

Revisión

Mecanismo de biodegradación de la lignina

A. Gutiérrez, A.T. Martínez¹

En la presente revisión se realiza una actualización de varios aspectos del proceso de biodegradación de la lignina, haciendo hincapié en tres conceptos: a) la naturaleza multienzimática del ataque a la lignina, b) la importancia de algunos metabolitos aromáticos sintetizados por los hongos, y c) la compartimentalización del proceso de biodegradación. En relación con el primer punto, además de las peroxidasas que oxidan el polímero de lignina, hay que considerar las enzimas que reducen los radicales liberados durante la degradación (evitando su repolimerización) y los sistemas enzimáticos que generan peróxido de hidrógeno. En segundo lugar, algunos metabolitos aromáticos sintetizados por los hongos (p.ej. el alcohol veratrílico) desempeñan un papel importante en la degradación, actuando como intermediarios y permitiendo el cierre del ciclo catalítico de las peroxidasas ligninolíticas cuando éstas actúan sobre compuestos de elevado potencial redox. Finalmente, la eficaz degradación de la lignina por los hongos parece, en gran medida, el resultado de la acción coordinada de enzimas intracelulares y extracelulares, una parte de las cuales parecen encontrarse inmovilizadas en la vaina de polisacárido que rodea al micelio.

Palabras clave: Lignina, basidiomicetos, enzimas ligninolíticas, alcohol veratrílico, exopolisacárido, biodegradación.

SUMMARY

Lignin biodegradation mechanism

In the present review several aspects of the lignin biodegradation process are updated, with special emphasis on three concepts: a) the multienzymatic nature of lignin attack, b) the importance of aromatic metabolites synthesized by fungi, and c) the compartmentalization of the biodegradation process. In relation to the first point, it is necessary to consider, together with the peroxidases oxidizing the lignin polymer, the enzymes reducing the radicals released during

degradation (preventing repolymerization), and the enzymatic systems generating hydrogen peroxide. Secondly, some aromatic compounds synthesized by fungi play an important role in degradation, acting as intermediates in oxidation reactions and allowing the catalytic cycle of the ligninolytic peroxidases to be completed when they oxidize high redox-potential compounds. Finally, the effective degradation of lignin by fungi seems the result of the joint action of intracellular and extracellular enzymes, some of them being immobilized in the polysaccharide sheath surrounding the mycelium.

Key words: Lignin, basidiomycetes, enzymes, veratryl alcohol, exopolysaccharide, biodegradation

Una introducción histórica: Descubrimiento de las «ligninasas»

El conocimiento sobre la biodegradación de la lignina experimentó un considerable progreso a partir de finales de la década de los 70. Este hecho fue resultado del interés demostrado por varias instituciones de investigación relacionadas con la industria papelera, en particular el Laboratorio de Productos Forestales (FPL) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, el Instituto Sueco de Investigación sobre Pasta y Papel (STFI) y el Instituto Canadiense de Investigación sobre Pasta y Papel (Paprican). En los dos últimos se llevaron a cabo los primeros ensayos sobre la utilización de organismos ligninolíticos en la fabricación de papel. En el FPL se realizaron simultáneamente estudios sobre la fisiología de los hongos ligninolíticos, principalmente *Phanerochaete chrysosporium*, que constituyeron la base para el descubrimiento de las peroxidasas ligninolíticas («ligninasas»), algunos años más tarde. En la actualidad el FPL lidera un Consorcio Mundial de empresas interesadas en la aplicación de la Biotecnología en la Industria Papelera. Entre los trabajos recientes financiados por dicho Consorcio puede mencionarse el descubrimiento de basidiomicetos ligninolíticos capaces de llevar a cabo una degradación selectiva de la lignina, como *Ceriporiopsis subvermisporea*, lo que permite pensar en su futura utilización para la fabricación de pasta de papel de tipo «bio-mecánico» con un considerable ahorro de energía en el proceso¹. Estudios similares están siendo llevados a cabo para la designificación biológica en la fabricación de pasta de papel a partir de subproductos agrícolas (pasta «bio-semimecánica») ². El uso de procedimientos biotecnológicos para la fabricación de pasta de papel puede producir, no sólo ahorro de energía y productos químicos, sino también una reducción del impacto ambiental producido por estas industrias^{3,4}.

Aceptado para publicación: 19 de mayo 1995

¹Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Velázquez 144, E-28006 Madrid, España. E-mail: cib38@cc.csic.es. Talk: angel@biolog.cib.csic.es

Correspondencia: A.T. Martínez; Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Velázquez 144, E-28006 Madrid, España

Con anterioridad a la fecha mencionada al comienzo, los estudios sobre biodegradación de la lignina eran escasos y se encontraban principalmente relacionados con la patología forestal. Hay que resaltar que la fisiología de la degradación de la lignina no pudo ser investigada mientras no se dispuso de los primeros modelos de la estructura de este



Figura 1: Viñeta que ilustra el estado de conocimientos sobre el mecanismo de biodegradación de la lignina por *P. chrysosporium* antes del descubrimiento de la LiP⁶ publicada con autorización de la revista y del autor).

polímero, propuestos también en la década de los 70. La primera aportación importante al conocimiento de la estructura de la lignina, como heteropolímero formado por la condensación enzimática de los alcoholes hidroxicinámicos, procede de los estudios de biosíntesis *in vitro* llevados a cabo algunos años antes⁵. A partir de estos estudios se desarrollaron procedimientos para la preparación de lignina sintética (DHP) que, incorporando marcaje con ¹⁴C, fue utilizada para evaluar la capacidad para degradar la lignina de diferentes hongos y para optimizar las condiciones ligninolíticas en cultivos de *P. chrysosporium*. Los primeros modelos para la estructura de la lignina de frondosas⁶ y coníferas⁷, incluían información sobre los enlaces más abundantes dentro del polímero (figura 3). A partir de ella se sintetizaron modelos de tipo dímero que representaban los principales enlaces dentro de la lignina, principalmente de tipo β-O-4 (enlace de tipo éter entre el C_β o C-2' de la cadena lateral de una unidad de lignina y el C-4 del anillo aromático de otra unidad) y β-1 (enlace C-C entre el C_β o C-2' de la cadena lateral de una unidad y el C-1 del anillo aromático de otra). Utilizando estos modelos sencillos, que dan lugar a productos de degradación fácilmente identificables, fue posible demostrar por primera vez la actividad ligninolítica de las peroxidasas de *P. chrysosporium*, y estudiar las vías y mecanismos de degradación:

La existencia de enzimas de tipo peroxidasa involucradas en la degradación de la lignina por *P. chrysosporium*, fue descrita por primera vez en 1983. Con anterioridad, se había especulado sobre la participación de diferentes tipos de enzimas, así como sobre el papel de los radicales libres (principalmente los derivados de la reducción del oxígeno) en el proceso de biodegradación, tal como fue ilustrado en una revisión publicada en el número 1 de Trends in Biotechnology⁸ (figura 1). La disponibilidad de lignina sintética marcada y de dímeros modelo, fue decisiva para el descubrimiento de las peroxidasas ligninolíticas. El establecimiento de las condiciones para la detección de estas enzimas, fue resultado

principalmente del trabajo llevado a cabo por Kirk y colaboradores en el FPL. Sin embargo, el descubrimiento de la lignina peroxidasa (LiP) fue publicado simultáneamente por el grupo del FPL⁹ y por Gold y colaboradores, un grupo universitario de Oregón que se había incorporado al estudio de la biodegradación de la lignina¹⁰. Con posterioridad a su descubrimiento en *P. chrysosporium*, la LiP ha sido detectada en otros hongos¹¹.

Durante los últimos 10 años, el número de grupos de investigación dedicados al estudio de la biodegradación de la lignina se ha multiplicado (figura 2) y se ha acumulado una

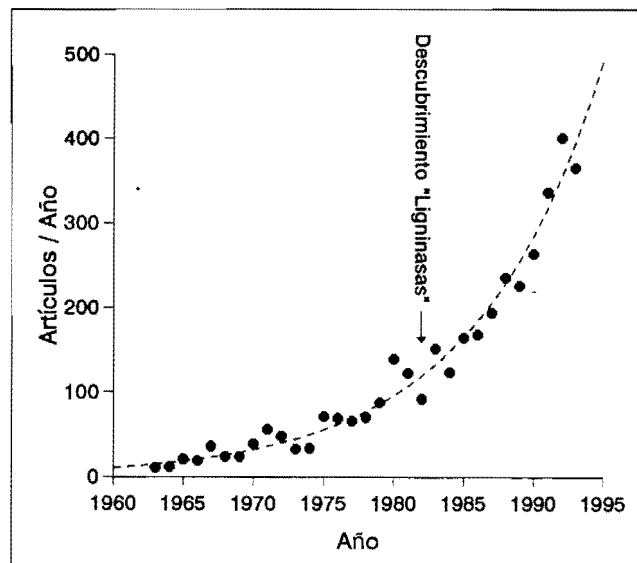


Figura 2: Evolución del número de publicaciones sobre biodegradación de la lignina (a partir de la base de datos de los autores con 4000 referencias sobre el tema).

impresionante cantidad de información sobre la LiP, tal como se recoge en diferentes revisiones¹²⁻¹⁹. Los trabajos realizados incluyen estudios sobre el mecanismo de acción, secuencia y estructura de las proteínas, obtención de peroxidasas recombinantes, genética molecular, etc. A pesar de ello, la mayor parte de los ensayos de despolimerización *in vitro* de lignina con enzimas purificadas han resultado infructuosos hasta el presente. Por otra parte, también existen importantes impedimentos para explicar la degradación enzimática *in situ* de la lignina dentro de la pared vegetal.

Con objeto de superar estas dificultades, la biodegradación de la lignina debe verse actualmente desde una perspectiva que incluya los tres aspectos siguientes: i) naturaleza multienzimática del proceso, ii) participación de ciertos metabolitos fúngicos de tipo aromático, y iii) compartimentación del proceso, incluyendo el medio intrahifal, el espacio extracelular delimitado por la vaina micelial de polisacáridos, y la pared vegetal.

La biodegradación de la lignina como un sistema multienzimático

El hecho de que algunos hongos degraden la lignina sin producir LiP, pone de manifiesto que otras enzimas ligninolíticas pueden desempeñar un papel importante en este proceso^{20,21}. A dichas enzimas se les había concedido una importancia menor por su incapacidad para oxidar directamente modelos de lignina de tipo no-fenólico (representativos del 75 al 95% de las unidades fenilpropano de la

lignina), (figura 2). Un año después del descubrimiento de la LiP, Gold y colaboradores describieron una segunda peroxidasa ligninolítica, denominada Mn-peroxidasa (MnP)²². A diferencia de la LiP, la MnP sólo es capaz de oxidar compuestos fenólicos y, además, requiere la presencia de Mn²⁺ para cerrar su ciclo catalítico. El Mn³⁺ formado por la MnP es a su vez un agente oxidante que, una vez estabilizado en forma de quelatos, es capaz de oxidar rápidamente modelos de lignina de tipo fenólico, y cuya capacidad para oxidar modelos no-fenólicos debe ser objeto de estudio^{23,24}. Conviene mencionar que la MnP parece tener una distribución más amplia que la LiP entre los hongos ligninolíticos^{25,26}. Dado que las peroxidasas ligninolíticas requieren una fuente de H₂O₂ extracelular, la producción enzimática de este compuesto ha sido también investigada. Al menos dos oxidasas extracelulares, glicoxal oxidasa²⁷ y aril-alcohol oxidasa (AAO)²⁸⁻³¹, han sido relacionadas con la generación de H₂O₂ durante la degradación enzimática de la lignina. Ciertas enzimas con actividad reductasa de compuestos aromáticos, incluyendo celobiosa deshidrogenasa y celobiosa-quinona oxidoreductasa, parecen estar también involucradas en la biodegradación de la lignina. Su papel se encuentra relacionado con la reducción de quinonas y radicales fenoxilo, evitando su toxicidad y tendencia a la repolimerización.

Un esquema general de las diferentes enzimas involucradas y reacciones producidas durante la degradación de la lignina se presenta en la figura 3. La formación de un radical catiónico aromático (a,b) que posteriormente evoluciona de diferentes formas (c-f), es el primer paso en este proceso. Las reacciones incluidas en el esquema son las siguientes: a) oxidación de unidades no-fenólicas por LiP, b) oxidación de unidades fenólicas por MnP/Mn²⁺ o lacasa, c) rotura éter en C₄ dando un radical fenoxilo, d) apertura del anillo aromático, e) rotura C_α-C_β y formación de un grupo carbonilo, f) desmetoxilación/desmetilación, g) repolimerización de radicales, h) reducción de radicales por enzimas como la quinona-reductasa (QR) y la celobiosa deshidrogenasa (CDH), i) formación de quinona/hidroquinona a partir del radical fenoxilo, j) «redox cycling» quinona-hidroquinona (reducción por QR y oxidación espontánea), k) reducción de aldehídos aromáticos por AAD, l) oxidación de alcoholes aromáticos por AAO y formación de H₂O₂, m) generación de radicales del O₂, n) ataque no-enzimático a la lignina por radicales (p.ej. hidroxilo).

Por otra parte, las lacasas, fenoloxidasas características de los basidiomicetos de podredumbre blanca (donde se incluyen la mayor parte de los hongos ligninolíticos) con la excepción de *P. chrysosporium*, eran conocidas desde hacía años pero no se les atribuía un papel importante en la biodegradación de la lignina. Sin embargo, estudios recientes^{32,33} han demostrado que estas enzimas pueden degradar modelos de lignina de tipo no-fenólico en presencia de ciertos sustratos, que actúan como intermediarios o cooxidantes, dando lugar a una rotura C_α-C_β similar a la producida por la LiP (figura 4).

Importancia de los metabolitos aromáticos en la biodegradación

En algunos de los primeros estudios de producción de LiP por *P. chrysosporium* ya se advirtió que la adición de alcohol veratrílico al medio de cultivo incrementaba los niveles de actividad de esta enzima. Estudios posteriores¹⁴ mostraron que el alcohol veratrílico era un metabolito secretado por el hongo y sugirieron una ruta de biosíntesis, que ha sido recientemente modificada³⁴, y la participación de este compuesto en la biodegradación.

El efecto positivo del alcohol veratrílico sobre la producción

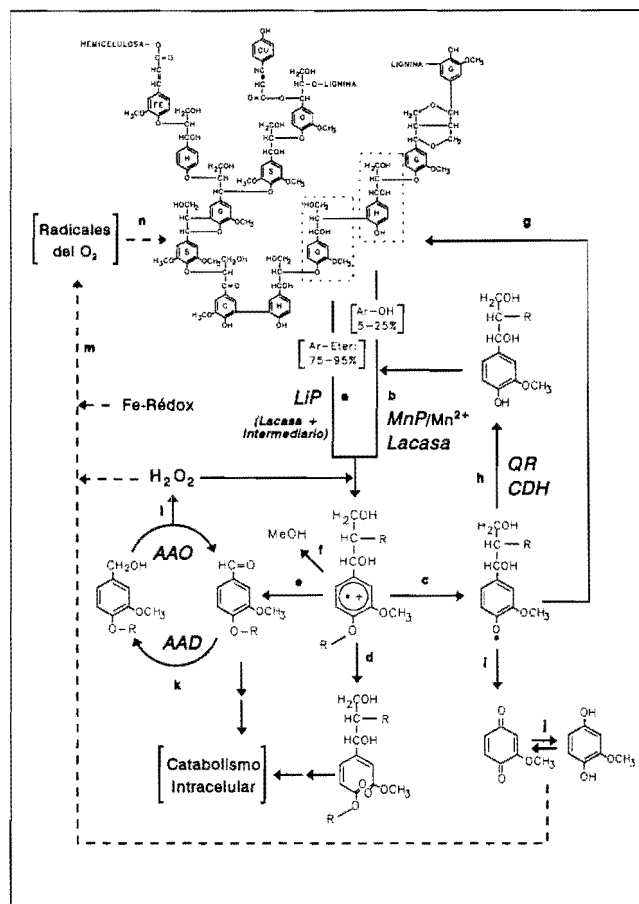


Figura 3: Esquema de la degradación de la lignina como un sistema multienzimático (basado en³⁰; las reacciones se explican en el texto).

de LiP no se debe a que este compuesto actúe como inductor, sino al hecho de que, al reducir a la enzima oxidada por el H₂O₂, impide que ésta pase a un estado superior de oxidación, que es inactivo³⁵. Por otra parte, la presencia del alcohol veratrílico permite la oxidación por la LiP de compuestos que no pueden ser oxidados por la enzima sola (por ejemplo el alcohol anisílico). La primera explicación de este fenómeno (figura 5A), sugería que el radical catiónico formado durante la oxidación enzimática del alcohol veratrílico (figura 3), oxidaba al alcohol anisílico³⁶. A partir de estos resultados se planteó una hipótesis sobre el papel del radical catiónico del alcohol veratrílico como intermediario en la biodegradación de la lignina. Sin embargo, estudios recientes sugieren que, en la oxidación del alcohol anisílico, el alcohol veratrílico actúa contribuyendo al cierre del ciclo catalítico de esta hemoproteína³⁷. Sólo el C-I (que contiene un complejo oxo-Fe⁴⁺-radical catiónico de porfirina) presenta un potencial de oxidación suficiente para oxidar al alcohol anisílico y, en ausencia de alcohol veratrílico, la reacción se detiene al quedar el ciclo abierto, y la enzima se inactiva por sobreoxidación. Sin embargo, la adición de alcohol veratrílico, que reduce al C-II, permite el cierre del ciclo catalítico (figura 5B). En este sentido la LiP actúa como una anisilperoxidasa dependiente de alcohol veratrílico.

Los estudios de difracción de rayos X de la LiP^{38,39} y MnP⁴⁰ cristalizadas, han confirmado que el centro activo de la enzima se sitúa dentro de un canal, al que difícilmente puede acceder el polímero de lignina. Paralelamente, los estudios

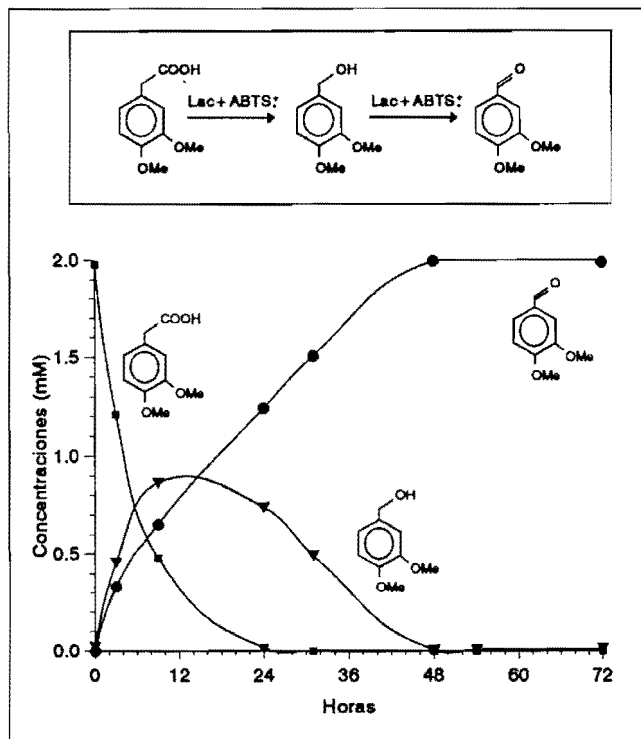


Figura 4: Esquema (arriba) y cinética (abajo) de la degradación de modelos de lignina no-fenólicos (ácido homoverátrico) por lacasa en presencia de ABTS (que es oxidado a su radical catiónico) (basado en ³³)

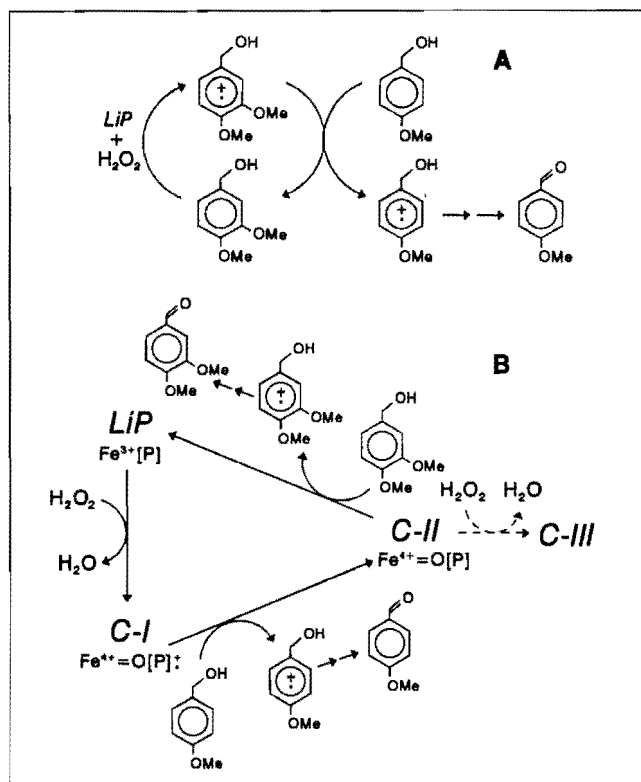


Figura 5: Papel del alcohol verátrico en la oxidación del alcohol anisílico: A. hipótesis del intermediario; B. cierre del ciclo catalítico.

sobre el tamaño de los poros de la matriz lignocelulósica ⁴¹ han demostrado que las enzimas ligninolíticas no pueden penetrar en la pared celular vegetal, a menos que ésta haya sufrido un considerable ataque. Para solucionar estas dificultades, se ha sugerido que este primer ataque a la lignina sería llevado a cabo por compuestos de bajo peso molecular, Mn³⁺ en el caso de la MnP y radicales aromáticos en el caso de la LiP, capaces tanto de acceder al centro activo de la enzima como de penetrar en la estructura relativamente compacta de la pared celular sana. La inestabilidad de estos compuestos que pueden resultar reducidos antes de alcanzar su objetivo dentro de la pared constituye una importante limitación a esta hipótesis. En el caso del Mn³⁺, diferentes ácidos dicarboxílicos sintetizados por el hongo parecen actuar como quelantes aumentando su estabilidad. En el caso de los radicales catiónicos aromáticos producidos por la acción de la LiP, se ha sugerido que pueden encontrarse en contacto con la LiP y, dar lugar a una degradación a distancia, no por desplazamiento del radical sino por una reacción de transferencia electrónica ⁴², efecto túnel (figura 6), hasta alcanzar la zona de la lignina donde se produzca la degradación. De esta forma puede existir una separación física entre enzima y sustrato cuyas implicaciones se discuten en el siguiente apartado.

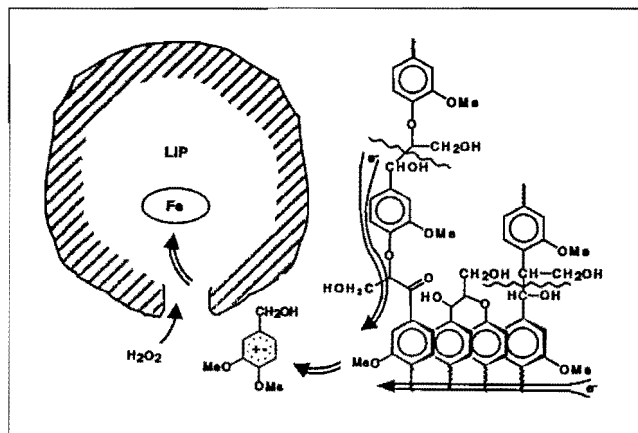


Figura 6: Efecto túnel en la degradación de la lignina por la LiP, incluyendo la presencia de alcohol verátrico para facilitar la transferencia electrónica hasta el centro activo de la enzima (adaptado de ⁵¹, con autorización del autor).

Otros compuestos aromáticos, sintetizados por los hongos o derivados de la degradación de la lignina, desempeñan también papeles importantes en el proceso de biodegradación de este polímero. Ciertos metabolitos fenólicos podrían estar involucrados en la oxidación de modelos de lignina de tipo no-fenólico por la lacasa, tal como se ha discutido anteriormente en relación con sustratos sintéticos de esta enzima (figura 4). También conviene destacar la generación de H₂O₂ extracelular a través del ciclado redox de alcoholes, aldehídos y ácidos aromáticos (figura 3), en el que participan deshidrogenasas intracelulares, que actúan como reductasas, y la AAO extracelular ⁴³⁻⁴⁵. El H₂O₂ generado puede ser utilizado por las peroxidasas ligninolíticas o participar en la generación de radicales del O₂ que pueden actuar directamente sobre los polímeros de la pared celular ⁴⁶. En la generación de radicales del O₂, que también actúan como intermediarios de bajo peso molecular, pueden participar el Fe²⁺ (formación de reactivo de Fenton), o las quinonas-hidroquinonas derivadas de la degradación de la lignina.

La biodegradación de la lignina: Un proceso comparimentado

Durante la degradación de la pared celular de las plantas, las interacciones entre el polímero de la lignina y las enzimas o productos de bajo peso molecular implicados en su degradación no se producen al azar. En primer lugar, el ataque a la lignina en la pared celular se ve limitado por condicionamientos físicos derivados de la estructura relativamente compacta de la matriz lignocelulósica y por condicionamientos químicos derivados de las uniones covalentes entre los diferentes polímeros vegetales que limitan la penetración y la actividad de las enzimas y de los compuestos de bajo peso molecular involucrados en la degradación. En segundo lugar, resulta lógico imaginar que las enzimas que forman parte del sistema enzimático responsable de la degradación de la lignina, no se encuentran libres en el medio extracelular sino inmovilizadas en la vaina extracelular que rodea al micelio (figura 7), de forma que su acción conjunta resulta optimizada^{47,48}. En este sentido

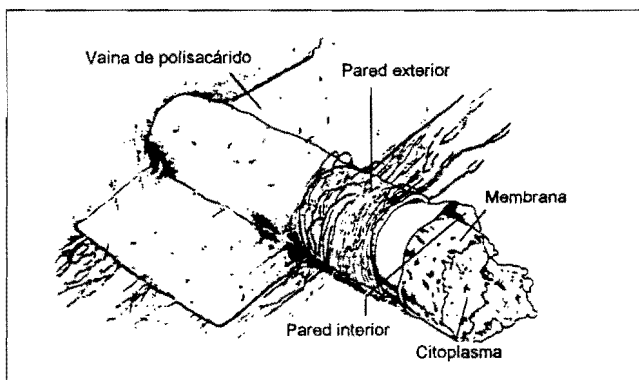


Figura 7: Esquema de una hifa fúngica, con su vaina de polisacárido creciendo sobre un sustrato sólido (basado en⁵²).

el polisacárido extracelular secretado por el hongo parece desempeñar un importante papel al ser responsable de la inmovilización de las enzimas, tal como ha sido demostrado mediante inmunolocalización⁴⁹, así como de la fijación en forma de glicósidos de los productos aromáticos derivados de la degradación de la lignina que podrían repolimerizarse sobre la pared celular⁴⁸. Finalmente, las enzimas intracelulares participan en reacciones redox de productos aromáticos de bajo peso molecular. Las deshidrogenasas miceliarias parecen desempeñar un importante papel en la reducción de compuestos de tipo quinona que son tóxicos y muestran tendencia a la repolimerización. Por otra parte, el catabolismo de los productos aromáticos de bajo peso molecular en los basidiomicetos, al igual que ocurre en los procariotas donde ha sido estudiado con más detalle, tiene lugar a través de reacciones enzimáticas intracelulares. A pesar de que varios aspectos del esquema planteado requieren ser investigados, diferentes evidencias, en particular los pobres resultados obtenidos en los ensayos de despolimerización enzimática de la lignina en sistemas homogéneos, apoyan la existencia de un sistema natural complejo y compartimentado (incluyendo, al menos, la pared vegetal, la vaina miceliar, y el medio intracelular) que facilita la acción conjunta de las enzimas ligninolíticas y orienta las reacciones de oxidación de la lignina en el sentido de la degradación.

AGRADECIMIENTOS

Ana Gutiérrez agradece la financiación recibida a través de una beca de Formación de Profesorado Universitario.

BIBLIOGRAFIA

- Akhtar M. Biomechanical pulping of aspen wood chips with 3 strains of *Ceriporiopsis subvermispora*. *Holzforchung* 1994; 48: 199-202.
- Martínez AT, Camarero S, Guillén F, Gutiérrez A, Muñoz C, Varela E, Martínez MJ, Barrasa JM, Ruel K, Peláez M. Progress in biopulping of non-woody materials: Chemical, enzymatic and ultrastructural aspects of wheat-straw delignification with ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*. *FEMS Microbiol Rev* 1994; 13: 265-274.
- Eriksson K-EL. Biotechnology in the pulp and paper industry. *Wood Sci Technol* 1990; 29: 79-101.
- Messner K, Srebotnik E. Biopulping - An Overview of Developments in an Environmentally Safe Paper-Making Technology. *FEMS Microbiol Rev* 1994; 13: 351-364.
- Freudenberg K, Neish AC. Constitution and Biosynthesis of Lignin. 1968, Springer-Verlag, Nueva York.
- Adler E. Lignin chemistry - Past, present and future. *Wood Sci Technol* 1977; 11: 169-218.
- Nimz H. Beech lignin - Proposal of a constitutional scheme. *Angew Chem Int Ed* 1974; 13: 313-321.
- Eggeling L. Lignin-an exceptional biopolymer...and a rich resource? *Trends Biotechnol* 1983; 1: 123-127.
- Tien M, Kirk TK. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Science* 1983; 221: 661-663.
- Glenn JK, Morgan MA, Mayfield MB, Kuwahara M, Gold MH. An extracellular H₂O₂-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 114: 1077-1083.
- Hatakka A, Mettälä A, Rouhiainen L, Viikari L. The effect of quinone-reducing and phenol-methylating enzymes on the yellowing of mechanical pulp. *Holzforchung* 1994; 48: 82-88.
- Kirk TK, Farrell RL. Enzymatic «combustion»: The microbial degradation of lignin. *Annu Rev Microbiol* 1987; 41: 465-505.
- Tien M. Properties of ligninase from *Phanerochaete chrysosporium* and their possible applications. *CRC Crit Rev Microbiol* 1987; 15: 141-168.
- Shimada M, Higuchi T. Microbial, Enzymatic and Biomimetic Degradation of Lignin. En: Hon DN-S, Shiraiski N (eds) *Wood and Cellulosic Chemistry* 1991; 557-619, Marcel Dekker, N.Y.
- Odier E, Artaud I. Degradation of Lignin. En: Winkelmann G (ed) *Microbial Degradation of Natural Products* 1992; 161-191, VCH, Weinheim.
- Kurek B. Potential Applications of Fungal Peroxidases in the Biological Processing of Wood, Lignocelluloses and Related Compounds. En: Penel C, Gaspar T, Greppin H (eds) *Plant Peroxidases 1980-1990, Topics and Detailed Literature on Molecular, Biochemical, and Physiological Aspects* 1992; 139-186, Universidad de Ginebra.
- Gold MH, Alic M. Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiol Rev* 1993; 57: 605-622.
- Broda P, Birch P, Brooks P, Copapatinio JL, Sinnott ML, Tempelaars C, Wang Q, Wyatt A, Sims P. *Phanerochaete chrysosporium* and Its Natural Substrate. *FEMS Microbiol Rev* 1994; 13: 189-196.
- Schoemaker HE, Lundell TK, Hatakka AI, Piontek K. The Oxidation of Veratryl Alcohol, Dimeric Lignin Models and Lignin by Lignin Peroxidase - The Redox Cycle Revisited. *FEMS Microbiol Rev* 1994; 13: 321-332.
- Périé FH, Gold MH. Manganese regulation of manganese peroxidase expression and lignin degradation by the white rot fungus *Dichomitus squalens*. *Appl Environ Microbiol* 1991; 57: 2240-2245.
- Rüttimann-Johnson C, Salas L, Vicuña R, Kirk TK. Extracellular Enzyme Production and Synthetic Lignin Mineralization by *Ceriporiopsis subvermispora*. *Appl Environ Microbiol* 1993; 59: 1792-1797.
- Kuwahara M, Glenn JK, Morgan MA, Gold MH. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett* 1984; 169: 247-250.
- Hammel KE, Tardone PJ, Moen MA, Price LA. Biomimetic oxidation of nonphenolic lignin models by Mn(II): New observations on the oxidizability of guaiacyl and syringyl substructures. *Arch Biochem Biophys* 1989; 270: 404-409.
- Popp JL, Kirk TK. Oxidation of Methoxybenzenes by Manganese Peroxidase and by Mn³⁺. *Arch Biochem Biophys* 1991; 288: 145-148.
- Hatakka A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi - production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol Rev* 1994; 13: 125-135.
- Peláez F, Martínez MJ, Martínez AT. Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. *Mycol Res* 1994; 99: 37-42.
- Kersten PJ, Kirk TK. Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*. *J Bacteriol* 1987; 169: 2195-2201.
- Bourbonnais R, Paice MG. Veratryl alcohol oxidases from the lignin degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. *Biochem J* 1988; 255: 445-450.
- Guillén F, Martínez AT, Martínez MJ. Production of hydrogen peroxide by aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1990; 32: 465-469.
- Sannia G, Limongi P, Cocca E, Buonocore F, Nitti G, Giardina P. Purification and characterization of a veratryl alcohol oxidase enzyme from the lignin degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1991; 1073: 114-119.
- Guillén F, Martínez AT, Martínez MJ. Substrate specificity and properties of the aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Eur J Biochem* 1992; 209: 603-611.

32. Bourbonnais R, Paice MG. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett* 1990; 267: 99-102.
33. Martínez MJ, Muñoz C, Guillén F, Martínez AT. Studies on homoveratric acid transformation by the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1994; 41: 500-504.
34. Jensen Jr KA, Evans KMC, Kirk TK, Hammel KE. Biosynthetic pathway for veratryl alcohol in the ligninolytic fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 709-714.
35. Cangel AM, Orth AB, Tien M. Lignin and veratryl alcohol are not inducers of the ligninolytic system of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 1993; 59: 2909-2913.
36. Harvey PJ, Schoemaker HE, Palmer JM. Veratryl alcohol as a mediator and the role of radical cations in lignin biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett* 1986; 195: 242-246.
37. Koduri RS, Tien M. Kinetic Analysis of Lignin Peroxidase - Explanation for the Mediation Phenomenon by Veratryl Alcohol. *Biochemistry* 1994; 33: 4225-4230.
38. Poulos TL, Edwards SL, Wariishi H, Gold MH. Crystallographic refinement of lignin peroxidase at 2 Å. *J Biol Chem* 1993; 268: 4429-4440.
39. Piontek K, Glumoff T, Winterhalter K. Low pH crystal structure of glycosylated lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.5 Å resolution. *FEBS Lett* 1993; 315: 119-124.
40. Sundaramoorthy M, Kishi K, Gold MH, Poulos TL. Preliminary crystallographic analysis of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *J Mol Biol* 1994; 238: 845-848.
41. Flournoy DS, Paul JA, Kirk TK, Highley TL. Changes in the Size and Volume of Pores in Sweetgum Wood During Simultaneous Rot by *Phanerochaete chrysosporium*. *Burds. Holzforschung* 1993; 47: 297-301.
42. Harvey PJ, Palmer JM. Oxidation of phenolic compounds by ligninase. *J Biotechnol* 1990; 13: 169-179.
43. Guillén F, Martínez AT, Martínez MJ, Evans CS. Hydrogen peroxide-producing system of *Pleurotus eryngii* involving the extracellular enzyme aryl-alcohol oxidase. *Appl Microbiol Biotechnol* 1994; 41: 465-470.
44. Guillén F, Evans CS. Anisaldehyde and veratraldehyde acting as redox cycling agents for H₂O₂ production by *Pleurotus eryngii*. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 2811-2817.
45. Gutiérrez A, Caramelo L, Prieto A, Martínez MJ, Martínez AT. Anisaldehyde production and aryl-alcohol oxidase and dehydrogenase activities in ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 1783-1788.
46. Evans CS, Gallagher IM, Atkey PT, Wood DA. Localization of degradative enzymes in white-rot decay of lignocellulose. *Biodegradation* 1991; 2: 93-106.
47. Leisola MSA, García S. The mechanism of lignin degradation. En: MP Coughlan (ed) *Enzyme Systems for Lignocellulose Degradation* 1989; 89-99, Elsevier Appl. Sci., London.
48. Gutiérrez A, Martínez MJ, Almendros G, Prieto A, González-Vila FJ, Martínez AT. Hyphal-sheath polysaccharides in fungal deterioration. *Sci Total Environ* 1995; (in press)
49. Ruel K, Joseleau J-P. Involvement of an extracellular glucan sheath during degradation of *Populus* wood by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 1991; 57: 374-384.
50. Martínez AT, González AE, Martínez MJ, Guillén F, Barrasa JM. Biotecnología en la industria papelera: Utilización de los hongos y sus enzimas en la fabricación de papel y en el tratamiento de efluentes. *Rev Iberoam Micol* 1992; 9: 74-78.
51. Schoemaker HE. On the mechanism of lignin biodegradation: A fungal perspective. COMETT Course on Microbiology and Enzymology for the Pulp and Paper Industries, Espoo, 30 Mayo-1 Junio 1994.
52. Larsen MJ, Li Y, Green III F. Ultrastructural aspects of cell wall extension of *Postia placenta* revealed by scanning electron microscopy. *Abs 4th Intern Mycol Congr, Regensburg*, 28 Agosto-3 Septiembre 1990.

Atlas of Clinical Fungi

de Hoog GS, Guarro J. Centraalbureau voor Schimmelcultures,
Baarn and Delft, The Netherlands and Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain.
ISBN 90-70351-26-9; 1995.

Siempre es una gran satisfacción realizar comentarios de libros, cuando éstos además de constituir una importante aportación al mundo editorial de la micología, proceden de autores de nuestro medio, en especial si son miembros de nuestra Asociación Española de Micología; y este es el caso del libro que comentaremos a continuación uno de cuyos autores es el ex-Vicepresidente de la AEM, Dr. Josep Guarro i Artigas.

El Atlas of Clinical Fungi es una obra de 720 páginas cuyo objetivo es proporcionar de forma ilustrada, información y claves para la identificación de los hongos patógenos y oportunistas, incorporando las descripciones de las especies menos frecuentes.

La primera parte de esta obra comprende varios capítulos generales con la introducción, clasificación, ecología, aspectos clínico-patológicos y técnicas micológicas. A partir de la página 35 da comienzo la descripción de los agentes causales más comunes de micosis sistémicas y superficiales, dentro de Oomycota, Zygomycota, Ascomycota, Coelomycetes, Hyphomycetes y levaduras. De particular interés es la calidad de los dibujos a escala que ilustran con detalle a las diferentes especies. Estos dibujos también contribuyen a aclarar aspectos como la conidiogénesis táctica y proporcionan esquemas que facilitan la comprensión de los ciclos biológicos de algunos hongos. Además de estos dibujos el atlas ofrece fotografías en blanco y negro, entre las cuales destacan las realizadas con microscopio electrónico, de extraordinaria calidad.

Junto con una detallada descripción de las características macro y microscópicas de las diferentes especies, se incluyen numerosas claves numéricas que facilitan la clasificación fúngica, así como citas bibliográficas para ampliar la información proporcionada.

Posiblemente sea la primera vez que se incluye a *Pneumocystis carinii* como un hongo en una obra de esta envergadura, aunque al colocarlo dentro de la división Zygomycota, se toma partida por un tema todavía en debate.

La información que se proporciona sobre la clínica, patología y patogenia de las micosis no es tratada en profundidad hecho que, según los propios autores, es debido a que éste no es el objetivo del libro, que por otra parte es ampliamente desarrollado en otras publicaciones de micología médica.

La segunda parte de la obra se dedica a la descripción de hongos oportunistas excepcionales en el sentido que se han comunicado sólo ocasionalmente. Estas especies son descritas teniendo en cuenta sus características macro y microscópicas así como sus estados anamórfico y teleomórfico. Como en la primera parte se acompaña de citas bibliográficas seleccionadas.

Finalmente este atlas incorpora un glosario y una bibliografía muy completa con más de 1300 citas.

Es un libro altamente recomendable para aquellos que se dedican a la identificación de hongos en el laboratorio clínico, así como para todos aquellos estudiantes o profesionales interesados en la micología médica.

It is always a great pleasure to comment upon books, even more so when these do not only constitute an important contribution to the editorial world of mycology but also arise from authors of our own environment, especially if they are members of our Spanish Association of Mycology (AEM). This is the case of the book upon which we are to comment, where one of the Authors, Dr. Josep Guarro i Artigas, is in fact the ex-Vicepresident of the AEM.

The Atlas of Clinical Fungi is a book of 720 pages, made up of several general chapters such as introduction, classification, ecology, clinical and pathological aspects and mycological techniques. Page 35 sees the commencement of the description of the most common agents to cause systemic and superficial mycosis within Oomycetes, Zygomycetes, Ascomycetes, Coelomycetes, Hyphomycetes and yeasts. The quality of the drawings made on a scale illustrating in detail the different species, is of particular interest. These drawings also contribute to the clarification of aspects such as thallic conidiogenesis and provide diagrams which make the biological cycles of some fungi easier to understand. Apart from these drawings, the Atlas also offers black and white photographs, amongst which, those carried out under electronic microscope are outstanding for their extraordinary quality. Several numerical keys can also be found, together with a detailed description of the macro and microscopic characteristics of the different species, thereby making fungal classification easier. Library references are also given in order to expand upon the information provided.

It may possibly be the first time that *Pneumocystis carinii* has been included as a fungus in a book of this scope, even though the inclusion of this within the Zygomycota division, means a decision has been taken regarding a topic still under debate.

The information provided regarding the clinical, pathological and pathogenic aspects of mycosis is not dealt with in depth given that according to the authors, this is not the object of the book and is already covered in other medical mycology publications. The second part of the book is dedicated to the description of exceptional opportunistic fungi, given that they only ever been dealt with occasionally. These species are described bearing in mind their macro and microscopic characteristics as well as their anamorph and teleomorph states. This second half also provides selected references.

Finally, this Atlas incorporates a glossary together with a very extensive list of references containing more than 1,300 quotes.

It is a highly recommendable book for those dedicated to the identification of fungi in clinical laboratories, as well as for all those students or professional persons interested in medical mycology.

Josep M. Torres i Rodríguez