975) y Trojanowski et al. (1977); los fenoles son usados como sustrato por Kirk et al. (1975). Crawford et al. (1981b) reportan la síntesis de un polímero a partir de o-metoxi fenol o guayacol y la aplicación del mismo como sustrato para estudiar la biodegradación de lignina, consideran que este polímero es más fácil de preparar que los  $^{14}\text{C-DHP}$ 's y  $^{14}\text{C-lignina-lignocelulosas}$ ; más económico y con ventajas semejantes a las que ofrecen éstos.

#### 4.2 Microorganismos Lignolíticos

Los microorganismos con capacidad lignolítica comúnmente son hongos, los cuales están divididos en tres grupos principales: hongos de pudrición blanca, hongos de pudrición parda y hongos de pudrición blanda. Esta clasi-

ficación no es taxonómica sino que está considerada en base al tipo de pudrición que causan tales hongos (Kirk et al., 1977).

Otros microorganismos que poseen esta capacidad son algunas bacterias y hongos del suelo.

#### 4.2.1 Hongos de Pudrición Blanca

Son definidos por Schubert y Nord (1957) como aquellos hongos que atacan la madera, degradando lignina y dejando como residuo a la celulosa, de tal modo que aparecen manchas blancas en la madera. En el cuadro 2 se enlistan algunas especies de hongos de pudrición blanca.

Cowling (1961) reporta que bajo ciertas condiciones ambientales favorables, los hongos de pudrición blanca degradan todos los componentes estructurales de la lignina, formando como producto final:  $\text{CO}_2$  y agua.

La capacidad lignolítica de estos hongos varía de especie a especie, v. gr. Kirk (1973) reporta que Polyporus versicolor y Ganoderma applanatum biodegradan lignina y celulosa en proporciones similares mientras que Fomes umarius, Polyporus berkeleyi y Polyporus resinus biodegradan más rápidamente a la lignina. Ander y Eriksson (1977) encuentran que también Pycnoporus cinnabarinus, Pleurotus ostreatus, Phlebia radiata y Merulius tremellosus consumen más rápido a la lignina que a la celulosa.

Esto podría explicarse que es debido a la cantidad de enzimas del tipo de las fenoloxidasas que sintetizan, pues Kirk (1971) y Ander y Eriksson (1977) consideran que conforme un hongo tenga mayor producción de tales enzimas mayor será su actividad lignolítica. Esta aseveración apoya la sugerencia que con anterioridad hicieron Ishikawa et al. (1963a, 1963b).

Kirk (1971) señala que la lignina degradada por hongos de la pudrición blanca comparada con lignina intacta presenta un contenido menor de carbono, hidrógeno y grupos metoxilo, además de un mayor contenido de oxígeno, como puede observarse en el cuadro 3.

Una forma a través de la que pueden elucidarse, de forma aproximada, los cambios químicos que sufre un polímero es interrumpir el proceso y comparar el polímero parcialmente degradado con uno sin alteración (Kirk et al., 1977). En la biodegradación de lignina se han obtenido diferencias notables y se enlistan en el cuadro 4.

Oglesby et al. (1967) consideran que el primer paso en la biodegradación de lignina es un ataque sobre las unidades monoméricas que causa la liberación del éter guayacilglicerol- $\beta$ -coniferilo, el cual es posteriormente -

Cuadro 2. Especies representativas de Hongos de Pudrición Blanca

Hongo	Referencia
<u>Cyathus stercoreus</u>	Wicklow et al. (1980)
<u>Fomes annosus</u> = <u>Fomitopsis annosa</u>	Kaplan y Hartenstein (1980)
<u>Fomes applanatum</u> = <u>Ganoderma applanatum</u>	Kirk y Highley (1973)
<u>Fomes fomentarius</u>	Ishikawa et al. (1963a, 1963b)
<u>Fomes pinicola</u> = <u>Fomitopsis pinicola</u>	Blanchette y Shaw (1978)
<u>Fomes ulmarius</u> = <u>Rigidoporus ulmarius</u>	Kirk (1973)
<u>Lycoperdon pyriforme</u>	Ander y Eriksson (1977)
<u>Merulius tremellosus</u>	Ander y Eriksson (1977)
<u>Peniophora</u> sp.	Kirk y Highley (1973)
<u>Phanerochaete chrysosporium</u> = <u>Sporotrichum pulverulentum</u>	Kirk et al. (1975), Eriksson et al. (1980), Jeffries et al. (1981).
<u>Phanerochaete</u> sp.	Ander y Eriksson (1977)
<u>Phanerochaete velutina</u>	Ander y Eriksson (1977)
<u>Phellinus isabellinus</u>	Ander y Eriksson (1977)
<u>Phlebia gigantea</u> = <u>Pheniophora gigantea</u>	Kaplan y Hartenstein (1980)
<u>Phlebia radiata</u>	Ander y Eriksson (1977)
<u>Pholiota mutabilis</u>	Ander y Eriksson (1977)
<u>Pholiota spectabilis</u> = <u>Gymnopilus spectabilis</u>	Ander y Eriksson (1977)
<u>Pleurotus ostreatus</u>	Ander y Eriksson (1977)
<u>Polyporus abietinus</u> = <u>Hirschporus abietinus</u>	Blanchette y Shaw (1978)
<u>Polyporus adustus</u> = <u>Bjerkandera adusta</u>	Kaplan y Hartenstein (1980)



Cuadro 2. Especies representativas de Hongos de Pudrición Blanca (continuación)

Hongo	Referencia
<u>Polyporus berkeleyi</u>	Kirk (1973)
<u>Polyporus dichrous</u> = <u>Gloeopus dichrous</u>	Ander y Eriksson (1977)
<u>Polyporus resinus</u> = <u>P. benzoinus</u> = <u>Ischnoderma resinus</u>	Kirk (1973), Ander y Eriksson (1977)
<u>Polyporus versicolor</u> = <u>Coriolus versicolor</u> = <u>Trametes versicolor</u>	Ishikawa et al. (1963a, 1963b), Crawford y Crawford (1976).
<u>Polyporus volvatus</u> = <u>Cryptopus volvatus</u>	Blanchette y Shaw (1978), Norris (1980)
<u>Poria ambigua</u> = <u>Poria latemarginata</u>	Ander y Eriksson (1977)
<u>Poria subacida</u>	Ishikawa et al. (1963a)
<u>Pycnoporus cinnabarinus</u>	Ander y Eriksson (1977)
<u>Stereum frustolatum</u>	Kirk et al. (1968) citado por Higuchi (1981c).
<u>Trametes hirsuta</u> = <u>Coriolus hirsutus</u>	Kaplan y Hartenstein (1980)
<u>Trametes pini</u> = <u>Phellinus pine</u> = <u>Fomes pini</u>	Kaplan y Hartenstein (1980)
<u>Trametes zonata</u> = <u>Polyporus zonatus</u>	Ander y Eriksson (1977)
<u>Xylaria polymorpha</u>	Mangenot y Reisinger (1972)

Cuadro 3. Análisis elemental de ligninas con y sin pudrición blanca, tomado de Kirk (1971).

Lignina	% C	% H	% O	% OCH <sub>3</sub>
Bjorkman de pino sin inocular	63.70	6.29	30.01	15.50
Bjorkman de pino inoculada con <u>Polyporus versicolor</u>	61.41	6.11	32.48	10.10
Bjorkman de abeto sin inocular	62.81	5.88	31.31	15.24
Bjorkman de abeto inoculada - con <u>Porcia subacida</u>	60.44	5.67	33.89	12.32

Cuadro 4. Algunos de los cambios que presenta la madera de abeto atacada por hongos de pudrición blanca, comparados con madera intacta, tomado de Kirk et al. (1977).

Propiedad	Método de análisis	cambio	
		incremento	decremento
Contenido de carboxilos	Q, UV, IR, RMN	+	
Contenido total de hidroxilos	Q		+
hidroxilos alifáticos	Q, RMN		+
hidroxilos aromáticos	Q, RMN, UV		+
Contenido de carbonilos	UV, IR, RMN	+	
Contenido de Hidrógeno-C	Q		+
Contenido de Oxígeno-C	Q	+	
Contenido de metoxilo-C	Q		+

Q = diversos análisis químicos. UV = Espectroscopía Ultravioleta,  
 IR = Espectroscopía Infraroja, RMN = Resonancia Magnética Nuclear.

degradado a derivados benzílicos y éstos, a su vez, a  $\text{CO}_2$  y/o a compuestos que entren al ciclo del ácido cítrico. Los derivados benzílicos son: a) ácido vanílico obtenido vía coniferaldehído y vanilina, para algunos hongos, y b) ácido metoxi-gentísico obtenido vía ácido guayacilpirúvico, alcohol  $\beta$ -oxi coniferilo y alcohol coniferilo, para otros investigadores, habiendo mayor número de evidencias para el primero.

Kirk et al. (1977) sugieren que la degradación de lignina se produce de la siguiente manera: El biopolímero es convertido a unidades difenólicas por medio de reacciones de demetilación e hidroxilación aromáticas. Estas unidades difenólicas son degradadas hasta dar origen a residuos alifáticos, los que a su vez son degradados a través de reacciones hidrolíticas y oxidativas a productos de menor peso molecular que sí pueden entrar a la hifa fúngica. Agregan que en este proceso, algunos de los compuestos aromáticos de bajo peso molecular son liberados y metabolizados intracelularmente, mientras que algunas cadenas laterales son oxidadas a residuos carboxilo. La degradación de compuestos aromáticos ha sido estudiada con más detalle en bacterias que en hongos (Ander y Eriksson, 1978) por lo que se recomienda ver la figura 16.

Kirk et al. (1977) concluyen que el mecanismo de degradación es de tipo oxidativo y que los núcleos aromáticos son degradados oxidativamente cuando aún están dentro del polímero, o sea que el ataque por hongos de pudrición blanca no requiere depolimerización previa (figura 9).

Crawford (1981) en forma resumida opina que los hongos de la pudrición blanca degradan oxidativamente a la lignina por:

a) Demetilación y/o hidroxilación de los anillos aromáticos en las que se producen estructuras difenólicas, seguidas de

b) Oxigenólisis inmediata de los núcleos aromáticos polihidroxilados en la que se obtienen productos alifáticos, los que posteriormente pueden ser degradados a través de reacciones aldolíticas e hidrolíticas.

En la figura 10 se proporcionan los productos de la degradación que se obtienen al utilizar como sustrato a diferentes compuestos modelo, inoculándolos con suspensiones de Polyporus versicolor y Fomes fomentarius. Otro compuesto modelo utilizado es el éter guayacilglicerol- $\beta$ -coniferilo, cuya vía de biodegradación se observa en la figura 11.

Kirk (1981) hace notar la gran importancia que tienen las condiciones experimentales usadas, porque tienen gran influencia en los resultados que

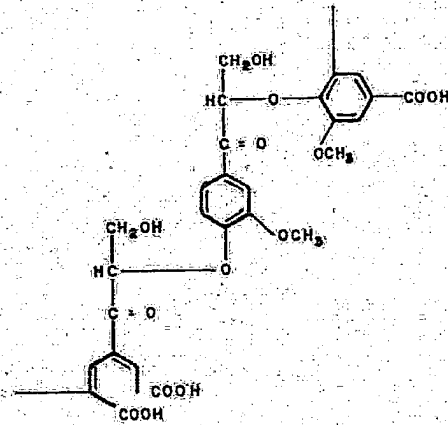


Figura 9. Estructura hipotética de una porción de lignina después de haber sido atacada por hongos de pudrición blanca.  
Tomado de Kirk et al. (1977)

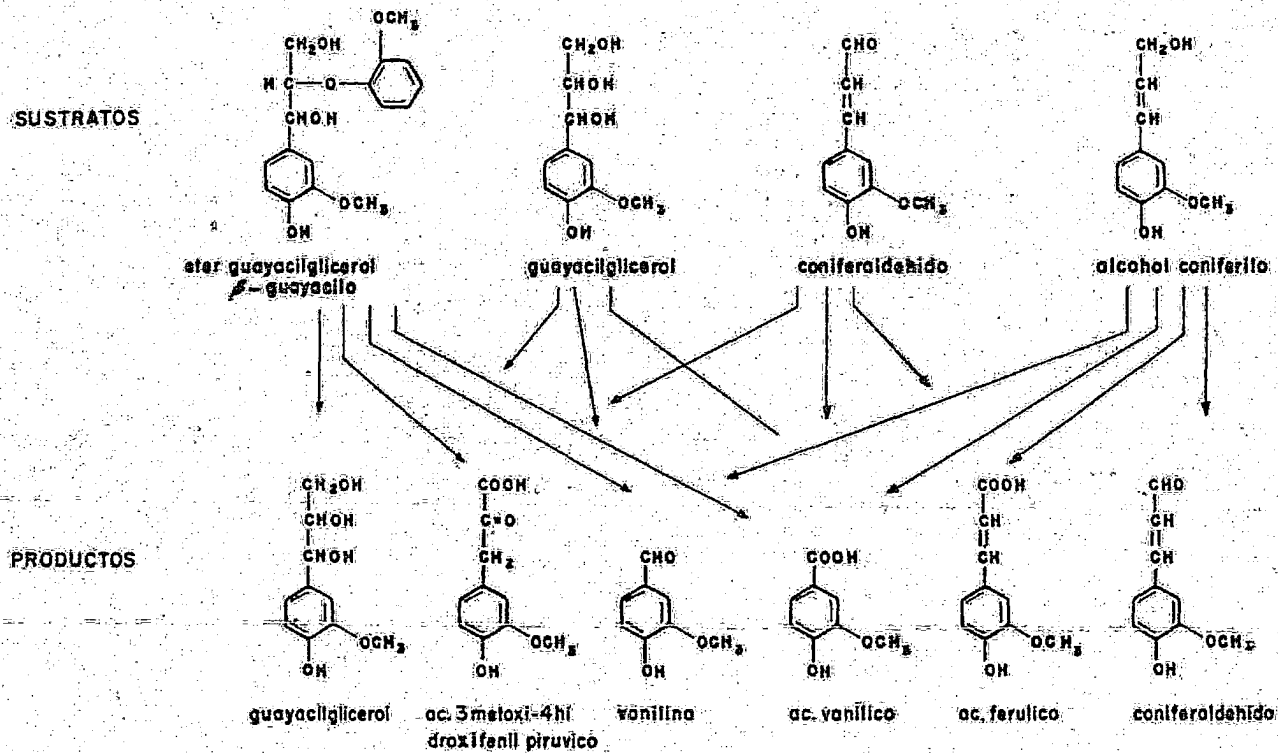


Figura 10. Principales productos de degradación que se obtienen al incubar los sustratos indicados con *P. versicolor* y *E. fomentarius*, tomado de Higuchi (1971).

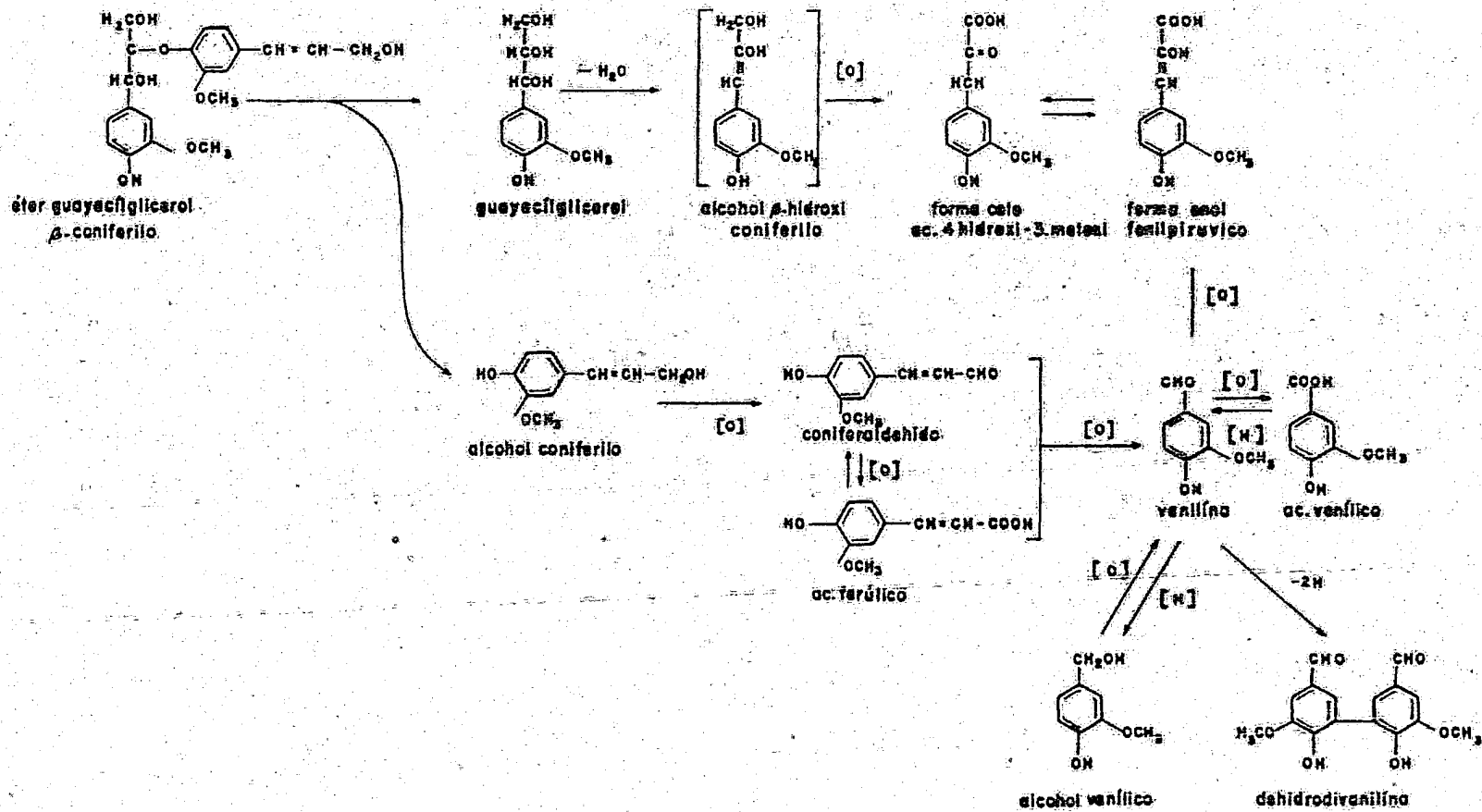


Figura 11. Esquema de la biodegradación del éter guayacilglicerol  $\beta$ -coniferilo por hongos de pudrición blanca, tomado de Takizawa et al. (1963 b).

se obtengan. Las condiciones más importantes que deben de ser tomadas en cuenta son: composición del medio de cultivo, tensión de oxígeno, presencia o ausencia de sustratos diferentes de la lignina fácilmente metabolizables, medios con o sin agitación y pH del medio. Agrega que es indispensable controlar perfectamente tales parámetros cuando se desee comparar las vías de degradación que presenten diversos hongos, pues incluso algunos agentes amortiguadores pueden inhibir la actividad lignolítica de los hongos a probar. Por ejemplo: Reid (1979) señala que la relación C/N del medio de cultivo influye en la actividad lignolítica de *Phanerochaete chrysosporium*, reportando que la cantidad de lignina degradada es proporcional a la cantidad de carbohidratos proporcionada. Esto es confirmado por Jeffries et al. (1981) quienes añaden que también es importante controlar la cantidad de metales residuales (oligo-elementos) agregados como  $Hg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$ . Eriksson et al. (1980) encuentran que la relación C/N óptima varía entre 160/1 y 400/1, sugiriendo que conforme es menor la relación C/N es más rápido el crecimiento de *Sporotrichum pulverulentum*.

Por otra parte, Reid y Seifert (1982) reportan que 7 de 10 especies de hongos de pudrición blanca estudiadas, degradan lignina más rápidamente en atmósfera de oxígeno que en aire, al mismo tiempo encuentran que los medios con agitación estimulan el crecimiento de los hongos, no observándose diferencia en los resultados obtenidos en ambas condiciones: en aire y en atmósfera de oxígeno.

Higuchi (1981c) considera que la lignina es degradada oxidativamente tanto en las cadenas alifáticas laterales como en los anillos aromáticos por medio de enzimas clave, las cuales son: deshidrogenasas de alcoholes aromáticos, las fenoloxidasas lacasa y peroxidasa, y las mono- y di-oxigenasas; que su intervención podría ser de la siguiente manera:

Las moléculas aromáticas con grupos hidroxilo fenólicos podrían ser atacadas preferencialmente por las enzimas fenoloxidasas y dar origen a nuevos grupos fenólicos que otra vez serían oxidados por las enzimas. Las hidrogenasas de alcohol aromático y las monoxigenasas podrían estar implicadas en la degradación oxidativa de cadenas laterales, mientras que las di-oxigenasas serían indispensables para escindir los anillos aromáticos. Y supone que el uso de tri- y tetra-lignoles como sustrato proporcionará más detalles del mecanismo de biodegradación de lignina.

#### 4.2.2 Hongos de Pudrición Parda



Son aquellos hongos que al atacar madera degradan extensamente a los carbohidratos y sólo causan una ligera disminución del contenido de lignina (Kirk, 1971; Ander y Eriksson, 1978).

Schubert y Nord (1950) consideran que el residuo color café oscuro de la madera que ha sufrido pudrición parda es lignina, por lo que lo denominaron "lignina enzimáticamente liberada".

Taxonómicamente los hongos de pudrición parda son similares a los de pudrición blanca y son predominantemente Basidiomicetos, de hecho algunos géneros forman parte de ambos tipos de hongos (Kirk, 1971). En el cuadro 5 se enlistan algunas de las especies pertenecientes a los hongos de pudrición parda.

Los cambios químicos que causan estos hongos a la molécula de lignina son: mayor contenido de oxígeno y menor contenido de hidrógeno, carbono y -- grupos metoxilo (Kirk, 1971). Es posible que el color que presenta esta lignina liberada enzimáticamente se deba a la presencia de cromóforos quinonoides del tipo de la melanina, que se producen por la oxidación de los catecoles (o-difenoles) formados por la demetilación de las estructuras difenólicas (Kirk, 1971; Ander y Eriksson, 1978).

Kirk (1975) citado por Ander y Eriksson (1978) señala que las diferencias en el modo de ataque que existen entre los hongos de pudrición parda y de pudrición blanca son:

1) Los de pudrición parda carecen de un sistema enzimático eficiente capaz de escindir el anillo aromático;

2) No acortan las cadenas laterales oxidativamente en las unidades  $\beta$ etilpropano terminales como los de pudrición blanca;

3) Carecen de la enzima Celobiosa: quinona oxido reductasa, que aparentemente interviene en la biodegradación de lignina y celulosa.

Kirk et al. (1975) analizaron comparativamente la biodegradación de DHP's de alcohol coníferilo marcados con  $^{14}C$  específicamente en cadena lateral, anillo aromático y grupo metoxilo, utilizando a *Gloeophyllum trabeum*, *Poria cocos* y hongos de pudrición blanca. Los resultados que obtienen son:

a) Mayor biodegradación del DHP marcado en grupo metoxilo, esto confirma que el cambio más notable que causan a la lignina es la demetilación.

b) Los hongos de pudrición parda degradan en menor proporción a los DHP's que los de pudrición blanca, o sea que se demuestra nuevamente que los primeros degradan principalmente carbohidratos y en menor proporción lignina

Cuadro 5. Especies representativas de Hongos de Pudrición Parda

Hongo	Referencia
<u>Contiophora fusispora</u>	Nilsson y Ginns (1979) citado por Crawford (1981)
<u>Contiophora prasinoïdes</u>	Nilsson y Ginns (1979) citado por Crawford (1981)
<u>Contiophora puteana</u>	Ander y Eriksson (1978)
<u>Contiophora suffocata</u>	Nilsson y Ginns (1979) citado por Crawford (1981)
<u>Daedalea quercina</u>	Kaplan y Hartenstein (1980)
<u>Laetiporus sulphureus</u>	Ander y Eriksson (1978)
<u>Lentinus lepideus</u>	Kirk y Highley (1973)
<u>Lenzites abietina</u>	Haider et al. (1978) citados por Haider y Trojanowski (1981)
<u>Lenzites sepiaria</u>	Grohn y Deters (1959) citados por Kirk (1971)
<u>Lenzites trabeum = Gloeophyllum trabeum</u>	Kaplan y Hartenstein (1980)
<u>Leucogyrophana arizonica</u>	Nilsson y Ginns (1979) citados por Crawford (1981)
<u>Leucogyrophana mollusca</u>	Nilsson y Ginns (1979) citados por Crawford (1981)
<u>Leucogyrophana olivascens</u>	Nilsson y Ginns (1979) citados por Crawford (1981)
<u>Leucogyrophana romellii</u>	Nilsson y Ginns (1979) citados por Crawford (1981)
<u>Merulius aureus</u>	Nilsson y Ginns (1979) citados por Crawford (1981)
<u>Merulius himantoides</u>	Haider et al. (1978) citados por Haider y Trojanowski (1981)
<u>Merulius lacrimans</u>	Haider et al. (1978) citados por Haider y Trojanowski (1981)
<u>Merulius silvester</u>	Haider et al. (1978) citados por Haider y Trojanowski (1981)
<u>Paxillus atrotomentosus</u>	Nilsson y Ginns (1979) citados por Crawford (1981)
<u>Paxillus involutus</u>	Nilsson y Ginns (1979) citados por Crawford (1981)

Cuadro 5. Especies representativas de Hongos de Pudrición Parda (continuación)

Hongo	Referencia
<u>Poria cocos</u>	Kirk et al. (1975)
<u>Poria contigua</u>	Haider et al. (1978) citados por Haider y Trojanowski (1981)
<u>Poria monticola</u>	Kaplan y Hartenstein (1980)
<u>Poria oleracea</u>	Ander y Eriksson (1978)
<u>Poria placenta</u>	Kaplan y Hartenstein (1980)
<u>Poria vaillantii</u>	Nilsson y Ginns (1979) citados por Crawford (1981)
<u>Poria vaporaria</u>	Haider et al. (1978) citados por Haider y Trojanowski (1981)
<u>Poria xantha</u>	Kaplan y Hartenstein (1980)
<u>Serpula incrassata</u>	Nilsson y Ginns (1979) citados por Crawford (1981)
<u>Serpula lacrymans</u>	Nilsson y Ginns (1979) citados por Crawford (1981)
<u>Tyromyces sericeomollis</u>	Ander y Eriksson (1978)

que los segundos.

Los trabajos realizados por Kirk et al. (1975) han sido corroborados -- por Kaplan y Hartenstein (1980).

#### 4.2.3 Hongos de Pudrición Blanda

Fueron observados por primera vez por Savohy en 1954, reportan Haider y Trojanowski (1975) y los denominaron "hongos de pudrición blanda" por su capacidad para degradar lignina y celulosa en cantidades proporcionales, lo cual hace que la superficie de la madera atacada muestre un ablandamiento característico (Ander y Eriksson, 1978).

Son los menos estudiados y en los trabajos efectuados para determinar su proceso de biodegradación sólo se ha realizado con un hongo: Chaetomium globosum (Eslin et al., 1975).

Seifert (1966) citado por Kirk (1971) reporta que Chaetomium globosum demetila a los monómeros fenilpropano metoxilados, motivo por el que Kirk (1971) considera evidente que este hongo puede degradar lignina aún cuando las determinaciones cuantitativas de pérdida de lignina no sean confiables y agrega que no es conveniente considerar que todos los hongos de pudrición blanda se comporten igual que Chaetomium globosum en cuanto a modo de ataque y efectos sobre la lignina. De hecho esto se comprobó con los trabajos de Eslin et al. (1975) quienes compararon las diferencias en composición química que presentan las maderas de pino, aliso y álamo, antes y después de haber sido atacadas por 6 hongos de pudrición blanda. Encontraron que:

a) Todos los hongos consumen primero carbohidratos que lignina, en madera de aliso y álamo; por lo que presentan acción similar a la de los hongos de pudrición parda.

b) Sin embargo, en madera de pino, dos especies: Paezilomyces sp. y Thielavia terrestris consumen más rápidamente lignina que carbohidratos de modo semejante a los hongos de pudrición blanca.

c) Confirman que la velocidad de ataque que presentan estos hongos está en función del tipo de madera y que los hongos de pudrición blanda degradan a las maderas duras (Hardwood) más rápidamente que a las maderas suaves (Softwood).

Haider y Trojanowski (1975) comprueban que los hongos de pudrición blanda son capaces de degradar completamente a la lignina, usando ligninas marcadas con  $^{14}\text{C}$  inoculadas con algunas especies de Preussia, Stachybotrys y Chaetomium, encontraron que todos los hongos usados convierten a  $^{14}\text{CO}_2$  los

Cuadro 6. Algunas especies representativas de los Hongos de Pudrición Blanda

Hongo	Referencia
<u>Acremonia</u> sp.	Da Costa y Bezemer (1979) citados por Crawford (1981)
<u>Allescheria</u> sp.	Eslin et al. (1975)
<u>Alternaria</u> sp.	Kirk (1971)
<u>Cephalosporium</u> sp.	Mangenot y Reisinger (1972)
<u>Chaetomium globosum</u>	Haider y Trojanowski (1975)
<u>Chaetomium piluliferum</u>	Haider y Trojanowski (1975)
<u>Chaetomium</u> sp.	Mangenot y Reisinger (1972)
<u>Cytosporella</u> sp.	Kirk (1971)
<u>Emericellopsis minima</u>	Da Costa y Bezemer (1979) citados por Crawford (1981)
<u>Graphium</u> sp.	Eslin et al. (1975)
<u>Hemicola</u> sp.	Da Costa y Bezemer (1979) citados por Crawford (1981)
<u>Monodictys</u> sp.	Eslin et al. (1975)
<u>Paecilomyces</u> sp.	Eslin et al. (1975)
<u>Paecilomyces varioti</u>	Kaplan y Hartenstein (1980)
<u>Papulospora</u> sp.	Eslin et al. (1975)
<u>Pestalotia multidea</u>	Da Costa y Bezemer (1979) citados por Crawford (1981)
<u>Pestalozzia</u> sp.	Kirk (1971)
<u>Phialophora</u> sp.	Kirk (1971)
<u>Preussia fleischhakeri</u>	Haider y Trojanowski (1975)
<u>Preussia</u> sp.	Haider y Trojanowski (1975)

Cuadro 6. Especies representativas de los Hongos de Pudrición Blanda (continuación)

Hongos	Referencia
<u>Pullularia</u> sp.	Haider y Trojanowski (1975)
<u>Thielavia terrestris</u> = <u>Allescheria terrestris</u>	Eslin et al. (1975)
<u>Sporocybe</u> sp.	Kirk (1971)
<u>Stachybotrys chartarum</u>	Haider y Trojanowski (1975)
<u>Xylaria</u> sp.	Nangenot y Reisinger (1972)

DHP's marcados con  $^{14}\text{C}$  ya sea en cadena lateral, grupo metoxilo y anillo aromático de la siguiente manera: Los hongos degradaron más rápidamente cadenas laterales y anillos aromáticos que grupos metoxilo, pero degradaron mayor cantidad de DHP's marcados en grupo metoxilo que de marcados en cadena lateral y anillo aromático. Concluyen que estos hongos pueden atacar indistintamente a grupos metoxilo, enlaces  $\beta$ -Ester de las cadenas laterales y a los anillos aromáticos de DHP's y ligninas.

#### 4.2.4 Otros Hongos

A este grupo pertenecen diversos hongos del suelo, con capacidad lignolítica, comúnmente hongos imperfectos que no pueden ser clasificados dentro de los grupos antes mencionados, en el cuadro 7 se proporcionan algunas especies representativas.

Ledingham y Adams (1942) y Adams y Ledingham (1942) reportan que cepas de Fusarium sp., Alternaria sp. y Endoconidiophora adiposa presentan actividad lignolítica. También Fischer (1953) citado por Kirk (1971) reporta varias especies del género Fusarium como degradadores de lignina, así como especies de Penicillium sp. (Gulyás, 1967 citado por Kirk, 1971).

Kirk (1971) señala que en los trabajos anteriores no se especifica si consideran que la lignina es adsorbida al micelio fúngico, lo cual pudiera ser fuente de error en las determinaciones, y que estos hongos se han estudiado poco.

Kaplan y Hartenstein (1950) utilizando 7 especies de hongos imperfectos entre ellos Aspergillus fumigatus, encuentran que son incapaces de degradar DHP's marcados con  $^{14}\text{C}$  en 2 meses, sin embargo A. fumigatus es capaz de degradar p-metoxifenol marcado con  $^{14}\text{C}$  en el grupo metoxilo.

Norris (1950) utilizando una cepa de Fusarium solanè y DHP's marcados específicamente con  $^{14}\text{C}$ , confirma que este microorganismo puede degradar cualquier carbono de cadena lateral así como al anillo aromático. También reporta que degrada lignina en menor proporción que Coriolus versicolor y que si se amortigua el pH del medio de cultivo a 4.0-5.0 se incrementa notablemente la biodegradación de lignina.

Higuchi (1951b) aísla varias especies del género Fusarium y analiza su capacidad para degradar DHP's de alcohol coníferilo, utilizando como compuestos modelo a alcohol dehidrodiconíferilo y Ester guayacilglicerol- $\beta$ -coníferilo, encuentra que degradan con mayor facilidad a los DHP's de menor peso molecular que a los de mayor peso molecular, postula unas vías metabólicas de

Cuadro 7. Especies representativas de otros hongos con capacidad lignolítica

Hongos	Referencia
<u>Alternaria sp.</u>	Waksman y Hutchings (1936) citados por Kirk (1971)
<u>Aspergillus fumigatus</u>	Hall et al. (1981)
<u>Aspergillus niger</u>	Kaplan y Hartenstein (1980)
<u>Aureobasidium pullulans</u>	Kaplan y Hartenstein (1980)
<u>Endoconidiophora adiposa</u>	Adams y Ledingham (1942)
<u>Fusarium lactis</u>	Fischer (1953) citado por Kirk (1971)
<u>Fusarium moniliforme</u>	Iwahara (1981)
<u>Fusarium nivale</u>	Fischer (1953) citado por Kirk (1971)
<u>Fusarium oxysporum</u>	Iwahara (1981)
<u>Fusarium solani</u>	Norris (1980)
<u>Fusarium sp.</u>	Gulya's (1967) citado por Kirk (1971)
<u>Penicillium sp.</u>	Gulya's (1967) citado por Kirk (1971)
<u>Penicillium variable</u>	Kaplan y Hartenstein (1980)
<u>Levaduras</u>	
<u>Pichia pinus</u>	Blanchette y Shaw (1978)
<u>Saccharomyces bailii</u>	Blanchette y Shaw (1978)
<u>Trichosporon cutaneum</u>	Ban et al. (1979)
<u>Trichosporon fermentans</u>	Ban et al. (1979)



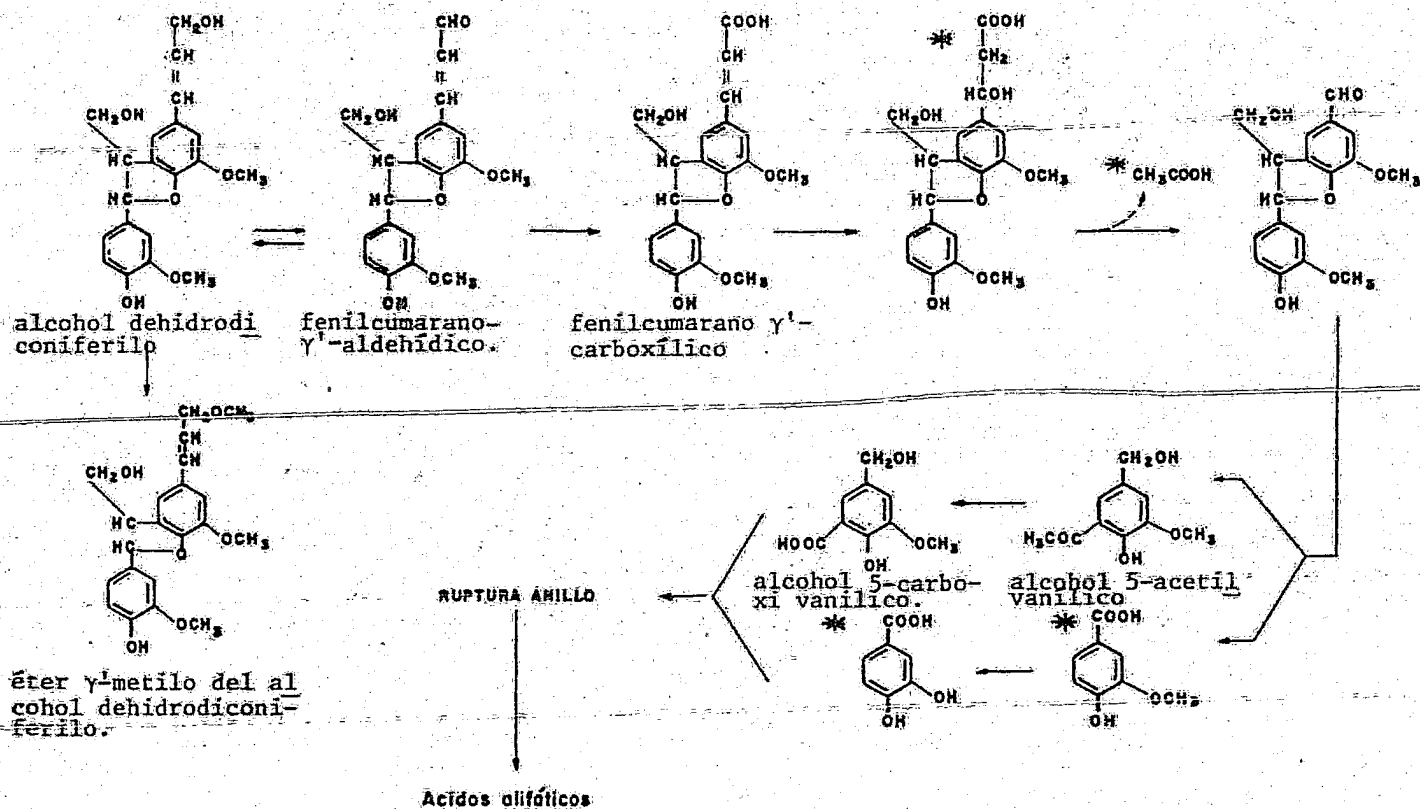


Figura 12. Ruta de degradación del alcohol dehidrodiconiferilo por *Fusarium solani*, postulada por Higuchi (1981b)

\* = compuestos hipotéticos.

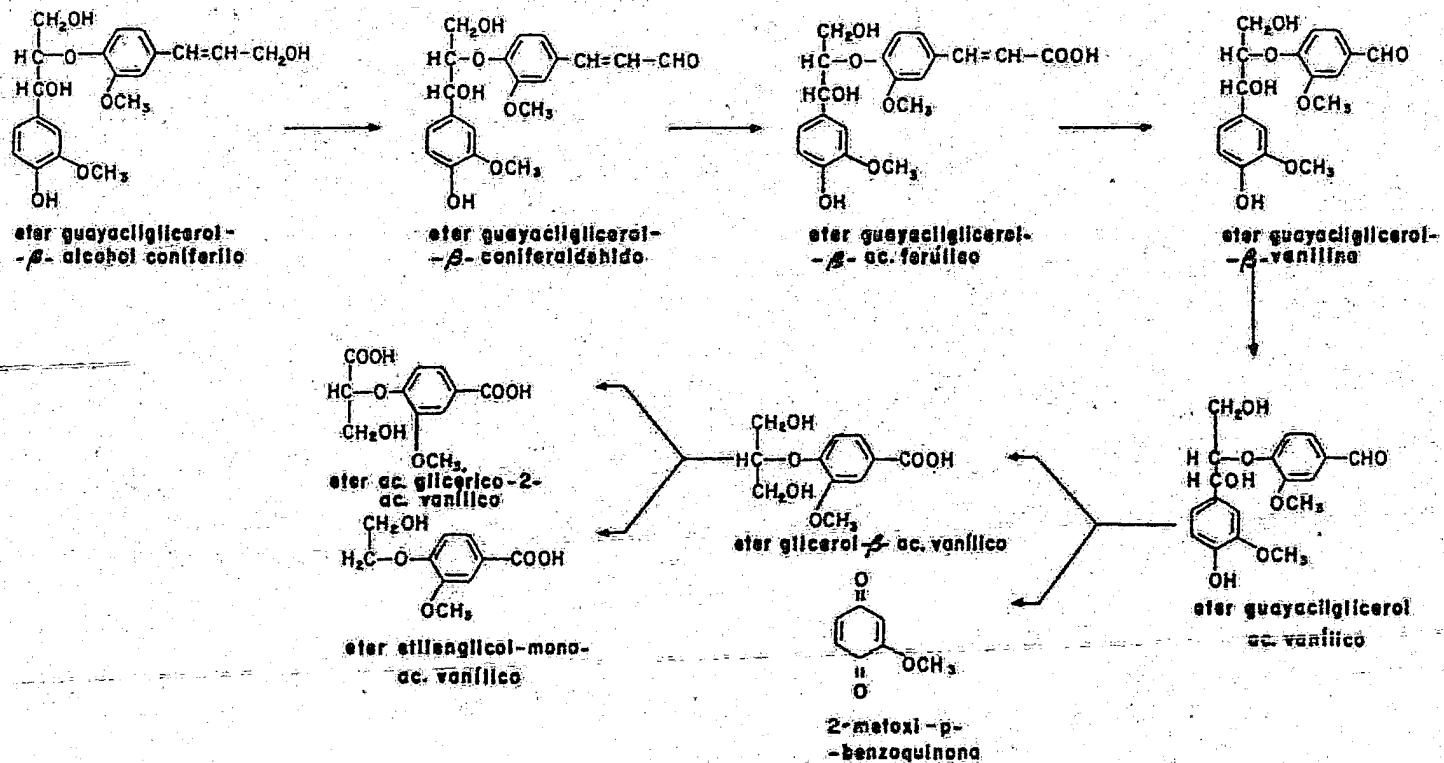


Figura 13. Ruta de degradación del éter guayacilglicerol- $\beta$ - alcohol coniferilo por *Fusarium solani*, tomado de Higuchi (1981c).

degradación, las cuales se proporcionan en las figuras 12 y 13. En base a lo anterior, postula un esquema que explica hipotéticamente la biodegradación de una estructura modelo de lignina de 7 monómeros, mismo que se observa en la figura 14.

Iwahara (1981) usando otras especies de Fusarium obtiene resultados similares a los de Higuchi (1981b), además reporta que los hongos estudiados sintetizan una enzima extracelular que cataliza la conversión del grupo  $\alpha, \beta$ -alcohol insaturado de los dilignoles a sus aldehídos correspondientes, pero que no oxida alcoholes primarios aromáticos como alcohol bencílico, alcohol p-metoxibencílico y alcohol vanílico.

Blanchette y Shaw (1978) y Ban et al. (1979) reportan que en cultivos mixtos de levaduras y hongos o bacterias, la presencia de levaduras incrementa sinérgicamente el efecto lignolítico que poseen los basidiomicetos y bacterias estudiados. No se encontraron trabajos que reporten que las levaduras posean capacidad lignolítica.

#### 4.2.5 Bacterias

Kirk et al. (1977) y Ander y Eriksson (1978) señalan que existen pocas evidencias que indiquen que las bacterias degradan lignina en madera, y que esto puede deberse a que las bacterias por su falta de movilidad no cuentan con el poder de penetración que poseen las hifas fúngicas.

Sorensen (1962) reporta que bacterias del género Pseudomonas poseen actividad lignolítica, pues solubilizan lignina y detecta ligeras pérdidas de lignina en peso. Kirk (1971) señala los problemas inherentes que poseen las técnicas experimentales desarrolladas para estudiar la biodegradación de lignina por bacterias.

Trojanowski et al. (1977) utilizando una Nocardia sp. reportan que esta bacteria es capaz de degradar DHP's de alcohol coníferilo y lignina de lignocelulosa aislada de rastrojo de maíz, marcados con  $^{14}\text{C}$  específicamente en anillo aromático, cadena lateral y grupo metoxilo, en el siguiente orden (de mayor a menor): grupo metoxilo, cadena lateral y anillo aromático, para DHP's; mientras que para lignocelulosas de maíz, el orden fue: cadena lateral, grupo metoxilo y anillo aromático, como se deduce del cuadro 9. Los resultados nos indican que Nocardia sp. biodegrada lentamente a las moléculas aromáticas de la lignina y que sí es capaz de romper los enlaces éter que unen a las cadenas laterales de los lignoles (Haider y Trojanowski, 1981).

Blanchette y Shaw (1978) reportan la biodegradación de lignosulfonatos

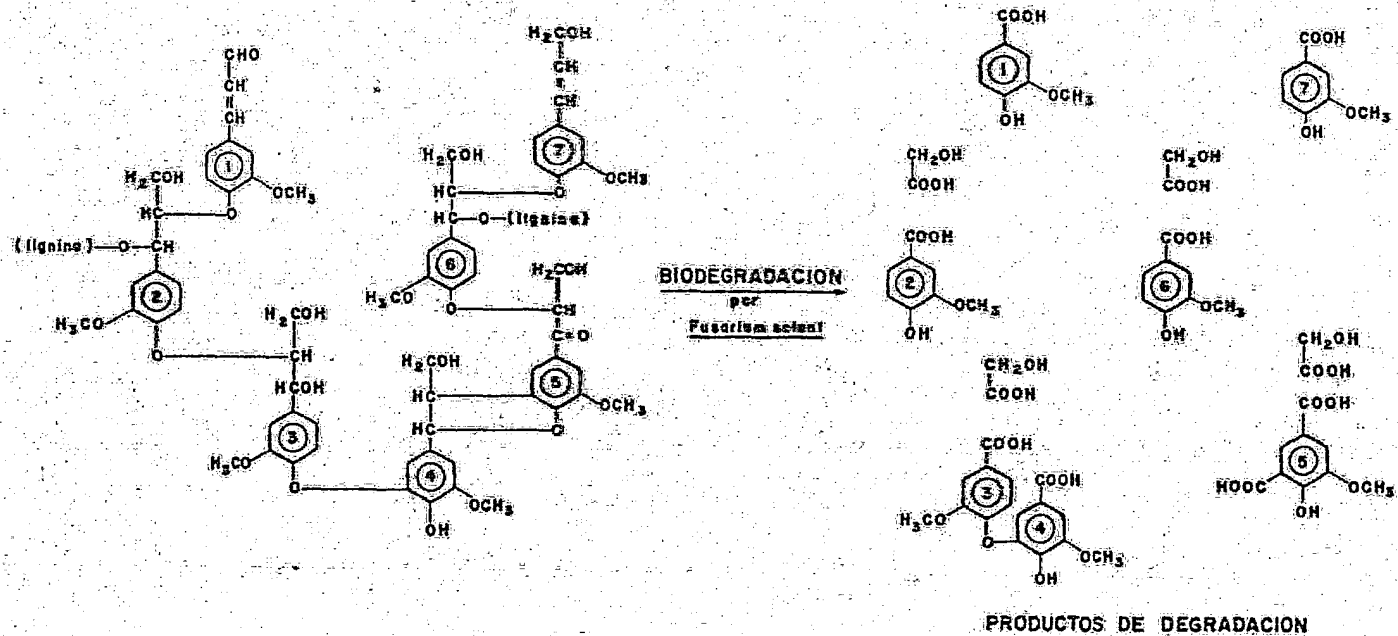


Figura 14. Esquema hipotético de la biodegradación de un compuesto modelo de lignina de 7 unidades por *Fusarium solani*, postulado por Higuchi (1981b).

Cuadro 8. Especies representativas de Bacterias lignolíticas

Bacteria	Referencia
<u>Agrobacterium</u> sp.	Flaig y Haider (1961) citado por Ban et al. (1979)
<u>Arthrobacter</u> sp.	Kaplan y Hartenstein (1980)
<u>Arthrobacter citreus</u>	Ban et al. (1979)
<u>Arthrobacter terregens</u>	Ban et al. (1979)
<u>Bacillus subtilis</u>	Kaplan y Hartenstein (1980)
<u>Chromobacterium violaceum</u>	Ban et al. (1979)
<u>Enterobacter</u> sp.	Blanchette y Shaw (1978)
<u>Flavobacterium</u> sp.	Sorensen (1962)
<u>Mycobacterium</u> sp.	Kirk (1971)
<u>Micrococcus</u> sp.	Kirk (1971)
<u>Pseudomonas</u> sp.	Sorensen (1962)
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	Kaplan y Hartenstein (1980)
<u>Pseudomonas fluorescens</u>	Kaplan y Hartenstein (1980)
<u>Streptomyces setonii</u>	Antai y Crawford (1981)
<u>Streptomyces viridosporus</u>	Antai y Crawford (1981)
<u>Xanthomonas</u> sp.	Kirk (1971)

Cuadro 9. Liberación de  $^{14}\text{CO}_2$  por *Nocardia* sp. a partir de DHP's y lignina de rastrojo de maíz marcados con  $^{14}\text{C}$  con respecto al tiempo, tomado de Trojanowski et al. (1977).

Tipo de Lignina	Marcado en	$^{14}\text{CO}_2$ liberado *			
		1 día	5 días	9 días	15 días
DHP	Grupo metoxilo	0.3	5.8	9.5	10.5
	Cadena lateral	0.1	2.5	5.3	6.6
	Anillo aromático	0.1	2.2	4.0	4.7
Lignina vegetal	Grupo metoxilo	1.0	6.1	9.9	13.6
	Cadena lateral	0.8	7.8	11.8	16.2
	Anillo aromático	0.0	4.1	4.9	5.2

\* Determinado en % de cuenta radioactiva liberada con respecto a la total aplicada.

de calcio en un 50% usando un cultivo mixto de microorganismos constituido por levaduras del género Trichosporon y bacterias de los géneros Pseudomonas, Arthrobacter y Chromobacterium.

Kaplan y Hartenstein (1980) en un análisis similar al de Trojanowski et al. (1977), usando Pseudomonas fluorescens y Pseudomonas aeruginosa y DHP's de alcohol coniferilo marcado específicamente con  $^{14}\text{C}$ , reportan la biodegradación de estos compuestos en el siguiente orden (de mayor a menor): cadena lateral, anillo aromático y grupo metoxilo.

Crawford y Sutherland (1981) aislan a partir de diversos habitats, ricos en materia vegetal en descomposición, un gran número de actinomicetos lignolíticos, predominantemente del género Streptomyces. Demuestran que algunas especies degradan la fracción celulosa más rápidamente, otras degradan sólo ligeramente la fracción lignina y unas terceras, ambos componentes de lignocelulosa, además de degradar lignina de madera molida y lignina Kraft a  $^{14}\text{CO}_2$ .

Kawahara (1981) trabajando con Pseudomonas ovalis, Pseudomonas fluorescens y algunas especies silvestres de Pseudomonas aisladas de agua dulce y marina, encuentra que aunque estas bacterias no posean enzimas fenoloxidasas sí tienen gran actividad lignolítica e incluso es mayor en las especies silvestres que en las primeras.

Por otro lado, Kawahara (1981) reporta que una Pseudomonas sp. aislada de suelo, degrada el ácido vanílico a los compuestos isoméricos: ácido vanílico e iso-vanílico, que al demetilarse dan origen al ácido protocatequínico como se muestra en la figura 15. El ácido protocatequínico es a su vez degradado como se muestra en la figura 16.

En una concisa revisión de los trabajos realizados con bacterias lignolíticas, Haiden y Trojanowski (1981) concluyen que:

a) Las bacterias atacan más energicamente a los carbonos del grupo metoxilo y cadena lateral que a los de anillo aromático,

b) Algunas especies de bacterias lignolíticas no poseen enzimas fenoloxidasas, por lo que deben tener enzimas lignolíticas adicionales,

c) La biodegradación de lignina en el suelo o compostas es realizada por una microflora mixta que causa un efecto sinérgico: incrementando la velocidad de degradación en comparación con la degradación hecha por microorganismos solos, esto puede deberse a que la microflora mixta se proporciona entre sí nutrientes adicionales, o bien a que incrementan la susceptibilidad -

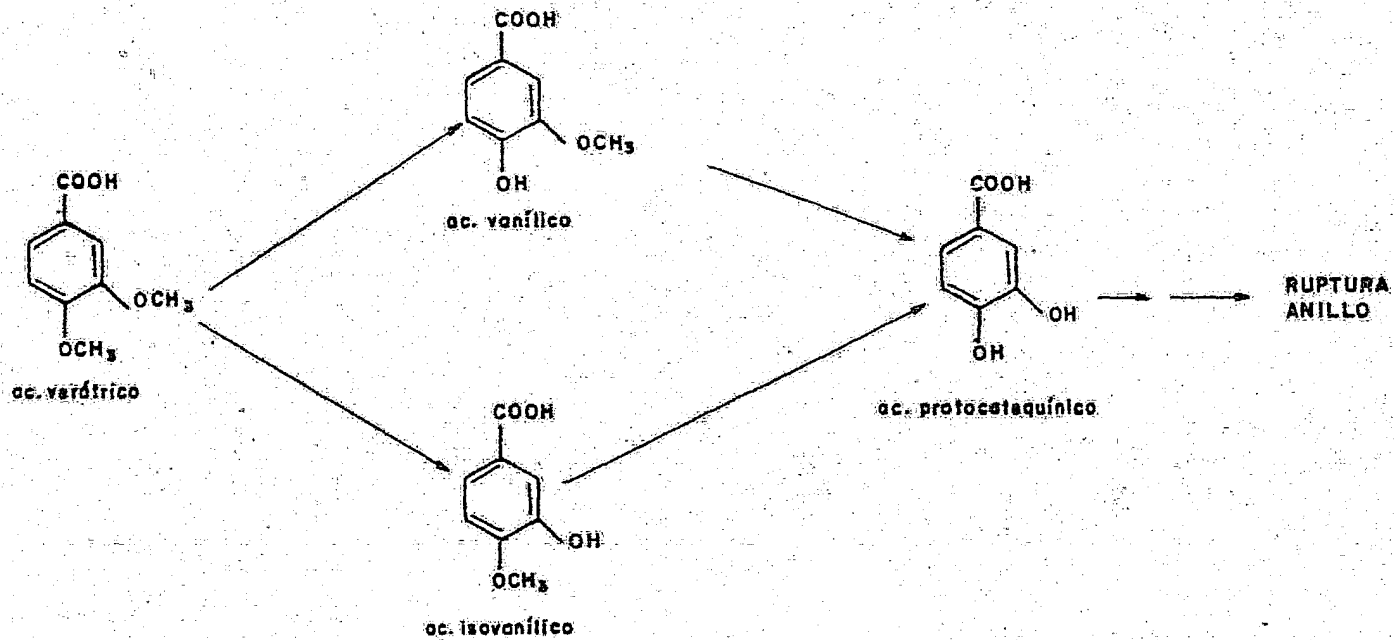


Figura 15. Metabolismo del ácido verátrico, tomado de Kuwahara (1981).



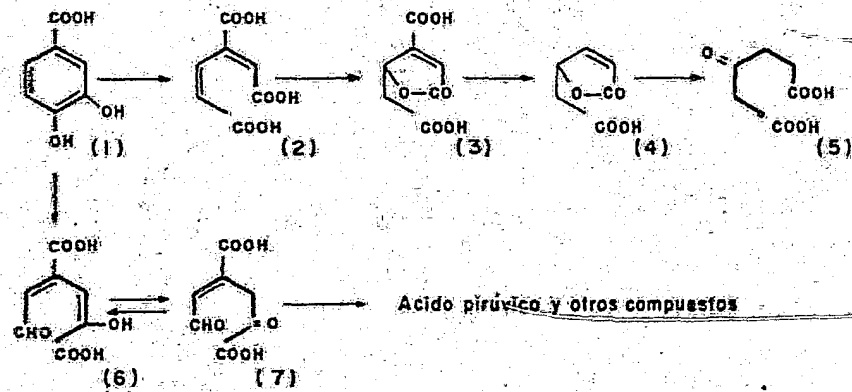


Figura 16. Vía metabólica de degradación del ácido protocatequínico por microorganismos, tomado de Higuchi (1981b), donde:

- (1) = ac. protocatequínico
- (2) = ac  $\alpha$ -carboximucónico
- (3) =  $\alpha$ -carboximucón lactona
- (4) = muconolactona
- (5) = ac  $\beta$  cetoadípico
- (6) = semi aldehído  $\alpha$ -hidroxi  $\gamma$ -carboxi mucónico

de la lignina al ataque enzimático. Las condiciones ambientales como temperatura y humedad, influyen notablemente el desarrollo y la actividad de la microflora lignolítica.

#### 4.3 Enzimas que Intervienen en la Biodegradación de Lignina

Ander y Eriksson (1978) señalan que las enzimas que intervienen en la biodegradación de lignina son clasificables dentro de los siguientes tipos:

- a) Enzimas demetilantes
- b) Enzimas que rompen enlaces de éter aril- $\beta$ -alquilo
- c) Fenoloxidasas, dentro de las que se incluyen a lacasa, peroxidasa y tirosinasa.
- d) Oxigenasas, éstas son: monoxigenasas y dioxigenasas
- e) Celobiosas: quinona oxido reductasa.

##### 4.3.1 Enzimas Demetilantes

Ander y Eriksson (1978) consideran que el primer paso en la preparación del anillo aromático para su ruptura es una demetilación, y que es causada por diversas enzimas: fenoloxidasas y monoxigenasas.

La demetilación es efectuada por hongos de pudrición blanca, de pudrición parda y bacterias, su ataque es medido determinando el decremento en el contenido de metoxilos (Higuchi, 1971; Kirk, 1971).

##### 4.3.2 Enzimas que rompen Enlaces Éter aril- $\beta$ -alquilo

Crawford (1981) señala que este tipo de enlace representa de 30 a 50% de los enlaces intermonómeros presentes en la lignina de abeto. Algunos compuestos modelo que presentan este tipo de enlace son los éteres: guayacilglicerol- $\beta$ -guayacilo, veratril glicerol- $\beta$ -guayacilo; guayacilglicerol- $\beta$ -alcohol coniferilo, cuyas estructuras químicas pueden observarse en las figuras 10, 11 y 13 (Higuchi, 1981c). Ander y Eriksson (1978) hacen notar que sólo se han obtenido evidencias de este tipo de actividad enzimática en hongos, mientras que en bacterias sí se ha comprobado; tal es el caso de Pseudomonas acedovorans que produce ácido vanílico y guayacol, a partir del éter veratril glicerol- $\beta$ -guayacilo (Crawford et al., 1975), mientras que Enoki (1980) cita por Crawford (1981) reporta que Phanerochaete chrysosporium puede degradar compuestos con enlaces éter aril- $\beta$ -alquilo, pero no rompiendo este enlace directamente.

##### 4.3.3 Fenoloxidasas

Crawford (1981) menciona que se denomina fenoloxidasas a 3 diferentes tipos de enzimas, las cuales son: tirosinasa ( $O_2$ : o-difenol óxido reductasa E.C. 1.10.3.1.), lacasa ( $O_2$ : p-difenol óxido reductasa, E.C. 1.10.3.2.) y peroxidasa (donador:  $H_2O_2$  óxido reductasa, E.C. 1.11.1.7.).

La tirosinasa es una enzima que posee dos funciones: a) cataliza la monohidroxilación de fenoles para producir orto-difenoles u orto-quinonas (figura 17A), y b) oxida los catecoles a orto-quinonas (figura 17B) (Ander y Eriksson, 1978).

Las enzimas lacasa y peroxidasa catalizan la oxidación de los orto- y para-difenoles, apropiándose de un ión hidrógeno y dando origen a radicales libres, como puede observarse en la figura 17C (Ander y Eriksson, 1978; Noguchi et al., 1980; Crawford, 1981). Estos a su vez pueden formar complejos al unirse de modo no enzimático entre sí, como puede verse en la figura 17D (Krisnagkura y Gold, 1979; Ishihara, 1981). Lobarzewski (1981) reporta que tanto el ácido siríngico como los lignosulfonatos inducen la síntesis de peroxidasa por Trametes versicolor.

#### 4.3.4 Oxigenasas

Como se indicó anteriormente, son de dos tipos: a) las monoxigenasas que catalizan la incorporación de un átomo de una molécula de oxígeno ( $O_2$ ) dentro de una molécula de sustrato, como se observa en la figura 18A. El otro átomo de oxígeno es reducido hasta agua en presencia de un donador adecuado de electrones como es el NADPH o el NADH (Cartwright y Smith, 1967; Gibson, 1968; Fukuzumi et al., 1969). Después de la monooxigenación, el sustrato se vuelve más hidrosoluble y el anillo aromático puede ser roto por di oxigenasas (Ander y Eriksson, 1978). La actividad monoxigenasa se ha encontrado principalmente en bacterias (Cartwright y Smith, 1967; Toms y Wood, 1970), y en algunos hongos de pudrición parda (Kirk y Adler, 1970).

b) Las dioxigenasas promueven la incorporación de ambos átomos de oxígeno dentro de una molécula de sustrato como se observa en la figura 18B. Ander y Eriksson (1978) concluyen que a la fecha no se han obtenido preparaciones puras de enzimas a partir de hongos degradadores de lignina, aunque sí hay evidencia de su presencia, como lo demuestran los trabajos de Cain et al (1968), Bilton y Cain (1968) y Kaplan y Hartenstein (1980).

#### 4.3.5 Celobiosa: quinona óxido reductasa

En 1974 Westermarck y Eriksson, citados por Ander y Eriksson (1978), des

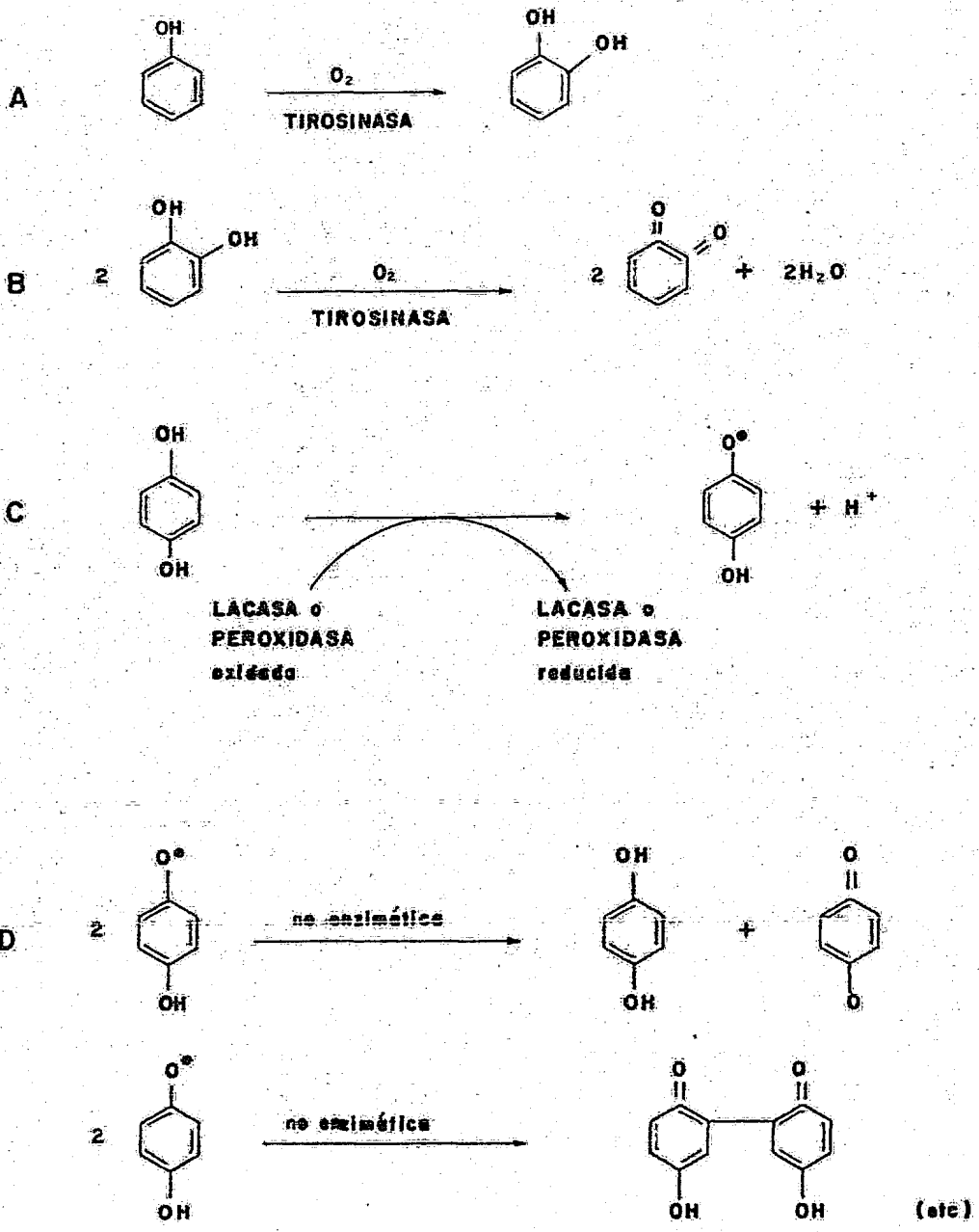


Figura 17. Representación esquemática de las actividades de los enzimas fenoloxidasas, tomado de Crawford (1981).

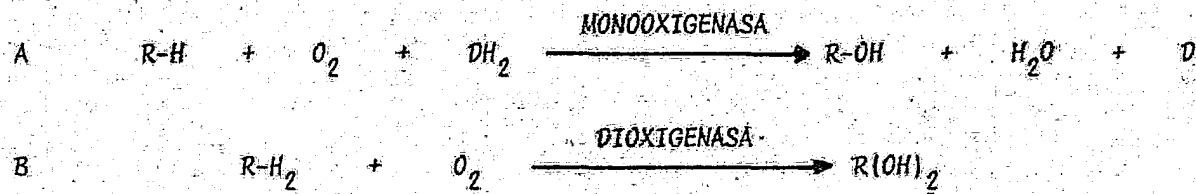


Figura 18. Actividades enzimáticas de las Oxigenasas (Gibson, 1968), donde R-H = sustrato, -  
 DH<sub>2</sub> = donador de electrones.

cubrieron una nueva enzima degradadora de la madera, al trabajar con P. versicolor y S. pulverulentum, la cual se sintetiza solamente cuando existe celulosa en el medio de cultivo y la presencia de ésta inhibe la síntesis de fenoloxidasas.

La celobiosa quinona oxido reductasa producida por S. pulverulentum es una flavoproteína con FAD como grupo prostético y el producto de la oxidación de celobiosa es la celobiono- $\beta$ -lactona, y es capaz de reducir orto- y para-quinonas.

Eriksson et al. [1980] demostraron que esta enzima es importante en la degradación de lignina, aunque no indispensable, pues al comparar actividades de dos cepas: una mutante sin celulasa y otra normal, encontraron que la mutante sí era capaz de degradar lignina, mientras que la otra cepa degradó lignina en mayor proporción que la mutante aún cuando el medio contenía celulosa.

## 5. APLICACIONES DE LA LIGNINA Y COMPUESTOS DERIVADOS

Grandes cantidades de lignina son producidas anualmente y acumuladas como material de desecho, sin que sean utilizadas adecuadamente, ya sea controlando su potencial contaminante o bien procesándola para obtener productos de valor comercial, esto se ha convertido en un problema de urgente resolución, indican Pearl [1967], Harkén et al. [1974], Browning [1975] y Sjöström [1981] entre otros.

La situación no debe considerarse tan pesimista ya que se ha estado trabajando sobre la posibilidad de utilizarla desde antes de la Segunda Guerra Mundial indica Pearl [1967], pues se quema en hornos para obtener reactivos químicos y energía en forma de vapor [Glasser, 1980].

Los procesos por los que se producen las cantidades más significativas de lignina son el Proceso al Sulfito y el Proceso Kraft. Pearl [1967] hace una revisión amplia sobre las aplicaciones de las ligninas aisladas por estos métodos en base a sus propiedades físicas y químicas.

Drew et al. [1978] consideran que los niveles principales en los que la lignina puede ser utilizada son tres:

- 1) Como lignina directamente
- 2) Como lignina modificada químicamente
- 3) Como sustrato para producir reactivos de bajo peso molecular

### 5.1 Uso Directo

Representan a las aplicaciones en las que no es necesario hacer mayor inversión, o sea se utiliza a la lignina tal como es aislada.

#### 5.1.1 Como Fuente de Energía

Drew et al. [1978] indican que la mayor proporción de lignina que es aislada por el proceso Kraft en Estados Unidos es consumida como combustible debido a su relativo valor calorífico. Falkehag [1975] señala que si se clasifican a la celulosa y hemicelulosa como componentes energéticos separados, la lignina almacena más energía solar que cualquier otro componente funcional en las plantas (casi un 40%). Herrick y Hergert [1977] reportan que mientras el valor de los combustibles derivados del petróleo no sea menor al de las aplicaciones de lignina al sulfito, predominará el uso de la lignina como combustible.

#### 5.1.2 Adición a Otros Productos

Glasser (1980) propone que el consumo de lignina aumentará si se incrementa la fabricación y el uso de pulpas que contengan lignina, sin embargo - las ligninas poseen un color que es bastante estable y esto condiciona que - dichas pulpas sólo encuentren uso en la preparación de productos de menor calidad. Aun cuando Pew y Connors (1971) reportan que el pretratamiento con Borohidruro de Sodio puede blanquear las ligninas, los trabajos de Meshitsuka y Nakano (1973) reportan que tanto los lignosulfonatos como la lignina Kraft tienen grupos funcionales del tipo hidroxilo fenólico y catecol, los cuales forman compuestos complejos metálicos y son los responsables del color.

### 5.1.3 Producción de Proteína Unicelular

Pearl (1967) señala que desde el período posterior a la Segunda Guerra Mundial, en plantas industriales se eliminan los azúcares que contienen los residuos del proceso al sulfito, por medio de fermentaciones alcohólicas con la levadura Torula, en las que se obtienen proteína unicelular y etanol, y - como subproductos a los lignosulfonatos purificados.

Harkin et al. (1974) reportan un proceso fermentativo de desechos de la industria papelerá, principalmente lignina Kraft, usando al actinomiceto -- Termonospora fusca. Obtienen proteína fácilmente cosechable y enzimas extracelulares del tipo polisacaridasas, estas últimas utilizables en la elaboración de alimentos. En ese mismo trabajo demuestran que la proteína obtenida puede ser usada en la alimentación de aves de corral con buenos rendimientos y sin riesgos de toxicidad. Otros trabajos que reportan la producción - de proteína a partir de desechos celulósicos son los de Callihan et al. -- (1975) y Rosenberg y Wilke (1981) entre otros.

### 5.2 Uso de Ligninas Químicamente Modificadas

Drew et al. (1978) indican que comúnmente los procesos industriales por los que se aísla, separa y purifica a la lignina, la convierten en un producto de relativamente poca reactividad, por lo que la modificación química de las ligninas aisladas ha incrementado sus formas de utilización.

Las propiedades que la lignina proporciona a la madera son: resistencia a "stress" mecánico, bioquímico, químico y ambiental, menciona Glasser (1980) y junto con Falkehag (1975) y Browning (1975) consideran que por estas propiedades puede tener aplicación en adhesivos, como agente antioxidante, dispersante, complejante y de liberación controlada, entre otros.



### 5.2.1 Fabricación de Adhesivos y Resinas

Pearl (1967) resume que los lignosulfonatos purificados encuentran uso como adhesivos en la fabricación de cintas engomadas, de pegamentos a base de lignina y alcohol polivinílico, y como adhesivos en la granulación de alimentos para animales. Por las propiedades de dispersión y adhesión que presentan los lignosulfonatos y por su contenido de azúcares, poseen valor energético, especialmente para rumiantes (Herrick y Hergert, 1977).

Dolenko y Clarke (1978) reportan la preparación de un adhesivo a prueba de agua, a base de lignina Kraft y resina fenolformaldehído, hacen notar que tiene un futuro muy prometedor en la estabilización de madera y sus subproductos.

Shen (1974) y Forss y Fuhrmann (1979) informan la producción de un adhesivo a partir de lignosulfonatos de alto peso molecular, aislados de licor sulfítico agotado, por ultrafiltración: en co-polimerización con resina fenolformaldehído. El adhesivo es resistente al agua, tiene menor costo que las resinas derivadas del petróleo y puede aplicarse en la fabricación de madera contrachapada y aglomerados del tipo novopan y fibracel.

### 5.2.2 Como Antioxidante y Anticorrosivo

Braddon y Falkehag (1973) citados por Falkehag (1975) indican que las ligninas modificadas pueden ser utilizadas como estabilizadores atmosféricos para elastómeros. Por su estructura la lignina posee efectos antioxidantes, los cuales se incrementan cuando se aplica lignina acompañada de otro antioxidante.

Drew et al. (1978) señalan el uso de estas ligninas como agentes de recubrimiento para controlar la corrosión de superficies metálicas.

### 5.2.3 Como Dispersante

Pearl (1967), Herrick y Hergert (1977) y Sjostrom (1981) mencionan que por sus propiedades iónicas y quelatantes, las ligninas modificadas se usan como dispersantes en la fabricación y aplicación de colorantes en la industria textil, donde distribuyen uniformemente los colorantes; de cemento Portland, donde disminuyen la cantidad de agua necesaria para hacer manejable la mezcla y se obtiene un producto menos denso, menos permeable y más fuerte. En la industria cerámica, incrementan la fluidez de las arcillas y yeso, y la resistencia de los productos finales como ladrillos, tejas, refractarios, artículos de alfarería y porcelana, etc.

Varios autores, entre ellos Browning (1975), Falkehag (1975), Pearl (1967), Herrick y Hergert (1977) y Glasser (1980), reportan la aplicación de los lignosulfonatos como aditivos para fluidos de perforación, donde controlan la fluidez de los mismos. Y también como aditivos para goma, v.gr. fabricación de llantas de goma, donde Falkehag (1975) considera que pueden usarse lignosulfonatos en lugar de negro de humo.

Otra aplicación de los lignosulfonatos es como estabilizante de las emulsiones de agua y aceite (Falkehag, 1975).

#### 5.2.4 Como Quelatante

Pearl (1967) cita como aplicaciones principales de las ligninas modificadas, la utilización de las mismas en:

i) Remoción de proteínas contaminantes de los efluentes de las fábricas procesadoras de alimentos, dado que los grupos funcionales sulfónicos de los lignosulfonatos forman complejos insolubles con las proteínas. En base a esto también se utiliza en curtiduría para teñir pieles, aunque se obtienen pieles de menor calidad; pero si se aplican lignosulfonatos combinados con colorantes vegetales se pueden obtener pieles de calidad semejante a las tratadas con puro colorante vegetal, con la ventaja de que éste es más caro que los lignosulfonatos.

ii) Los lignosulfonatos se complejan con iones metálicos como  $Fe^{+++}$ ,  $Cu^{++}$ ,  $Sn^{++}$ ,  $Co$ ,  $Mn$ ,  $Ni$ ,  $Ag$ ,  $Sn^{4+}$ ,  $Zn$ , etc., por tanto pueden ser usados como mejoradores del crecimiento de las plantas, ya que controlan la disponibilidad de oligoelementos indeseables y atenúan sus efectos tóxicos. También son usados para prevenir reacciones indeseables como precipitaciones, decoloraciones, v.gr. los lignosulfonatos previenen la eflorescencia del sulfato de calcio sobre la estructura de los cuerpos de cerámica debido a que se quelatan con el calcio, señala Browning (1975).

Allan et al. (1971) reportan un método para elaborar pesticidas de liberación controlada, que son combinaciones de pesticidas con desechos sólidos de madera, tales como aserrín, corteza y lignina Kraft. Señalan que las ventajas que presenta el producto obtenido son:

a) Se descompone lentamente por lo que la actividad del pesticida es prolongada y se puede controlar la aplicación del pesticida.

b) No es lixiviable, por lo que el riesgo de contaminación para arroyos y ríos es disminuido.

c) Tiene gran aplicación agrícola y forestal.

Cuadro 10. Procesos a través de los que se obtienen compuestos de bajo peso molecular a partir de lignina (Drew et al., 1978).

Proceso	Productos
Hidrogenación e Hidrocracking	Fenol, Cresol, fenoles monosubstituidos.
Descomposición térmica o destilación seca	ácido acético, fenoles monosubstituidos, acetileno, etileno, metano, fenol, monóxido de carbono, carbón de hulla, metanol, etc.
Fusión alcalina	ácidos fenólicos, catecol.
Degradación oxidativa	Vanilina
Otros	Dimetil sulfuro, Metil mercaptano

Flaig (1973) preparó un fertilizante nitrogenado de liberación lenta, a partir de lignina, oxígeno y  $\text{NH}_3$ , lo denomina N-Lignina, señalando que con la producción de este fertilizante se consume material de desecho y por ende habrá mayor higiene ambiental, otras ventajas que tiene N-Lignina son:

a) Bajo ciertas condiciones se obtienen sustancias metabólicamente activas que incrementan las cosechas y la resistencia de las plantas a sequías y heladas.

b) En suelos donde existen problemas de erosión, en un experimento realizado en macetas, N-Lignina incrementa el contenido de carbono en un 10% y de nitrógeno en un 60% aproximadamente.

c) En suelos de bajo contenido de fosfatos disponibles, incrementa la disponibilidad en un 10% o más

d) A pesar de que es soluble en agua, el producto no es lixiviable por la lluvia como los fertilizantes nitrogenados minerales, comúnmente usados, porque está constituido en un 50% por sustancias no dializables de alto peso molecular.

### 5.3 Producción de Compuestos de Bajo Peso Molecular

Se han reportado gran cantidad de trabajos en los que utilizando diversos procedimientos se pueden obtener compuestos de bajo peso molecular, en el cuadro 10 se enlistan algunos de esos procesos, de manera representativa.

Drew et al. (1978) consideran que por restricciones técnicas y económicas, no se ha desarrollado la producción comercial de compuestos como monóxido de carbono, metano, etileno, acetileno, fenol y catecol.

Analizando la aplicación que pudieran tener los compuestos obtenidos a partir de lignina, tenemos:

a) Vanilina y compuestos relacionados:

Por oxidación en medio alcalino (Brauns, 1952; Brauns y Brauns, 1960; - Pearl, 1967; Hedges, 1975; Herrick y Hergert, 1977) la lignina es degradada a diversos compuestos aromáticos, siendo los más abundantes: vanilina, ácido vanílico, acetovanilona, siringaldehído y p-hidroxibenzaldehído (ver figura 19).

La vanilina es ampliamente usada en la industria alimenticia como saborizante artificial (Pearl, 1967). Los compuestos derivados de la vanilina y sus aplicaciones se observan en el cuadro 11.

b) Dimetil sulfuro, Dimetil sulfoxido y Metil mercaptano

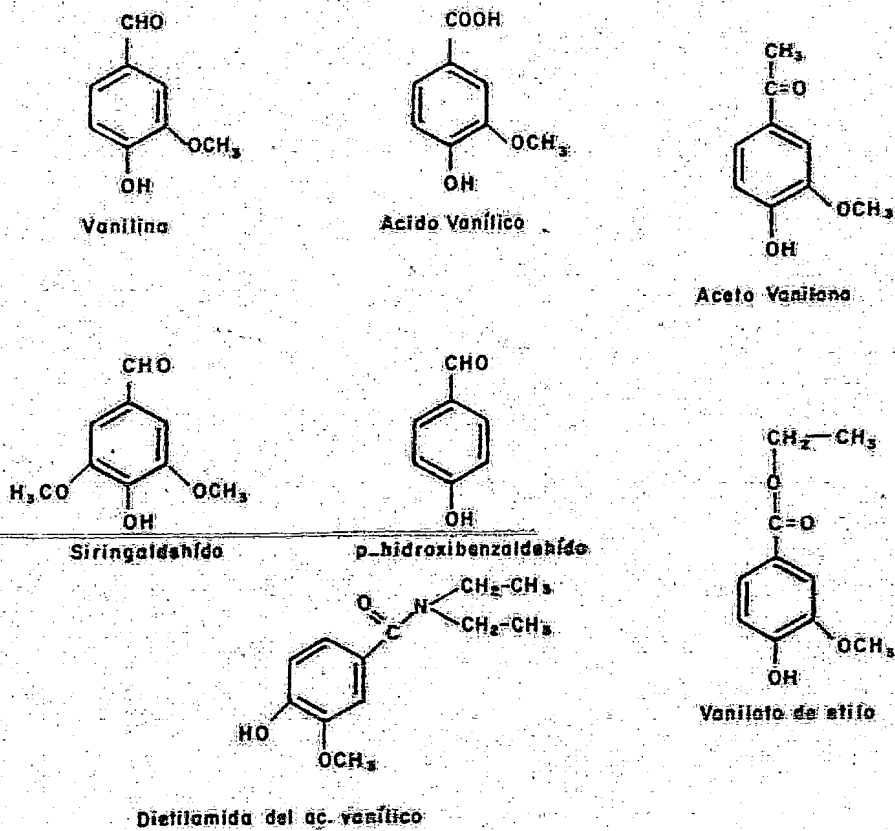


Figura 19. Estructuras químicas de vanilina y algunos de sus compuestos derivados.

Cuadro 11. Aplicaciones de algunos compuestos derivados de vainilina

Compuesto	Aplicaciones	Referencia
ácido vainílico	Precursor en la síntesis de poliésteres de uso textil	Bock y Anderson (1955) citados por Herrick y Hergert (1977).
vainilato de etilo	Conservador de alimentos, fungicida, aditivo para bronceadores.	Pearl (1967)
dietilamida del ácido vainílico	Reconstituyente para controlar enfermedades respiratorias y de presión sanguínea.	Herrick y Hergert (1977)

Enkvist et al. (1962) y Clark y Green (1968) desarrollaron un proceso a través del cual la lignina calentada a altas temperaturas (250-290°C) en presencia de NaOH y Na<sub>2</sub>S es convertida a metilmercaptano y dimetilsulfuro. A partir de dimetilsulfuro purificado, Hearon et al. (1962) obtienen dimetilsulfóxido por oxidación del primero con tetroxido de nitrógeno (N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) en presencia de oxígeno. Las estructuras químicas de estos compuestos son proporcionadas en la figura 20.

Estos compuestos son usados como aromatizantes, v.gr. para proporcionar al gas natural un olor específico, también como solventes de ciertas sales inorgánicas y de intervenir en algunas síntesis orgánicas. El dimetilsulfóxido además es usado como solvente en la manufactura de fibras sintéticas (Herrick y Hergert, 1977)

#### c) Fenoles

Goldstein (1975a) resume en un cuadro sinóptico los procesos representativos reportados, por medio de los que se obtienen fenoles a partir de lignina, haciendo hincapié en que aunque son numerosos los procedimientos reportados, no se ha desarrollado uno que sea comercialmente redituable debido a que comúnmente se obtiene una mezcla de diversos fenoles sustituidos, mismos que proporciona en otro cuadro (Clark y Green, 1968; Vorhez y Schweers, 1975; Enkvist et al., 1975).

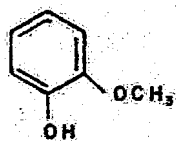
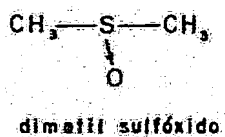
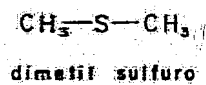
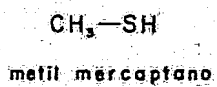
Lindberg et al. (1975) y Goldstein (1975b) reportan que los fenoles obtenidos a partir de lignina pueden ser usados en la fabricación de polímeros termoestables y termoplásticos, tal como son aplicados los fenoles que se obtienen de la industria petroquímica y presentan ventajas semejantes.

#### d) Guayacol, Catecol y ácido Protocatequínico

Por pirólisis (destilación seca) se obtienen lignoles, siendo los principales: guayacol y 4-metil guayacol (figura 20), los cuales son comercialmente usados como mejoradores de pinturas y resinas para barnizar. Por fusión alcalina se obtiene catecol y ácido protocatequínico, éste último tiene uso potencial en la producción de poliésteres (Herrick y Hergert, 1977).

### 5.3.1 Indicadores Geoquímicos

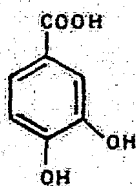
Por oxidación de lignina con óxido cúprico se obtienen vanilina, siringaldehído y p-hidroxibenzaldehído, estos compuestos se encuentran única y abundantemente en plantas terrestres, por lo que Hedges (1975) los reporta como útiles indicadores en la detección de la materia orgánica de origen terrestre que se encuentre depositada en sedimentos marinos.



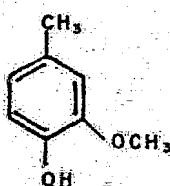
guaiacol



fenol



ac. protocatequínico



4-metil guaiacol

Figura 20. Estructura química de algunos compuestos derivados de lignina.



## 6. LITERATURA CITADA

- Adams, G.A. y Ledingham, G.A. 1942. Biological decomposition of chemical lignin. I. Sulfite waste liquor. Can. J. Res. C 20, 1
- Adler, E. 1977. Lignin chemistry: past, present and future. Wood Sci. Technol. 11, 169
- Akin, D.E. 1980. Attack on lignified grass cells walls by a facultatively anaerobic bacterium. Appl. Environ. Microbiol. 40 (4) 809.
- Allan, G.C., Chopra, C.S., Neogi, A.N. y Wilkins, R.M. 1971. Controlled release pesticides. II. The synthesis of herbicide-forest solid waste combinations. Tappi 54 (8), 1293
- Ander, P. y Eriksson, K.E. 1977. Selective degradation of wood components by white rot fungi. Physiol. Plant. 41, 239
- Ander, P. y Eriksson, K.E. 1978. Lignin degradation and utilization by microorganisms. Prog. Ind. Microbiol. 14, 1
- Ander, P., Hatakka, A. y Eriksson, K.E. 1981. Degradation of lignin-related substances by Sporotrichum pulverulentum. En: Kirk, T.K., Higuchi, T. y Chang, H. (eds). Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry and Potential Applications. CRC Press, Boca Raton, Fl. Vol. II, 1
- Antal, S.P. y Crawford, D.L. 1981. Degradation of softwood, hardwood and grass lignocelluloses by two Streptomyces strains. Appl. Environ. Microbiol. 42 (2), 378
- Ban, S., Glanser-Soljan, M. y Smailagic, M. 1979. Rapid biodegradation of calcium lignosulfonate by means of a mixed culture of microorganisms. Biotechnol. Bioeng. 21, 1917
- Bellamy, W.D. 1974. Single cell protein from cellulosic wastes. Biotechnol. Bioeng. 16, 569
- Bilton, R.F. y Cain, R.B. 1968. The metabolism of aromatic acids by microorganisms. A reassessment of the role of o-benzoquinone as a product of protocatechuate metabolism by fungi. Biochem. J. 108, 829

- Bjorkman, A. 1954. Isolation of lignin from finely divided wood with neutral solvents. Nature 174, 1057
- Blanchette, R.A. y Shaw, C.G. 1978. Associations among bacteria, yeasts and basidiomycetes during wood decay. Phytopathol. 68, 631
- Brauns, F.E. 1939. Native lignin. I. Its isolation and methylation. J. Am. Chem. Soc. 61, 2120
- Brauns, F.E. 1952. The Chemistry of Lignin. Academic Press, New York, N.Y.
- Brauns, F.E. y Brauns, D.A. 1960. The Chemistry of Lignin: Supplement Volume. Academic Press, New York, N.Y.
- Brown, S.A. 1961. Chemistry of lignification. Science 134, 305
- Brown, S.A. 1966. Lignins. Ann. Rev. Plant. Physiol. 17, 223
- Browning, W.C. 1975. The lignosulfonate challenge. Appl. Polymer Symp. 28, 109
- Cañ, R.B., Bilton, R.F. y Darrah, J.A. 1968. The metabolism of aromatic acids by microorganisms. Metabolic pathways in the fungi. Biochem. J. 108, 797
- Callihan, C.D., Irwin, G.H., Chemner, I.E. y Hargrove, O.W. 1975. Proteins from waste cellulose. Appl. Polymer Symp. 28, 189
- Cann, E.L. y Towers, G.H.N. 1973. Phenylalanine ammonia-lyase. Phytochem. 12, 189.
- Cartwright, N.J. y Smith, A.R.W. 1967. Bacterial attack on phenolic ethers. - An enzyme system demethylating vanillic acid. Biochem J. 102, 826
- Church, D.C. 1974. Fisiología Digestiva y Nutrición de los Rumiantes. Vol. I. Fisiología Digestiva. Acribia, España.
- Clark, I.T. y Green, J. 1968. Production of phenols by cooking Kraft Lignin in alkaline solutions. Tappi 51, 44
- Cooling, E.B. 1961. Comparative biochemistry of decay of sweet-gum sapwood by white-rot and brown-rot fungi. USDA Technical Bulletin 1258.

- Cowling, E.S. y Kirk, T.K. 1976. Properties of cellulose and lignocellulosic materials as substrates for enzymatic conversion processes. Biotechnol. Bioeng. 6, 95
- Crawford, D.L. y Crawford, R.L. 1976. Microbial degradation of lignocellulose: the lignin component. Appl. Environ. Microbiol. 31, 714
- Crawford, D.L., Crawford, R.L. y Pometto, A.L. 1977. Preparation of specifically labeled  $^{14}\text{C}$ -[lignin]- and  $^{14}\text{C}$ -[glucan]-lignocelluloses and their decomposition by the microflora of soil. Appl. Environ. Microbiol. 33, 1247
- Crawford, D.L. y Sutherland, J. 1981. Isolation and characterization of lignocellulose-decomposing actinomycetes. En: Kirk, T.K., Higuchi, T. y Chang, H. (eds). Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry and Potential Applications. CRC Press, Boca Raton, Fl. Vol. II, 95
- Crawford, R.L. 1981. Lignin Biodegradation and Transformation. Wiley-Interscience. New York, N.Y.
- Crawford, R.L. y Crawford, D.L. 1978. Radioisotopic methods for the study of lignin biodegradation. Dev. Ind. Microbiol. 19, 35
- Crawford, R.L., Kirk, J.K. y McCoy, E. 1975. Dissimilation of the lignin model compound veratryl glycerol- $\beta$ -(*o*-methoxyphenyl) ether by Pseudomonas acidovorans: Initial transformations. Can. J. Microbiol. 21, 577
- Crawford, R.L., Robinson, L.E. y Cheh, A. 1981a.  $^{14}\text{C}$ -labeled lignins as substrates for the study of lignin biodegradation and transformation. En: Kirk, T.K., Higuchi, T. y Chang, H. (eds). Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry and Potential Applications. CRC Press, Boca Raton Fl. Vol. I, 61
- Crawford, R.L., Robinson, L.E. y Foster, R.D. 1981b. Polyguaiacol: A useful model polymer for lignin biodegradation research. Appl. Environ. Microbiol. 41 (1), 1112
- Day, W.C., Pelczar, M.J. y Gottlieb, S. 1949. The biological degradation of -

Lignin. I. Utilization of lignin by fungi. Arch. Biochem. 23, 360

- Departamento de Agricultura de los Estados Unidos Americanos. 1974. Manual de Conservación de Suelos. Limusa. México
- Dolenko, A.J. y Clarke, H.R. 1978. Resin binders from Kraft Lignin. For. Prod J. 28, 41
- Drew, S.G., Kadam, K.L., Shoemaker, S.P., Glasser, W.G. y Hall, P. 1978. Chemical feedstocks and fuels from lignin. En: Nystrom, J.M. y Barnett, S.M. (eds). Biochemical Engineering: Renewable sources of Energy and Chemical Feedstocks. AIChE Symposium Series, Vol. 74 [151], 21
- Egfland, H.J. 1977. Modified procedure to determine acid-insoluble lignin in wood and pulp. Tappi 60, 143
- Enkvist, T. 1975. Phenolics and other organic chemicals from Kraft black liquors by disproportionation and cracking reactions. - Appl. Polymer Symp. 28, 285
- Enkvist, T., Turunen, J. y Ashorn, T. 1962. The demethylation and degradation of lignin of spent liquors by heating with alkaline reagents. Tappi 45 [2], 128
- Erickson, H. y Miksche, G.E. 1974. On the occurrence of lignin or polyphenols in some mosses and liverworts. Phytochem. 13, 2295
- Eriksson, K.E., Grunewald, A. y Vallander, L. 1980. Studies of growth conditions for three white-rot fungi and their cellulase mutants. Biotechnol. Bioeng. 22, 363
- Eriksson, K.E., y Vallander, L. 1981. Biomechanical pulping. En: Kirk, T.K., Higuchi, T. y Chang, H. (eds). Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry and Potential Applications. CRC Press, Boca Raton, Fl. Vol. II, 213
- Esllyn, W.E., Kirk, T.K. y Egfland, H.J. 1975. Changes in the chemical composition of wood caused by six soft-rot fungi. Phytopathol. 65, 473
- Evans, W.C. 1977. Biochemistry of the bacterial catabolism of aromatic compounds in anaerobic environments. Nature 270, 17

- Falkehag, S.I. 1975. Lignin in materials. Appl. Polymer Symp. 28, 247
- Federle, T.W. y Vestal, J.R. 1980. Lignocellulose mineralization by arctic lake sediments in response to nutrient manipulation. - Appl. Environ. Microbiol. 40 (1), 32
- Feist, W.C., Eslyn, W.E., Springer, E.L. y Hajny, G.J. 1971. Determining loss of wood substance after fungal attack. A comparison of two methods. Tappi 54 (8), 1271
- Flaig, W. 1973. Slow releasing nitrogen fertiliser from the waste product lignin sulphonates. Chem. Ind. 16, 553
- Floss, H.G. 1979. The shikimate pathway, Rec. Adv. Phytochem. 12, 59
- Fors, K.G. y Fuhrmann, A. 1979. Finnish, plywood, particleboard and fiberboard made with a lignin-base adhesive. For. Prod. J 29 (7), 39
- Freudenberg, K. 1965. Lignin: Its constitution and formation from hydroxycinnamyl alcohols. Science 148, 595
- Freudenberg, K. y Neish, A.C. 1968. Constitution and Biosynthesis of Lignin. Springer-Verlag. New York, N.Y.
- Fukuzumi, T., Yakatuka, H. y Minami, K. 1969. Enzymic degradation of lignin. V The effect of NADH on the enzymic cleavage of aryl-alkyl ether bond in veratryl glycerol- $\beta$ -guaiacyl ether as lignin model compound. Arch. Biochem. Biophys. 129, 396.
- Gibson, D.T. 1968. Microbial degradation of aromatic compounds. Science 161, 1093
- Glasser, W.G. 1980. Lignin. En: Casey, J.P. (ed). Pulp and Paper Chemistry and Chemical Technology. Wiley-Interscience. New York, N.Y. Vol. I, 39
- Glennie, D.W. y McCarthy, J.L. 1974. Lignins. En: Libby, C.E. (ed). Ciencia y Tecnología sobre Pulpa y Papel. CECSA, México. Tomo I 113
- Gold, M., Cheng, T., Krisnangura, K., Mayfield, M. y Smith, L. 1981. Genetic and biochemical studies on P. chrysosporium and their relation to lignin degradation. En: Kirk, T.K., Hig-

- chi, T. y Chang, H. (eds). *Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry and Potential Applications*. - CRC Press, Boca Raton, Fl. Vol. II, 65
- Goldstein, I.S. 1975a. Perspectives on production of phenols and phenolic acids from lignin and bark. *Appl. Polymer Symp.* 28, - 259
- Goldstein, I.S. 1975b. Potential for converting wood into plastics. *Science* - 189, 847
- Gottlieb, S., Day, W.C. y Pelczar, M.J., Jr. 1950. The biological degradation of lignin. II. The adaptation of white-rot fungi to growth on lignin media. *Phytopath.* 40, 926
- Gradziel, K., Haider, K., Kochmanska, J., Malarczyk, E. y Trojanowski, J. 1978. Bacterial decomposition of synthetic  $^{14}\text{C}$ -labeled lignin and monomer derivatives. *Acta Microbiol. Pol.* 27, 103
- Gross, G.G. 1977. Biosynthesis of lignin and related monomers. *Rec. Adv. Phytochem.* 11, 141
- Gross, G.G. 1979. Recent advances in the chemistry and biochemistry of lignin. *Rec. Adv. Phytochem.* 12, 177
- Hackett, W.F., Connors, W.J., Kirk, T.K. y Zeikus, J.G. 1977. Microbial decomposition of synthetic  $^{14}\text{C}$ -labeled lignins in nature: Lignin biodegradation in a variety of natural materials. *Appl. Environ. Microbiol.* 33 (1), 43
- Haider, K. y Kladiwko, E.J. 1979. Transformations of ( $^{14}\text{C}$ ) and ( $^{35}\text{S}$ ) labeled lignosulfonates during soil incubation. *Soil Biol. Biochem.* 12, 275.
- Haider, K. y Martin, J.P. 1975. Decomposition of specifically carbon-14 labeled benzoic and cinnamic acid derivatives in soil. -- *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 39, 657
- Haider, K., Martin, J.P. y Rietz, E. 1977. Decomposition in soil of  $^{14}\text{C}$ -labeled coumaryl alcohols: free and linked into dehydropolymer and plant lignins and model humic acids. *Soil - Sci. Soc. Amer. Proc.* 41, 556

- Haider, K. y Trojanowski, J. 1975. Decomposition of specifically  $^{14}\text{C}$ -labelled phenols and dehydropolymers of coniferyl alcohol as models for lignin degradation by soft- and white-rot fungi. Arch. Microbiol. 105, 33
- Haider, K. y Trojanowski, J. 1981. A comparison of the degradation of  $^{14}\text{C}$ -labeled DHP and corn stalk lignins by micro- and macro fungi and bacteria. En: Kirk, T.K., Higuchi, T. y Chang, H. (eds). Lignin Biodegradation: Microbiology Chemistry and Potential Applications. CRC Press, Boca Raton, Fl. Vol. I, 111
- Haider, K., Trojanowski, J. y Sundman, V. 1978. Screening for lignin-degrading bacteria by means of  $^{14}\text{C}$ -labelled lignins. Arch. Microbiol. 119, 103
- Hajny, G.J., Gardner, C.H. y Ritter, G.J. 1951. Thermophilic fermentation of cellulose and lignocellulose materials. Ind. Eng. Chem. 43, 1348
- Hall, P., Glasser, W. y Drew, S. 1981. Enzymatic transformations of lignin. En: Kirk, T.K., Higuchi, T. y Chang, H. (eds). Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry and Potential Applications. CRC Press, Boca Raton, Fl. Vol. II, 33
- Hanson, K.R. y Havir, E.A. 1972. Mechanism and properties of phenylalanine ammonia-lyase from higher plants. Rec. Adv. Phytochem. 4, 46
- Hanson, K.R. y Havir, E.A. 1979. An introduction to the enzymology of phenylpropanoid biosynthesis. Rec. Adv. Phytochem. 12, 91
- Harkin, J.M. 1969. Methods of attacking the problem of lignin structure. Rec. Adv. Phytochem. 2, 35
- Harkin, J.M., Crawford, D.L. y McCoy, E. 1974. Bacterial protein from pulps -- and paper mill sludge. Tappi 57 (3), 131
- Harkin, J.M. y Obst, J.R. 1973. Lignification in trees: Indication of exclusive peroxidase participation. Science 180, 296
- Harris, E.E. 1953. A lignin-carbohydrate bond in wood. Tappi 36, 402

- Harris, R.E., D'Ianni, J. y Adkins, H. 1938. Reaction of hardwood lignin with hydrogen. J. Am. Chem. Soc. 60, 1467
- Hashimoto, A.G., Chen, Y.R. y Prion, R.L. 1979. Methane and protein production from animal feedlot wastes. J. Soil Water Conserv. -- Ene/Feb, 16
- Hearon, W.H., Mac Gregor, W.S. y Goheen, D.W. 1962. Sulfur chemicals from lignin. Tappi 45 (1), 28A
- Hedges, I.J. 1975. Lignin compounds as indicators of terrestrial organic matter marine sediments. Disertación para obtener el grado de Doctor of Philosophy. University of Texas, Austin, Texas.
- Herrick, F.W. y Hergert, H.L. 1977. Utilization of chemicals from wood: Retrospect and prospect. Rec. Adv. Phytochem. 11, 443
- Hess, D. 1975. Plant Physiology. Springer-Verlag. New York. N.Y.
- Higuchi, T. 1971. Formation and biological degradation of lignins. Adv. Enzymol. 34, 207
- Higuchi, T. 1981a. Lignin structure and morphological distribution in plant cell walls. En: Kirk, T.K., Higuchi, T. y Chang, H. (eds). Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry and Potential Applications. CRC Press, Boca Raton, FL Vol. I, 1
- Higuchi, T. 1981b. Microbial degradation of dilignols as lignin models. En: Kirk, T.K., Higuchi, T. y Chang, H. (eds). Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry and Potential Applications. CRC Press, Boca Raton, FL. Vol. I, 177
- Higuchi, T. 1981c. Biodegradation of lignin. Wood Research. 67, 47
- Higuchi, T., Shimada, M., Nakatsubo, F. y Tanahashi, M. 1977. Differences in biosynthesis of guaiacyl and syringyl lignins in wood. Wood Sci. Technol. 11, 153
- Hurst, H.H. y Burges, N.A. 1967. Lignin and humic acids. En: Mc Laren, A.D. y Peterson, G.H. (eds). Soil Biochemistry. Marcel Dekker. New York. Vol. I, 260



- Ishihara, T. 1981. The role of lacase in lignin biodegradation. En: Kirk, T. K., Higuchi, T. y Chang, H. (eds). *Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry and Potential Applications*. CRC Press, Boca Raton, Fl. Vol. II, 17
- Ishikawa, H., Schubert, W.J. y Nord, F.F. 1963a. Investigations on lignins - and lignification. XXVII. The enzymic degradation of softwood lignin by white-rot fungi. Arch. Biochem. Biophys. 100, 130
- Ishikawa, H., Schubert, W.J. y Nord, F.F. 1963b. Investigations on lignins - and lignification. XXVIII. The degradation by Polyporus versicolor and Fomes fomentarius of aromatic compounds structurally related to softwood lignins. -- Arch. Biochem. Biophys. 100, 140
- Iwahara, S. 1981- Microbial degradation of DHP. En: Kirk, T.K., Higuchi, T. y Chang, H. (eds). *Lignin Biodegradation: Microbiology Chemistry and Potential Applications*. CRC Press, Boca Raton, Fl. Vol. I, 171
- Jeffries, T.W., Choi, S. y Kirk, T.K. 1981. Nutritional regulation of lignin degradation by Phanerochaete chrysosporium. Appl. Environ. Microbiol. 42 (2), 290
- Johnson, D.B., Moore, W.E. y Zenk, L.C. 1961. The spectrophotometric determination of lignin in small samples. Tappi 44 (11), 793
- Kaplan, D.L. y Harstenstein, R. 1980. Decomposition of lignins by microorganisms. Soil Biochem. 12, 65
- Kawahara, H. 1981. Degradation of lignin-related compounds by several Pseudomonas. En: Kirk, T.K., Higuchi, T. y Chang, H. (eds) *Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry and Potential Applications*. CRC Press, Boca Raton, Fl. Vol. II, 103
- Kirk, T.K. 1971. Effects of microorganisms on lignin. Ann. Rev. Phytopathol. 9, 185
- Kirk, T.K. 1973. Polysaccharide integrity as related to the degradation of lignin in wood by white-rot fungi. Phytopathol. 63, 1504

- Kirk, T.K., 1981. Studies on the physiology of lignin metabolism by white-rot fungi. En: Kirk, T.K., Higuchi, T. y Chang, H. (eds) Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry and Potential Applications. CRC Press, Boca Raton, FL. - Vol. II, 51
- Kirk, T.K. y Adler, E. 1970. Methoxyl-deficient structural elements in lignin of sweetgum decayed by a brown-rot fungus. Acta Chem Scand. 24, 3379
- Kirk, T.K. y Highley, T.L. 1973. Quantitative changes in structural components of conifer woods during wood decay by white- and brown-rot fungi. Phytopathol. 63, 1338
- Kirk, T.K., Connors, W.J., Blean, R.D., Hackett, W.F. y Zeikus, J.G. 1975. -- Preparation and microbial decomposition of synthetic ( $^{14}\text{C}$ )-lignins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 (7), - 2515
- Kirk, T.K., Connors, W.J. y Zeikus, J.G. 1976. Requirement for a growth substrate during lignin decomposition by two wood-rotting fungi. Appl. Environ. Microbiol. 32, 192
- Kirk, T.K., Connors, W.J. y Zeikus, J.G. 1977. Advances in understanding the microbiological degradation of lignin. Rec. Adv. Phytochem. 11, 369
- Koukol, J. y Conn, E.E. 1961. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of the phenyl alanine deaminase of Hordeum vulgare. J. Biol. Chem. 236, 2692
- Kr̥snanghura, K. y Gold, M.H. 1979. Peroxidase catalysed oxidative decarboxylation of vanillic acid to methoxy-p-hydroquinone. - Phytochem. 18, 2019
- Kuroda, H. y Higuchi, T. 1976. Characterization and biosynthesis of mistletoe lignin. Phytochem. 15, 1511
- Kuzakura, M. 1981. Metabolism of lignin-related compounds by bacteria. En: -- Kirk, T.K., Higuchi, T. y Chang, H. (eds). Lignin -- Biodegradation: Microbiology, Chemistry and Potential Applications. CRC Press, Boca Raton, FL. Vol. II, 127

- Ledingham, G.A. y Adams, G.A. 1942. Biological decomposition of chemical lignins. II. Studies on the decomposition of Ca-lignosulfonate by wood destroying and soil fungi. Can. J. Res C 20, 13
- † Lindberg, J.A., Era, V.A. y Jauhainen, T.P. 1975. Lignin as a raw material -- for synthetic polymers. Appl. Polymer Symp. 28, 269
- Lobarzewski, J. 1981. A comparison of inductive influence of syringic acid and wastes containing lignosulfonic acids on peroxidase - activity and its synthesis in Trametes versicolor cultures. Acta Microbiol. Pol. 30 (2), 145
- Lundquist, K. y Kirk, T.K. 1980. Fractionation-purification of an industrial - lignin. Tappi 63, 80
- Maccubbin, A.E. y Hodson, R.E. 1980. Mineralization of detrital lignocelluloses by salt marsh sediment microflora. Appl. Environ. Microbiol. 40 (4), 735
- Mandels, M., Kostick, J. y Darizek, R. 1971. The use of adsorbed cellulose in the conversion of cellulose to glucose. J. Polymer - Sci. C 36, 445
- Mangenot, F. y Reisinger, O. 1972. Lignolytic activity in soils, Symp. Biol. - Hung. 11, 147
- Markin, J.M. 1969. Lignin and its uses. USDA Forest Service Research. Note FPL 0206
- Mc Donald, P., Edward, R.A. y Greenhalg, J.F.D. 1979. Nutrición Animal. Acti-  
bía, España.
- Meshitsuka, G. y Nakano, J. 1973. Effect of metal ion on color of lignosulfonate and thioglignin. Tappi 56 (7), 105
- Miesche, G.E. y Yasuda, S. 1978. Lignin of "giant" mosses and some related species. Phytochem. 17, 503
- Neish, A.C. 1961. Formation of m- and p-coumaric acids by enzymatic deamination of the corresponding isomers of tyrosine. Phytochem. 1, 1
- Noguchi, A., Shómada, M. y Higuchi, T. 1980. Studies on lignin biodegradation.

I. Possible role of non-specific oxidation of lignin by laccase. Hözforschung 34, 86

- Norris, D.M. 1980. Degradation of  $^{14}\text{C}$ -labeled lignins and  $^{14}\text{C}$ -labeled aromatic acids by *Fusarium solani*. Appl. Environ. Microbiol. 40 (2), 376
- Oglesby, R.T., Christman, R.F. y Driver, C.H. 1967. The biotransformation of lignin to humus: Facts and postulates. Adv. Appl. Microbiol. 9, 171
- Pearl, I.A. 1967. The Chemistry of Lignin. Marcel Dekker, Inc. New York, N.Y.
- Pearl, I.A. y Busche, L.R. 1960a. Studies on the chemistry of aspenwood. XI. - The Klason lignin determination as applied to aspenwood with special reference to acid soluble lignin. - Tappi 43, 961
- Pearl, I.A. y Busche, L.R. 1960b. Studies on the chemistry of aspenwood. XII. Studies on the preparation of Milled Wood Lignin from quaking aspenwood. Tappi 43, 970
- Pelczar, M.J., Jr., Gottlieb, S. y Day, W.C. 1950. Growth of *Polyporus versicolor* in a medium with lignin as the sole carbon source. Arch. Biochem. 25, 449
- Pew, J.C. y Connors, W.J. 1971. Color of coniferous lignin. Tappi 54 (2), 245
- Pew, J.C. y Weyna, P. 1962. Fine grinding, enzyme digestion and the lignin-cellulose bond in wood. Tappi 45, 247
- Phelan, M.B., Crawford, D.L. y Pometto, A.L. 1979. Isolation of lignocellulose decomposing actinomycetes and degradation of specifically  $^{14}\text{C}$ -labeled lignocellulose by six selected *Streptomyces* strains. Can. J. Microbiol. 25, 1270
- Reid, I.D. 1979. The influence of nutrient balance on lignin degradation by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Can. J. Bot. 57 (19), 2050
- Reid, I.D. y Seifert, K.A. 1982. Effect of an atmosphere of oxygen on growth, respiration and lignin degradation by white-rot fungi. Can. J. Bot. 60 (3), 252

- Robbins, J.E., Arnold, M.T. y Lecher, S.L. 1975. Lignin production from cattle waste and delignification. Appl. Environ. Microbiol. 38, 175
- Rodwell, V.W. 1978. Biosíntesis de aminoácidos. En: Harper, H.A., Rodwell, V.W. y Mayes, P.A. (eds). Manual de Química Fisiológica. El Manual Moderno, S.A. México. p. 405
- Rosenberg, S. y Wilke, C.R. 1981. Lignin biodegradation and the production of ethyl alcohol from cellulose. En: Kirk, T.K., Higuchi, T. y Chang, H. (eds). Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry and Potential Applications. CRC Press, Boca Raton, Fl. Vol. II, 199
- Ruberiy, P.H. y Northcote, D.H. 1968. Site of phenylalanine-ammonia-lyase activity and synthesis of lignin during xylem differentiation. Nature 219, 1230
- Ruel, R. y Barnoud, F. 1981. Ultrastructural changes in the wall of spruce tracheids degraded by Sporotrichum pulverulentum. En: Kirk, T.K., Higuchi, T. y Chang, H. (eds). Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry and Potential Applications. CRC Press, Boca Raton, Fl. Vol. II, 225
- Sakakibara, A.D. 1977. Degradation products of protolignin and the structure of lignin. Rec. Adv. Phytochem. 11, 117
- Sarkanen, K.V. y Ludwig, C.H. 1971. Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions. Wiley-Interscience, New York.
- Schubert, W.J. y Nord, F.F. 1950. Investigations on lignin and lignification. II. The characterization of enzymatically liberated lignin. J. Amer. Chem. Soc. 72, 3835
- Schubert, W.J. y Nord, F.F. 1957. Lignification. Adv. Enzymol. 18, 349
- Schweers, W.H.H. y Vorher, W. 1977. Possibilities of an economic and non-polluting utilization of lignin. En: International Atomic Energy Agency. Proc. Int. Symp. Soil Organic Matter - Studies Vol. 2, 85
- Scott, W.W., Fred, E.B. y Peterson, W.H. 1930. Products of the thermophilic fermentation of cellulose. Ind. Eng. Chem. 22, 731

- Settliiff, E. y Eudy, W. 1981. Screening white-rot fungi for their capacity to delignify wood. En: Kirk, T.K., Higuchi, T. y Chang, H. (eds). Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry and Potential Applications. CRC Press, Boca Raton Fl., Vol. I, 135
- Shen, K.C. 1974. Modified powdered spent sulfite liquor as binders for exterior waferboard. För. Prod. J. 24 (2), 38
- Sjostrom, E. 1981. Wood Chemistry. Academic Press, New York, N.Y.
- Sorensen, H. 1962. Decomposition of lignin by soil bacteria and complex formation between autoxidised lignin and organic nitrogen compounds. J. Gen. Microbiol. 27, 21
- Stutzenberg, F.J. 1979. Degradation of cellulosic substances by Thermomonospora curvata. Biotechnol. Bioeng. 21, 909
- Toms, A. y Wood, J.M. 1970. The degradation of trans-ferulic acid by Pseudomonas acidovorans. Biochemistry 9, 337
- Trojanowski, J., Haider, K. y Sundman, V. 1977. Decomposition of <sup>14</sup>C-labelled lignin and phenols by a Nocardia sp. Arch. Microbiol 114, 149
- Vance, C.P., Kirk, T.K. y Sherwood, R.T. 1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. Ann. Rev. Phytopath. 18, 259
- Vorher, W. y Schweers, W.H.M. 1975. Utilization of Phenol lignin. Appl. Polymer Symp. 28, 277
- Wani, S.P. y Shinde, P.A. 1977. Studies on biological decomposition of wheat straw. I. Screening of wheat straw decomposing microorganisms in vitro. Plant and Soil 47, 13
- Wardrop, A.B. 1976. Lignification of the plant cell wall. Appl. Polymer Symp. 28, 1041
- Wicklow, D.T., Detroy, R.W. y Jessee, B.A. 1980. Decomposition of lignocellulose by Cyathus stercoreus de Toni NRRL 6473, a white-rot fungus from cattle dung. Appl. Environ. Microbiol. 40, 169
- Young, J.G. 1975. Biosynthesis of bacterial menaquinones. Menaquinone mutants

of *Escherichia coli*. Biochemistry 14 (2), 399

Zeikus, G. 1981. Fate of lignin and related aromatic substrates in anerobic - environments. En: *Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry and Potential Applications*. CRC Press Boca Raton, Fl. Vol. 1, 101

Zenk, M.H. 1979. Recent work on cinnamoyl Co A derivatives. Rec. Adv. Phyto--chem. 12, 139