

EFFECTO DE LA FUENTE DE NITRÓGENO EN LA PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA MANGANESO PEROXIDASA PRODUCIDA POR *PLEUROTUS OSTREATUS* Y DETERMINACIÓN DE SUS CONSTANTES CINÉTICAS

NITROGEN SOURCE EFFECT ON MANGANESE PEROXIDASE PRODUCTION FROM *PLEUROTUS OSTREATUS* AND KINETIC CONSTANTS DETERMINATION

Diana Morales Fonseca*
Mario Enrique Velásquez Lozano**

Recibido: 5 de diciembre de 2018
DOI: <https://doi.org/10.29097/2011-639X.227>

Aceptado: 6 de mayo de 2019

Resumen

La utilización de residuos lignocelulósicos para la producción de moléculas de interés, como azúcares o biocombustibles, también incluye la síntesis de complejos enzimáticos compuestos por oxidasas capaces de degradar, en ciertos casos, estructuras aromáticas y fenólicas de carácter contaminante. Este estudio evaluó la producción de manganeso peroxidasa (MnP) en una fermentación líquida sumergida por *Pleurotus ostreatus*, utilizando como sustrato la gramínea forrajera *Panicum maximum*. Los mayores niveles de actividad enzimática (528.54 U/L) fueron obtenidos a los doce días de incubación, empleando peptona como fuente de nitrógeno a una relación carbono/nitrógeno igual a diez. En los casos en los que la fermentación fue suplementada con fuentes de nitrógeno inorgánicas, la actividad enzimática fue más baja.

Palabras clave: manganeso peroxidasa, *Pleurotus ostreatus*, caracterización cinética, fermentación líquida sumergida, *Panicum maximum*.

Abstract

The use of lignocellulosic residues for the production of molecules of interest, such as sugars and biofuels, also includes the synthesis of enzymatic complexes composed by oxidases capable of degrading aromatic and phenolic structures of a pollution nature in certain cases. This study evaluated the production of manganese peroxidase (MnP) in a liquid fermentation submerged by *Pleurotus ostreatus* using as substrate a forage grass. The highest levels of enzymatic activity (528.54 U/L) were obtained after twelve days of incubation and having as a nitrogen source peptone, at a carbon/nitrogen ratio equal to 10. In the cases in which the fermentation was supplemented with inorganic nitrogen sources, the enzymatic activity was lower.

Keywords: manganese peroxidase, *Pleurotus ostreatus*, kinetic characterization, liquid submerged fermentation, *Panicum maximum*.

* Microbióloga, magíster en Ingeniería Química. Grupo de Investigación en Procesos de Separación no Convencionales (GPS), Departamento de Ingeniería Química, Fundación Universidad de América, Bogotá D. C., Colombia. ORCID: 0000-0002-5355-2891. diana.morales@profesores.uamerica.edu.co

**Ingeniero químico, magíster en Ingeniería Química, Ph.D. en Ingeniería. Grupo de Investigación Procesos Químicos y Bioquímicos, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D. C., Colombia. mevelasquezl@unal.edu.co

INTRODUCCIÓN

Hongos de la podredumbre blanca como *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Echinodontium taxodii*, *Trametes versicolor*, entre otros, son ampliamente conocidos por utilizar como sustratos la celulosa, la hemicelulosa y, preferentemente, la lignina presente en biomasa de origen vegetal (Baldrian, Valásková, Merhautová y Gabriel, 2005; Kirk y Farrel, 1987). Estos hongos pueden asimilar la lignina debido a que producen enzimas como lacasas, oxidasas y peroxidasas, las cuales realizan varias reacciones oxidativas y de rompimiento de compuestos fenólicos y aromáticos complejos que son requeridas en los procesos de delignificación (Karigar y Rao, 2011; Kirk y Farrel, 1987). Dentro de las peroxidasas extracelulares producidas por este tipo de hongos se encuentra la manganeso peroxidasa (MnP; EC.1.11.1.13); esta enzima tiene un alto potencial de uso en aplicaciones biotecnológicas, como degradación de biomasa (Baldrian et ál., 2005; Kong et ál., 2016; Liu et ál., 2019; Morales-Fonseca, 2014), tratamiento de aguas (Bilal y Asgher, 2015), decoloración de tintes para textiles (Bilal y Asgher, 2015), bioblanqueamiento de pulpa de papel (Sasaki Kajino, Sugiyama y Takahashi, 2001), bioremediación (Morales-Fonseca y Ruiz-Tovar, 2008), biotransformación y desintoxicación de compuestos aromáticos ambientalmente persistentes (Baborová, 2006; Ergun y Urek, 2017; Karigar y Rao, 2011) y química verde para la producción de compuestos químicos de alto valor a partir de lignina (Numir et ál., 2015; Quevedo-Hidalgo, Narvaez-Rincon, Pedroza-Rodriguez y Velásquez-Lozano, 2012).

El mecanismo por medio del cual la mayoría de los hongos de la podredumbre blanca inician la degradación de la lignina se activa cuando el nitrógeno, el carbono o el sulfuro empiezan a ser limitantes (Karigar y Rao., 2011; Kirk y Farrel, 1987; Stajic et ál., 2006). Por esto, en el estudio de la producción de enzimas como la MnP resulta importante analizar y encontrar la relación de estos nutrientes que lleva a la obtención de enzimas en mayor cantidad y con características (actividad, estabilidad, etc.) que permitan su uso a mayor escala en diferentes bioprocesos (Stajic et ál., 2006).

Igualmente, ante el potencial que presenta la MnP, toma relevancia el estudio y determinación de los parámetros cinéticos de la enzima ante la degradación de sustratos heterogéneos, como la biomasa lignocelulósica. De esta forma es posible comparar enzimas obtenidas a partir de diferentes fuentes utilizando varios sustratos y buscar alternativas para estabilizar y mejorar su actividad a través de su purificación (Asgher, Ramzan y Bilal, 2016; Baborová, 2006; Palma, Martinez, Lema y Martinez, 2000) o inmovilización (Bilal y Asgher, 2016; Chen, Shanjing, Zhang y Liang, 2010; Luan et ál., 2014; Mielgo et ál., 2003).

En este estudio se analiza el efecto de tres fuentes de nitrógeno y la relación carbono/nitrógeno en la producción de la enzima manganeso peroxidasa, por medio de fermentaciones sumergidas de un sustrato lignocelulósico (en este caso, *Panicum maximum* o pasto gigante) por *Pleurotus ostreatus*. Adicionalmente, se lleva a cabo la determinación de las constantes cinéticas de la reacción para evaluar la actividad enzimática de la MnP.

METODOLOGÍA

Tratamiento del sustrato lignocelulósico

El sustrato lignocelulósico escogido para este estudio fue la gramínea *Panicum maximum*, que corresponde a uno de los cultivos energéticos con mayor productividad de biomasa por área. Esta especie se caracteriza por ser un cultivo perenne y adaptabilidad a suelos ácidos y diferentes condiciones climáticas (Heaton et ál., 2008).

Las muestras recolectadas, proporcionadas por el centro de investigación La Libertad, instituto adscrito a Corpoica, corresponden a un periodo de corte de aproximadamente cinco meses, a una altitud de 184 m s. n. m., temperatura media anual de 27 °C y precipitación media anual de 2605 mm. El material fue secado a 60 °C durante 48 horas, para posteriormente ser molido para la obtención de partículas de 0.8-2.0 mm de longitud, aproximadamente.

Microorganismo-inóculo

La cepa de *Pleurotus ostreatus* pertenece al cepario del laboratorio de bioprocesos de la Universidad Jorge Tadeo Lozano. La generación de biomasa para la producción de enzimas se hizo por incubación en Erlenmeyers de 250ml, con un volumen de 62.5 ml de caldo salvado de trigo y 20% de inóculo (disco agar) a 30 ± 2 °C a 150 rpm durante 6 días (Morales-Fonseca, 2014). Seguidamente, la biomasa se tamizó para obtener una suspensión con tamaño de *pellets* homogéneo entre 3 a 5 mm.

Medio de producción suplementado con *Panicum maximum* al 5% p/v para la producción de enzimas

Como medio de producción de enzimas ligninolíticas, como la MnP, se estudió el medio Kirk modificado (Kirk y Farrel, 1987) utilizando una concentración de *Panicum maximum* de 5% p/v y una composición del medio líquido de glucosa ($C_6H_{12}O_6$ - 1 gL⁻¹), ácido succínico ($C_4H_6O_6$ - 2.34 gL⁻¹), tartrato de sodio ($(Na)_2C_4H_4O_6$ - 2.2 gL⁻¹), fosfato monoácido de potasio (K_2HPO_4 - 0.2 g L⁻¹), sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -0.05 gL⁻¹), cloruro de calcio dihidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$ -0.01 gL⁻¹), sulfato de manganeso (II) monohidratado ($MnSO_4 \cdot H_2O$ -0.076 gL⁻¹), sulfato de cobre (II) pentahidratado ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$ -0.004 g L⁻¹), *Panicum maximum* (50 gL⁻¹) y una fuente de nitrógeno a diferentes concentraciones. Los medios fueron esterilizados en autoclave a 121 °C, 15 lb durante 15 min.

Evaluación del efecto de distintas fuentes de nitrógeno y la relación carbono/nitrógeno (C/N) sobre la producción de MnP

En el medio Kirk modificado suplementado con biomasa de *Panicum maximum* al 5% p/v se evaluó el efecto de dos fuentes de nitrógeno inorgánicas: carbonato de amonio ($(NH_4)_2CO_3$) y sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$), y una fuente orgánica de nitrógeno: peptona (Elisashvili, Penninckx, Kachlishvili, Asatiani y Kvesitadze, 2006; Stajic et ál., 2006). El efecto de diferentes concentraciones de estos sustratos fue estudiado a través de la relación C/N del balance de elementos dentro del medio a un pH inicial de 7.5 (Morales-Fonseca, 2014). Los componentes del medio son los mismos enunciados anteriormente, aunque varía la fuente y concentración de nitrógeno.

Fermentación líquida sumergida

Las fermentaciones se llevaron a cabo por triplicado, variando la relación C/N en tres niveles (10, 20, 30) para cada fuente de nitrógeno. Como variable de respuesta se tuvo la actividad enzimática de MnP. Cada unidad experimental fue inoculada con 10 g (base húmeda) de pellets en un volumen de reacción de 100 mL, concentración de inóculo en base seca de 5.16 ± 0.24 gL⁻¹ y temperatura de 30 ± 2 °C, en un agitador orbital a 150 rpm por 15 días. Se tomaron muestras del sobrenadante del medio de reacción a los 6, 9, 12 y 15 días de incubación. Las muestras se centrifugaron a 10 000 rpm durante 10 min a 4 °C y se analizó la actividad enzimática a partir del sobrenadante recuperado (Morales-Fonseca, 2014).

Actividad manganeso peroxidasa (MnP)

La actividad MnP (E.C. 1.11.1.13) se determinó por el cambio en la absorbancia a 468 nm ($\epsilon_{468} = 49600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), correspondiente a la oxidación de 2,6 dimetoxifenol (DMP). La reacción se siguió espectrofotométricamente durante 10 min. La mezcla contenía 450 μL de extracto enzimático, 500 μL de DMP 10 mM en buffer acetato de sodio 100 mM, (pH 5), 50 μL de sulfato de manganeso (MnSO_4) 0.4 M y 30 μL de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 22 mM. Una unidad de actividad (U) se definió como la cantidad de enzima que permite la oxidación de 1 μmol de 2,6 dimetoxifenol por minuto. El blanco estaba compuesto de 450 μL de buffer, 50 μL de sulfato de manganeso y 30 μL de peróxido de hidrógeno (Quevedo-Hidalgo, 2011; Quevedo-Hidalgo et ál., 2012; Santoyo, Gonzalez, Terron, Ramírez y Pisabarro, 2008).

Determinación de parámetros cinéticos

Se realizó el cálculo de los parámetros cinéticos de la reacción entre el DMP y el extracto enzimático obtenido en el medio de producción, el cual fue evaluado con la fuente de nitrógeno y la relación C/N que presentaron mayor actividad enzimática de MnP (cinco repeticiones). Se planteó la ecuación cinética de Michaelis Menten para el mecanismo de reacción propuesto por Karigar y Rao (2011) (figura 1) y se realizó la linealización Lineweaver-Burk para obtener los parámetros por método gráfico (Lineweaver y Burk, 1934).

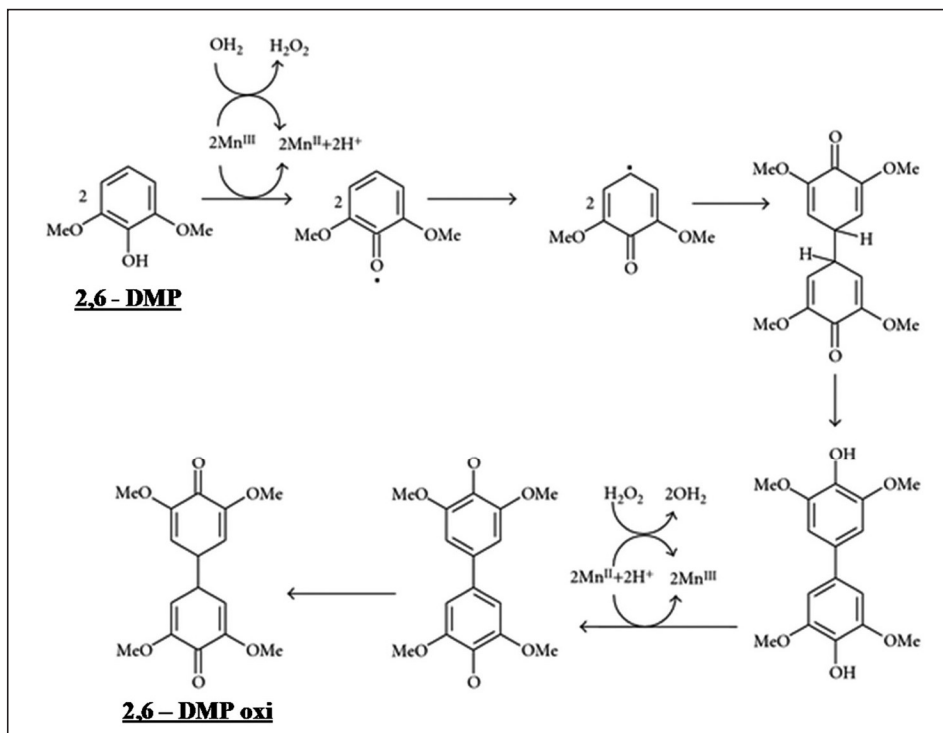


Figura 1. Mecanismo de reacción para la oxidación de 2,6-dimetoxifenol (DMP) por medio de la enzima manganeso peroxidasa (MnP), Mn^{2+} y H_2O_2 .

Fuente: Karigar y Rao (2011).

Igualmente, con el fin de tener un ajuste más acertado de la ecuación cinética se realizó la estimación de los parámetros por medio de un ajuste numérico, en el que se minimizó el promedio de las diferencias al cuadrado entre concentraciones experimentales y calculadas empleando el método Nelder–Mead. Para resolver numéricamente la ecuación diferencial de Michaelis Menten se utilizó el método de Runge Kutta de 4.º orden, obteniendo los perfiles de concentración en el tiempo (Guio et ál., 2012).

RESULTADOS

En la evaluación de diferentes fuentes de nitrógeno para la producción de manganeso peroxidasa, se encontró que las fermentaciones con fuente orgánica (peptona) presentaron actividades enzimáticas mayores que en los extractos obtenidos con fuentes inorgánicas (carbonato de amonio y sulfato de amonio). Esto se evidenció para todas las relaciones C/N estudiadas, de lo que se infiere que la asimilación de este tipo de compuestos por parte del hongo no es favorable (Morales-Fonseca, 2014). Específicamente, en el caso de las fermentaciones con carbonato de amonio no se evidenció actividad de MnP en ninguno de los casos evaluados. Por otro lado, con las otras dos fuentes de nitrógeno se observó que la mayor actividad MnP se obtuvo a los 12 días de fermentación, con una relación C/N de 30 y 10 para sulfato de amonio y peptona, respectivamente (figura 2). Esto puede significar que, por un lado, el aumento en la concentración de nitrógeno inorgánico lleva a una inhibición del hongo para producir enzimas y, por otro, que el uso de peptona estimula la degradación del sustrato lignocelulósico debido a una mayor expresión de enzimas.

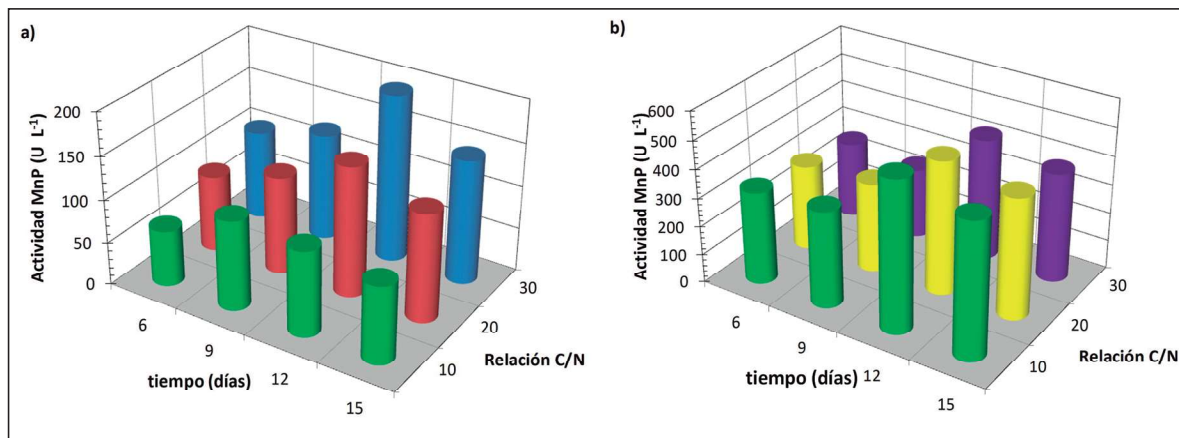


Figura 2. Perfiles de actividad enzimática de MnP durante las fermentaciones a las diferentes relaciones C/N evaluadas (pH = 7.5): a) sulfato de amonio y b) peptona.

Otros estudios han evidenciado una mejor degradación de sustratos lignocelulósicos por medio de una mayor expresión de peroxidasa de cepas de *P. ostreatus*, cuando se utilizan compuestos orgánicos como extracto de levadura y peptona como fuentes de nitrógeno en fermentaciones líquidas sumergidas, obteniendo valores de actividad para MnP de 2503.6 U L⁻¹ y 697.7 U L⁻¹, respectivamente (Elisashvili et ál., 2006; Quevedo-Hidalgo et ál., 2012). Sin embargo, Numir et ál. (2015) analizaron la producción de enzimas ligninolíticas a partir de residuos agrícolas usando otra especie de hongos de la podredumbre blanca, *Phanerochaete chrysosporium*. Los autores probaron distintas fuentes de nitrógeno, hallando que, entre peptona y sulfato de amonio, esta última favorecía levemente la actividad de MnP con las siguientes actividades: 481.4 U mL⁻¹ y 587.7 U mL⁻¹, respectivamente.

En la figura 3 se presenta el detalle de la producción de MnP para cada fuente de nitrógeno. En todos los casos registrados la MnP producida con peptona tuvo una actividad entre 2 a 3 veces mayor que la obtenida con sulfato de amonio. Se evidenció que la mayor actividad de peptona fue $528.54 \pm 28.66 \text{ U L}^{-1}$ (C/N = 10), mientras que para sulfato de amonio fue $194.87 \pm 14.26 \text{ U L}^{-1}$ (C/N = 30).

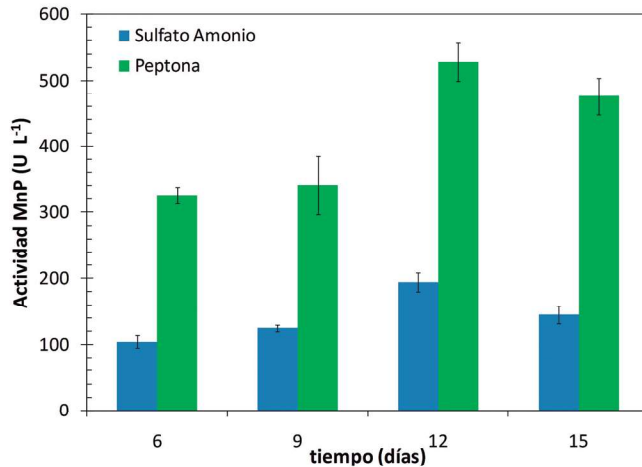


Figura 3. Evolución de la producción de MnP para las relaciones C/N que presentaron mayor actividad: sulfato de amonio (C/N = 10) y peptona (C/N = 30).

Por otro lado, se llevó a cabo el estudio cinético de la MnP realizando el cálculo de las velocidades iniciales de la reacción entre el extracto enzimático obtenido con peptona (C/N = 30) de 12 días de fermentación, con 5 concentraciones iniciales diferentes de DMP. Con los valores calculados de velocidad de reacción se efectuó la linealización de Lineweaver-Burk, así como se aprecia en la figura 4.

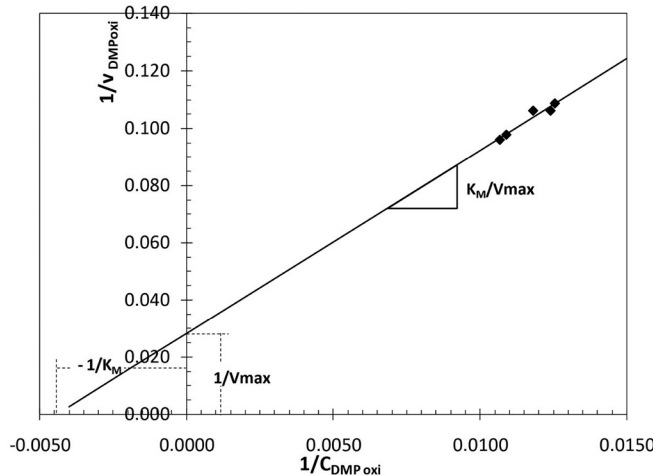


Figura 4. Linealización de Lineweaver-Burk para determinación de parámetros cinéticos en la oxidación de DMP con MnP obtenida, utilizando peptona como fuente de nitrógeno, C/N = 30, pH = 5.5 y 12 días de fermentación.

En este procedimiento se observó un buen ajuste de los datos experimentales ($R^2 = 0.983$), que dio como resultado una velocidad máxima (V_{max}) de $17.67 \text{ } (\mu\text{mol L}^{-1} \text{ S}^{-1})$ y una constante de

Michaelis (K_M) de $226.54 \mu\text{mol L}^{-1}$. Al comparar los parámetros cinéticos obtenidos se observa que la velocidad máxima de las manganeso peroxidadas producidas por *Pleurotus ostreatus* durante la degradación de *Panicum maximum* es similar a las reportadas para otros microorganismos y sustratos lignocelulósicos (tabla 1). Por el contrario, el valor de K_M calculado es mucho mayor al reportado por otros autores, lo que evidencia que las MnPs obtenidas tienen una baja afinidad por el sustrato utilizado en los ensayos (DMP).

Tabla 1. Parámetros cinéticos reportados para manganeso peroxidadas producidas a partir de diferentes microorganismos

MICROORGANISMO	K_M^1 ($\mu\text{MOL L}^{-1}$)	V_{MAX}^1 ($\mu\text{MOL L}^{-1} \text{S}^{-1}$)	REFERENCIA
Bjerkandera	62	14.81	Mielgo et ál. (2003)
Phanerochaete chrysosporium	57	10.06	Mielgo et ál. (2003)
Phanerochaete chrysosporium	36	18.40	Luan et ál. (2014)
Echinodontium taxodii 2538	54	18.18	Kong et ál. (2016)

¹ Parámetros determinados para MnPs usando DMP como sustrato.

La estimación de los parámetros cinéticos se realizó también por método numérico, en el que se obtuvo como resultado un mejor ajuste a los datos experimentales. Esto se evidencia en la figura 5, donde se observa que tanto la concentración en el tiempo como la velocidad de reacción, calculada utilizando los parámetros obtenidos ($V_{max} = 20.07 \mu\text{mol L}^{-1} \text{S}^{-1}$ y $K_M = 343.25 \mu\text{mol L}^{-1}$) por esta técnica, tienen una menor diferencia con los valores experimentales.

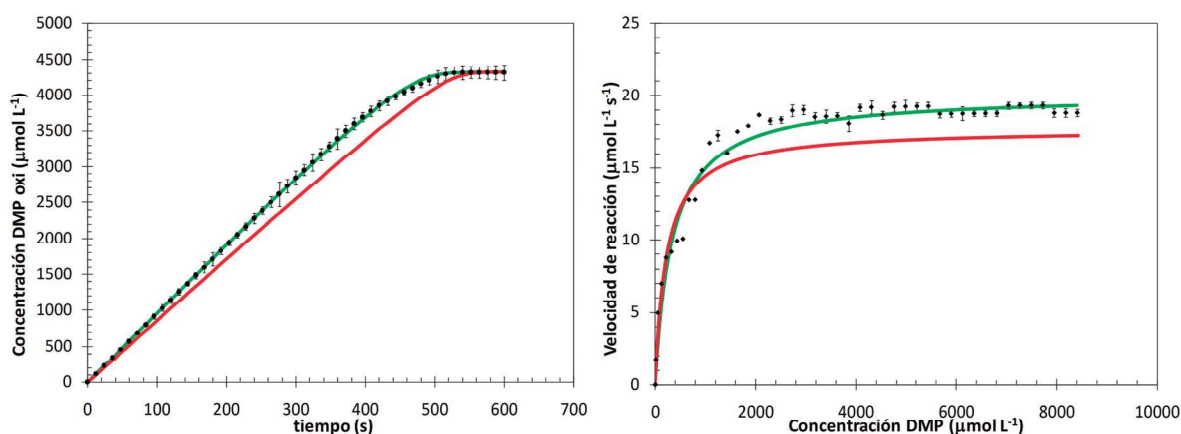


Figura 5. Comparación de los perfiles de concentración en el tiempo (a) y concentración contra velocidad de reacción (b), obtenidos por método Lineweaver-Burk y ajuste numérico.

Las diferencias entre los valores de los dos métodos de determinación de parámetros cinéticos se deben a que en la linealización de Lineweaver-Burk se requieren datos con poca variación entre ellos. Esto debido a que, en la medida en que se utilizan magnitudes muy pequeñas en la elaboración de los gráficos, una variación significativa en los valores de concentración del reactivo de seguimiento

(DMP_{oxi}) (sustrato oxidado) lleva a que se magnifiquen las diferencias en las variables que se grafican y sea difícil tener una tendencia lineal para el cálculo de los parámetros. Esto se evita con el método numérico, el cual contempla la totalidad de los datos y minimiza la diferencia entre los calculados y los experimentales, lo que da como resultado parámetros más confiables.

CONCLUSIONES

La producción de enzimas ligninolíticas a partir de residuos agroindustriales o cultivos energéticos utilizando *Panicum maximum*, como en el caso de estudio, requiere la caracterización de este tipo de sustratos, dado que las relaciones carbono/nitrógeno influyen de manera directa sobre la expresión del complejo enzimático de peroxidasa y lacasa, lo que es típico de hongos de la podredumbre blanca. En términos de la fuente de nitrógeno, esta también puede estimular la producción de enzimas debido a su naturaleza orgánica o inorgánica. Específicamente, para este estudio se encontró un favorecimiento de la actividad de enzimas MnP en fermentación líquida sumergida utilizando peptona como fuente de nitrógeno a una relación C/N = 30 con doce días de incubación.

Como parte de la caracterización de las enzimas manganeso peroxidasa producidas, se llevó a cabo la determinación de los parámetros cinéticos de la ecuación de Michaelis Menten, por medio de un método numérico de minimización de diferencias al cuadrado. Este análisis dio como resultado un mejor ajuste entre los valores experimentales de concentración y velocidad de reacción, comparado con el resultado obtenido usando las constantes calculadas por el método de linealización de Lineweaver-Burk. En ambos casos las velocidades máximas fueron similares y las K_M indicaron poca afinidad por el sustrato (DMP).

La cepa del hongo de la podredumbre blanca *Pleurotus ostreatus* puede utilizarse en futuros estudios para la selección de un residuo vegetal apropiado que lleve al desarrollo de una tecnología eficiente de producción enzimas ligninolíticas y degradación de biomásas, como bagazo de caña, pajilla de arroz, cáscara de coco, entre otros.

REFERENCIAS

- Asgher, M., Ramzan, M., y Bilal, M. (2016). Purification and characterization of manganese peroxidases from native and mutant *Trametes versicolor* IBL04. *Chinese Journal of Catalysis*, 37(4), 561-570. doi: 10.1016/S1872-2067(15)61044-0
- Baborová, P. (2006). Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus*, and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the enzyme. *Research in Microbiology*, 157(3), 248-253. doi: 10.1016/j.resmic.2005.09.001
- Baldrian, P., Valásková, V., Merhautová, V., y Gabriel, J. (2005). Degradation of lignocellulose by *Pleurotus ostreatus* in the presence of copper, manganese, lead and zinc. *Research in Microbiology*, 156(5-6), 670-676. doi: 10.1016/j.resmic.2005.03.007
- Bilal, M., y Asgher, M. (2015). Dye decolorization and detoxification potential of Ca-alginate beads immobilized manganese peroxidase. *BMC Biotechnology*, 15(11), 1-14. doi: 10.1186/s12896-015-0227-8
- Bilal, M., y Asgher, M. (2016). Enhanced catalytic potentiality of *Ganoderma lucidum* IBL-05 manganese peroxidase immobilized on sol-gel matrix. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 128, 82-93. doi: 10.1016/j.molcatb.2016.03.013
- Chen, M., Shanqing, Y., Zhang, H., y Liang, X. (2010). Purification and characterization of a versatile peroxidase from edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 18(5), 824-829. doi: 10.1016/S1004-9541(09)60134-8

- Elisashvili, V., Penninckx, M., Kachlishvili, E., Asatiani, M., y Kvesitadze, G. (2006). Use of *Pleurotus dryinus* for lignocellulolytic enzymes production in submerged fermentation of mandarin peels and tree leaves. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(7), 998-1004. doi: 10.1016/j.enzmictec.2005.08.033
- Ergun, S., y Urek, R. (2017). Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using *Pleurotus ostreatus*. *Annals of Agrarian Science*, 15(2), 273-277. doi: 10.1016/j.aasci.2017.04.003
- Guio, F., Rugeles, L., Rojas, S., Palomino, M., Camargo, M., y Sánchez, O. (2012). Kinetic modelling of fructooligosaccharide production using *Aspergillus oryzae* N74. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167(1), 142-163. doi: 10.1007/s12010-012-9629-4
- Heaton, E. Flavell, R., Mascia, P., Thomas, S., Dohleman, F., y Long, S. (2008). Herbaceous energy crop development: recent progress and future prospects. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(3), 202-209. doi: 10.1016/j.copbio.2008.05.001
- Karigar, C., y Rao, S. (2011). Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: a review. *Enzyme Research*, doi: 10.4061/2011/805187
- Kirk, T., y Farrel, R. (1987). Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology*, 41(1), 465-505. doi: 10.1146/annurev.mi.41.100187.002341
- Kong, W., Chen, H., Lyu, S., Ma, F., Yu, H., y Zhang, X. (2016). Characterization of a novel manganese peroxidase from white-rot fungus *Echinodontium taxodii* 2538, and its use for the degradation of lignin-related compounds. *Process Biochemistry*, 51(11), 1776-1783. doi: 10.1016/j.procbio.2016.01.007
- Lineweaver, H., y Burk, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society*, 56(3), 658-666. doi: 10.1021/ja01318a036
- Liu, J., Zhang, S., Shi, Q., Kong, W., Yu, H., y Ma, F. (2019). Highly efficient oxidation of synthetic and natural lignin-related compounds by *Physicorinus vitreus* versatile peroxidase. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 136, 41-48. doi: 10.1016/j.ibiod.2018.10.009
- Luan, P., Jiang, Y., Zhang, S.-P., Gao, J., Su, Z.-G., Ma, G.-H., y Zhang, Y.-F. (2014). Chitosan-mediated formation of biomimetic silica nanoparticles: an effective method for manganese peroxidase immobilization and stabilization. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 118(5), 575-582. doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.05.003
- Mielgo, I., Palma, C., Guisan, J., Fernandez-Lafuente, R., Moreira, M., Feijo, G., y Lema, J. (2003). Covalent immobilization of manganese peroxidases (MnP) from *Phanerochaete chrysosporium* and *Bjerkandera* sp. BOS55. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(7), 769-775. doi: 10.1016/S0141-0229(03)00066-8
- Morales-Fonseca, D. (2014). *Producción de enzimas ligninolíticas a partir de biomasa de Panicum maximum por Pleurotus ostreatus* (tesis de maestría). Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D. C., Colombia.
- Morales-Fonseca, D., y Ruiz-Tovar, K. (2008). *Determinación de la capacidad de remoción de cadmio, plomo y níquel, por hongos de la podredumbre blanca inmovilizados* (tesis de pregrado). Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D. C., Colombia..
- Numir, N., Asgher, M., Tahir, I., Riaz, M., Bilal, M., y Shah, S. (2015). Utilization of agro-wastes for production of ligninolytic enzymes in liquid state fermentation by *Phanerochaete chrysosporium*-Ibl-03. *International Journal of Chemical and Biochemical Sciences*, 7, 9-14.

- Palma, C., Martinez, A., Lema, J., y Martinez, M. (2000). Different fungal manganese-oxidizing peroxidases: a comparison between *Bjerkandera* sp. and *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biotechnology*, 77(2-3), 235-245. doi: 10.1016/S0168-1656(99)00218-7
- Quevedo-Hidalgo, B. (2011). *Evaluación de la degradación de residuos de floricultura para la obtención de azúcares con el uso de tres hongos lignocelulolíticos* (tesis de doctorado). Doctorado en Ingeniería Química y Ambiental, Universidad Nacional de Colombia, Bogota D. C., Colombia.
- Quevedo-Hidalgo, B., Narvaez-Rincon, P., Pedroza-Rodriguez, A., y Velásquez-Lozano, M. (2012). Degradation of *Chrysanthemum* (*Dendranthema grandiflora*) wastes by *Pleurotus ostreatus* for the production of reducing sugars. *Biotechnology and Bioengineering*, 17(5), 1103-1112. doi: 10.1007/s12257-012-0227-7
- Santoyo, F., Gonzalez, A., Terron, M., Ramírez, L., y Pisabarro, A. (2008). Quantitative linkage mapping of lignin-degrading activities in *Pleurotus ostreatus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(2), 137-143. doi: 10.1016/j.enzmictec.2007.11.007.
- Sasaki, T., Kajino, T., Sugiyama, H., y Takahashi, H. (2001). New pulp biobleaching system involving manganese peroxidase immobilized in a silica support with controlled pore sizes. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5), 2208-2212. doi: 10.1128/AEM.67.5.2208-2212.2001.
- Stajic, M., Persky, L., Friesem, D., Hadar, Y., Wasser, S., Nevo, E., y Vukojevic, J. (2006). Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(1-2), 65-73. doi: 10.1016/j.enzmictec.2005.03.026