

# OBTENCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN CULTIVOS SUMERGIDOS DEL *PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM* CON ADICIÓN DE SUSTRATOS POLIMÉRICOS

OBTAINING OF SECONDARY METABOLITES IN *PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM* SUBMERGED CULTURES BY ADDITION OF POLYMERIC SUBSTRATES.

Freimar Segura S.,<sup>1</sup> Amanda I. Mejía G.<sup>1\*</sup> y Gloria A. Jiménez T.<sup>2</sup>

## RESUMEN

La producción de la enzima ligninoperoxidasa -LiP- y de metabolitos de interés como la vainilla, son estudiados adicionando los polímeros aserrín de pino (AP) y polivinilalcohol (PVOH) a cultivos sumergidos del *Phanerochaete chrysosporium*, usando bioreactores con agitación orbital y con agitación neumática. Los medios que contienen AP y alcohol veratrílico, en agitadores orbitales, presentan una correlación directa entre la producción de LiP y de vainilla, independiente de si tienen PVOH. En los medios con PVOH se obtiene mayor cantidad de LiP que en los que no lo contienen. En los experimentos con agitación neumática se observa ácido vainillínico, lo que implica que la aireación causa oxidación de la vainilla haciendo inapropiado éste tipo de bioreactor.

**Palabras clave:** Polivinilalcohol, aserrín de pino, *Phanerochaete Chrysosporium*, vainilla, alcohol veratrílico.

## ABSTRACT

The effect of pine sawdust (PS) and polyvinyl alcohol (PVA) polymers in the production of the ligninoperoxidase (LiP) enzyme and of important metabolites as vanillin is studied in *Phanerochaete chrysosporium* submerged culture media. Bioreactors with orbital and pneumatic agitation are used. The procedure with orbital agitation shows a direct relationship between the LiP activity and the vanillin concentration when the medium is enriched with PS and veratrylalcohol (VA) regardless of the presence of PVA. On the other hand the addition of PVA increases the LiP activity .

The procedure with pneumatic agitation is inappropriate, since the air used in this method causes oxidation of vanillin to vanillic acid.

**Key words:** Polyvinyl-alcohol, pine sawdust, *Phanerochaete chrysosporium*, vanillin, veratrylalcohol.

---

1 Grupo Ciencia de los Materiales. Universidad de Antioquia. AA 1226 Medellín- Colombia

2 Laboratorio de Fisiología y Ecología Microbiana. Universidad Libre de Bruselas. Bruselas-Bélgica

\* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: amejia@quimbaya.udea.edu.co

## INTRODUCCIÓN

La lignina es un polímero complejo constituyente de casi todas las plantas en mayor o menor grado y es el material rígido que le confiere resistencia a los tallos leñosos. La degradación de la lignina por hongos de la podredumbre blanca de la madera es producida por las enzimas lignina peroxidasa (LiP)<sup>1,2</sup>, manganeso peroxidasa (MnP)<sup>3</sup> y lacasa<sup>4</sup>. Estas enzimas son producidas por diferentes microorganismos. Una propiedad importante de estas enzimas es su habilidad para oxidar un amplio rango de compuestos orgánicos tóxicos a metabolitos no tóxicos y/o CO<sub>2</sub><sup>5</sup>. La importancia de las aplicaciones biotecnológicas de estos procesos es un tema de estudio por parte de muchos grupos de investigación.

El basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* ha sido el más ampliamente estudiado. Es un hongo filamentosos que crece en cultivos líquidos agitados en forma típica formada por agregación de las esporas durante la germinación. Su tamaño y forma uniformes son un requisito importante en la producción de metabolitos secundarios y son influenciados por la velocidad y forma de agitación<sup>6</sup>.

Durante su metabolismo secundario el *P. chrysosporium* bajo condiciones limitadas de nitrógeno o carbono<sup>7</sup>, produce un gran número de enzimas oxidativas que son excretadas en el medio extracelular, entre estas enzimas se encuentra la LiP. Esta enzima es de gran importancia por su alto poder oxidante y su capacidad para degradar muchos compuestos recalcitrantes como lignina, cloroligninas, pesticidas, colorantes y algunos polímeros sintéticos<sup>8</sup>. Bajo condiciones adecuadas de O<sub>2</sub>, agitación y pH, esta enzima puede producir a partir de múltiples sustratos, entre ellos el polivinilalcohol (PVOH), compuestos de valor comercial importante como el benzaldehído<sup>9,10</sup>. En trabajos previos donde hemos estudiado la biodegradación del PVOH en cultivos sumergidos del *Phanerochaete chrysosporium*<sup>11</sup>, se ha encontrado vainilla, en cantidades comparables a la que han obtenido otros autores<sup>12,13</sup>. El PVOH es un polímero soluble en agua, ampliamente usado en aplicaciones farmacéuticas, cosméticas y químicas<sup>9</sup>. Se produce en el mundo, en un orden de 500.000 toneladas en 1995<sup>14</sup>.

Los residuos (aserrín) producidos durante la elaboración de madera aserrada proveniente de coníferas es alrededor del 5-8% (en base a la biomasa del tronco

utilizado)<sup>15,16</sup>. El exceso de aserrín es evacuado algunas veces en los vertederos y otras veces se incineran indiscriminadamente aumentando la contaminación ambiental. La acumulación de aserrín puede tener efectos ambientales negativos: su descomposición produce dióxido de carbono que se dispersa en la atmósfera; además, los residuos pueden ser un medio ideal para la propagación de plagas y enfermedades<sup>17</sup>. Por lo tanto, las investigaciones que conduzcan a una tecnología de utilización del aserrín de pino es importante, no solo desde el punto de vista ambiental sino también desde el punto de vista de la obtención de productos de alto valor agregado.

La vainilla es un compuesto intermediario de la oxidación metabólica que se genera durante la biodegradación de la lignina, o de compuestos modelos de la lignina y de contaminantes aromáticos, cuando la biodegradación es ocasionada por el *Phanerochaete chrysosporium*<sup>18</sup>. Estos compuestos intermediarios incluyen quinonas sustituidas, hidroquinonas, ácido benzoico, fragmentos de anillos abiertos, además de benzaldehído y vainilla, los cuales son metabolizados posteriormente por procesos intracelulares<sup>12,19</sup>.

La mayor concentración de vainilla de origen natural está entre 1 y 3%, obtenida a partir de granos adecuadamente madurados de especies de *Vainilla orchid*<sup>20</sup>. A partir de sus granos madurados se obtiene un extracto café en solución etanólica y en esa forma tiene múltiples aplicaciones. Pero este producto tiene altos precios debido a los cambios climáticos que afectan el volumen de granos de vainilla producidos cada año. Desde 1936 en EEUU la firma Salvo Chemical Corp<sup>20</sup> inicio la producción en gran escala de vainilla sintética a partir de aguas de desecho que contenían lignina sulfitada. Este desarrollo surgió por la necesidad de resolver el problema causado por las altas concentraciones de lignina, en la demanda bioquímica de oxígeno. Estos aspectos no han mejorado, ya que el licor que queda después de recuperar la vainilla también es altamente contaminante. La producción de vainilla sintética es un complemento a la obtenida naturalmente, sin embargo la alta demanda de vainilla natural hace que su precio sea cientos de veces mayor que el de la sintética<sup>21</sup>. La vainilla natural también se ha obtenido por biotecnología, por transformación realizada por las enzimas de microorganismos como la *Pseudomonas putida* y *Streptomyces setonii* desde eugenol o ácido ferúlico como sustratos<sup>12</sup>. Con varias cepas

de Nocardia, se ha obtenido vainilla a partir de ácido vainillínico<sup>13</sup>. Experimentos para inducir la producción de vainilla en organismos modificados genéticamente también se están desarrollando<sup>22</sup>. Otro estudio reciente menciona el potencial biotecnológico de hidrolizar enzimáticamente la pimienta roja y capsaicina a vainilla<sup>23</sup>.

En éste trabajo se estudia la producción de la enzima LiP por *Phanerochaete chrysosporium* -(Pc), en cultivos sumergidos utilizando polímeros naturales y sintéticos como cosustratos y diferentes tipos de agitación, dando lugar a la obtención de compuestos de alto valor agregado e interés comercial como son las enzimas y los compuestos formados por la degradación de los polímeros, tales como la vainilla u otros compuestos tipo fenólicos, de interés farmacéutico, alimentario o cosmético.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Microorganismo y condiciones del cultivo para replicarlo.** Se utiliza la cepa *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 (ATCC 24725) replicada en medio YMPG, la cepa se replica sobre este medio y se incuba a 37°C por 5 días y se mantiene a 4°C<sup>1,2</sup>.

**Medio de cultivo:** El medio de cultivo contiene por volumen: glucosa al 1 g %, tartrato de amonio al 0.02 g %, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O al 0.05 g %; CaCl<sub>2</sub>·12H<sub>2</sub>O al 0.01 g %; Tween 80 al 0.05g %; tiamina clorhidrato 0.1 mg %; alcohol veratrílico 2,5 mM; solución de elementos traza 70 ml/L (la cual contiene por litro: ácido nitriloacético 1,5 g; MgSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 3 g; NaCl 1 g; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,1 g; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,1 g; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,1 g; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0,01 g; AlK(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>·12H<sub>2</sub>O 0,01 g; HBO<sub>3</sub> 0,01 g; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,01 g.)<sup>24</sup>. Se llevó a pH 4.5 con buffer de tartrato de sodio<sup>25</sup>.

**Reactivos:** El aserrín de pino (AP) se obtiene de la región del oriente antioqueño, se seca a peso constante y se lleva a tamaño de partícula entre 297 y 500 µ.

Se utiliza polivinilalcohol -PVOH- distribuido en Colombia por Productos Químicos Genéricos S. A., producido por BASF Química con las siguientes especificaciones: Peso molecular entre 120 a 180 Kg mol<sup>-1</sup> y alto grado de hidrólisis.

Se utiliza alcohol veratrílico (AV), Aldrich, pureza del 96%, d=1.157

Todos los demás reactivos usados son calidad comercial, grado reactivo

### Ensayo de bioconversión del aserrín de pino -AP-

Ensayos con aserrín de pino (AP): 4 erlenmeyers conteniendo cada uno AP al 0,1 p/v % en el medio de cultivo descrito anteriormente, se esterilizan e inoculan con solución de esporas a una concentración final de 5´10<sup>6</sup> esporas/ml y se rotulan como ensayo AP1, AP2, AP3 y AP4.

Se hacen dos controles bajo las mismas condiciones (sin inoculo).

Se hacen igualmente experimentos sin aserrín y con inoculo y sin aserrín y sin inoculo. Todos los erlenmeyers se tapan con torundas de algodón estériles y se dejan a temperatura ambiente en un agitador orbital marca Heidolph Unimax 2010, a 150 r.p.m. por 10 días.

Un seguimiento de la actividad enzimática (LiP) se hizo a partir del 3 día en los erlenmeyers AP1 y AP2 y en los controles.

En las muestras AP3 y AP4 y en los controles solo se determina la actividad enzimática el día 10 y se determinan los compuestos fenólicos, como se describe mas adelante.

Ensayo de bioconversión de AP en presencia o ausencia de PVOH y/o alcohol veratrílico (AV)

Todos los ensayos se hacen en erlenmeyers conteniendo aserrín de pino (AP) al 0,1 p/v % en el medio de cultivo descrito previamente, pero sin el alcohol veratrílico. Se esterilizan y se dividen así:

6 erlenmeyers se inoculan (5´10<sup>6</sup> esporas/ml) y se rotulan como P0V0 (P0 significa sin PVOH y V0 sin alcohol veratrílico). 2 erlenmeyers se incuban durante 7 días, dos se incuban 10 días y los otros dos, 14 días..

A 6 erlenmeyers se les añade PVOH al 0,1 p/v %, se inoculan (5´10<sup>6</sup> esporas/ml) y se rotulan como P1V0; (P1 significa con PVOH y V0 sin alcohol veratrílico). La incubación de hace por 7, 10 y 14 días como en el caso anterior.-

A 6 erlenmeyers se les añade PVOH al 0,1 p/v % y alcohol veratrílico 2.5 mM. Se inoculan (5´10<sup>6</sup> esporas/ml) y se rotulan como P1V1 (P1 significa con PVOH y V1 con alcohol veratrílico). La incubación de hace por 7, 10 y 14 días igualmente

Se hacen dos controles bajo las mismas condiciones (sin inoculo).

Todos los erlenmeyers se tapan con torundas de algodón estériles y se colocan a temperatura ambiente en el agitador orbital Heidolph Unimax 2010 a 150 r.p.m. por los días establecidos. Al final de la experiencia se filtra todo el contenido y se analiza la actividad de la LiP y los compuestos fenólicos.

### Ensayos con agitación neumática

Se realizan seis experimentos para los que se diseñan 3 tipos de biorreactores con diferentes características, descritos por Segura *et al*, 2002<sup>26</sup>. El primer biorreactor es de tipo tanque con agitación orbital y neumática; los otros dos son tipo columna de burbujeo de una sola etapa que difieren en su material de elaboración (vidrio o polipropileno). En estos experimentos se utiliza el mismo medio de cultivo o expresión de las LiP y la misma concentración de PVOH o de aserrín de pino que en los experimentos citados anteriormente. Se toman muestras del medio a diferentes tiempos de incubación para determinar la actividad de la LiP y de compuestos fenólicos.

### Determinación de la Actividad de la LiP

De los diferentes medios de cultivo ensayados se toman muestras de 2 ml, se filtran a través de membranas de 0.45 mm y se les determina la actividad de la LiP como se ha descrito por Kirk *et al*, (1986)<sup>27</sup>.

### Determinación de compuestos fenólicos (vainilla, ácido vainillínico).

Los compuestos fenólicos se extraen del medio extracelular previamente llevado a pH=2 con una solución de HCl 2N, con dos alícuotas de una mezcla de acetonitrilo-diclorometano (90:10). Se determina el espectro entre 200 y 400 nm, contra estándares de ácido vainillínico, vainilla y alcohol veratrílico en un espectrofotómetro Cary-50. Las muestras con espectros característicos se analizaron por HPLC<sup>11</sup>.

Efecto del burbujeo de aire y de la luz sobre la estabilidad de la vainilla.

Se diseña un ensayo control para determinar la estabilidad de la vainilla en los medios de cultivo sometidos al proceso fermentativo con burbujeo de aire y luz, factores que aceleran los procesos oxidativos del sistema ligninolítico del hongo causando mayor degradación de la vainilla que se va formando con

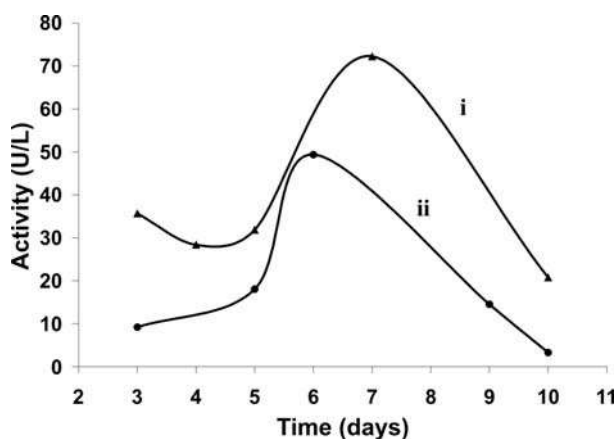
el tiempo. Se analizan durante 8 días, soluciones de vainilla (Sigma) al 0.01 % mg/ml en agua destilada sometidas a la luz a temperatura ambiente y a la luz y burbujeo de aire conjuntamente. Se realizan dos ensayos (por duplicado) en probetas de vidrio de 1L y 6 cm de diámetro. A cada probeta se añaden 500 mL de la solución de vainilla. Dos probetas se exponen a luz blanca y dos con luz y burbujeo de 300 mL/min de aire. Las soluciones se analizan por espectrofotometría UV haciendo barridos entre 200 y 400 nm, de cantidades iguales tanto de las soluciones estudiadas como de las soluciones estándar de vainilla y de ácido vainillínico, de concentración 0,01 % mg/ml de agua.

## RESULTADOS

### Ensayo de bioconversión con aserrín de pino.

En los cultivos de *P. chrysosporim* ( figura 1) se observa la actividad de la LiP de las muestras con AP y sin AP. El día de máxima actividad de la LiP para los ensayos que contenían AP fue el día 7 con una actividad de 72,24 U/litro, mientras que para los ensayos que no contenían AP fue el día 6 con una actividad de 49,38 U/litro. Los controles no presentaron ninguna actividad.

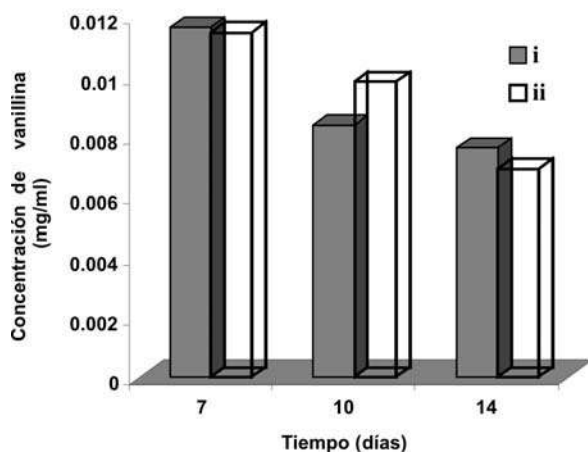
La actividad de la LiP en el décimo día del experimento para los ensayos AP3 y AP4 fue en promedio 72,69 U/litro.



**Figura 1.** Actividades promedio de la LiP en los medios inoculados con esporas del *Pc*: i. con AP 0.1 w/v % ii. sin AP.

### Obtención de vainilla con AP.

En la figura 2 se presenta la concentración de vainilla obtenida en los ensayos que contienen AV, con y sin PVOH. Los ensayos sin AV dieron poco reproducibles y la producción de vainilla solo se encontró en muy baja concentración el día 14. La presencia la vainilla, desde el día 7 hasta el día 14, en los experimentos que contienen alcohol veratrílico (AV), confirman su importancia en la estabilización del sistema enzimático del *Phanerochaete chrysosporium*.



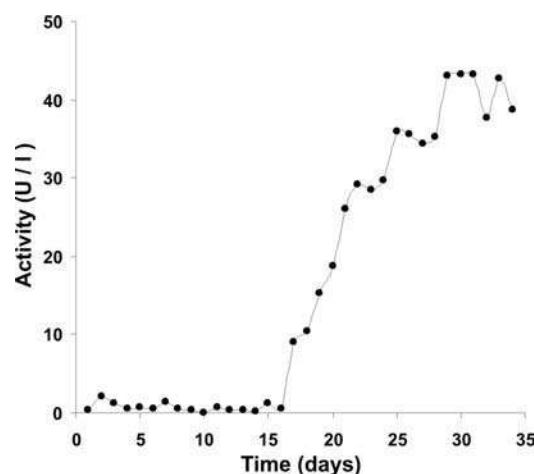
**Figura 2.** Concentración de vainilla obtenida en cultivos inoculados con esporas de *Pc* con 0,1 w/v% de AP y 2,5 mM AV. i. Con 0,1 w/v % PVOH . ii. Sin PVOH.

Las actividades de la LiP obtenidas no se muestran porque fueron muy similares a las obtenidas en el ensayo de bioconversión del aserrín de pino solo, mostrado previamente (fig 1). Los resultados muestran que hay una correlación (ver fig 2, día 7), entre una mayor actividad de la LiP con la mayor concentración de vainilla, en los experimentos en cultivos suplementados con aserrín de pino y con alcohol veratrílico. El PVOH parece no tener influencia en la producción de vainilla en éste sistema, ya que los resultados son similares en presencia y en ausencia de PVOH.

### Ensayos con agitación neumática.

En este sistema se inyecta aire entre 300 mL/min y 750 mL/min. Se estudio la producción de LiP en tres tipos de fermentadores<sup>26</sup>; el sistema que muestra la mayor rata de producción de LiP es en el biorreactor de vidrio tipo columna. La actividad de

la LiP obtenida en éste biorreactor se muestra en la figura 3, donde se ve que la actividad aumenta gradualmente hasta alcanzar máxima actividad el día 30 (43.22 U/l). Aunque la actividad enzimática va aumentando con el tiempo, el metabolismo secundario del hongo se retrasa (máxima actividad de la LiP el día 30) y se obtiene menor actividad comparada con la obtenida en los otros experimentos. El retraso en el metabolismo primario se debe al desarrollo del micelio en forma aglomerada, porque con esta morfología el hongo sólo crece en los extremos de los filamentos<sup>28</sup>; la toma de oxígeno y nutrientes es menor y esto se refleja finalmente en una baja tasa de crecimiento<sup>29</sup>.



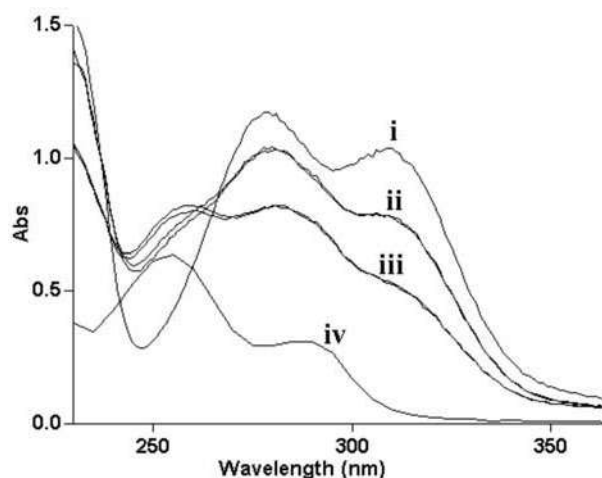
**Figura 3.** Actividad de la LiP en medios inoculados con esporas del *Pc* conteniendo PVOH al 0,1 p/v % en un biorreactor tipo columna de burbujeo.

En el análisis de los compuestos fenólicos que se extraen del medio extracelular en los experimentos agitados con aire como se describió en materiales y métodos, no se observaron los espectros característicos de la vainilla; en cambio se presentaron los de alcohol veratrílico y del ácido veratrílico.

Resultados del burbujeo de aire y de la luz sobre la estabilidad de la vainilla

En el figura 4 se presentan los espectros de las soluciones de vainilla sometidas a la exposición de luz y a aireación. Se observa que las soluciones expuestas al burbujeo y a la luz pierden su estabilidad más rápido que las expuestas solamente a la luz. En los barridos se observa la disminución progresiva de los picos de la vainilla y la aparición de las bandas características al ácido vainillínico o vainilla oxidada.





**Figura 4.** Espectros UV de las diferentes soluciones de vainilla al 0.01w/v % expuestas a la luz y burbujeo: **i.** Día 0. **ii.** Día 3 solo con luz. **iii.** Día 3 con luz y burbujeo **iv.** Solución estándar de vainilla y ácido vainilínico al 0.01w/v %.

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio permiten predecir el potencial del uso de polímeros como el aserrín de pino para obtener mayor actividad de la LiP y correlacionarla con la producción de vainilla. Sin embargo, para el logro de éstos objetivos, todavía debe hacerse muchas investigaciones tendientes a estabilizar el sistema, ya que factores como la luz y el aire, y el tipo de biorreactor agitado o estático afectan su producción, como es el caso de los biorreactores neumáticos, donde el aire va oxidando la vainilla formada. En este aspecto, es muy promisoría la tecnología de bioprocesos de fermentación en estado sólido, los cuales se pueden llevar bajo condiciones estáticas, evitando los procesos de oxidación que el aire causa a los metabolitos formados; puede hacerse con pequeñas cantidades de sustrato (aserrín), obteniendo rendimientos muy eficientes de los metabolitos de interés, disminuyendo la contaminación ambiental y el sustrato gastado podría ser usado como posible alimento para animales<sup>30</sup>. Estas son alternativas que continuamos investigando.

Se tiene bien establecido que el alcohol veratrílico es el sustrato fisiológico para la LiP. La función del alcohol veratrílico se confirma en éste trabajo. El mecanismo de la actividad enzimática del *Phanerochaete chrysosporium* con respecto a la degradación de

compuestos recalcitrantes y xenobióticos<sup>31</sup>, que se ha estudiado por más de 15 años permanece desconocido. Como lo han descrito Johjima et al (1999)<sup>32</sup>, los sustratos no son capaces de aproximarse al grupo hemo de la LiP y consecuentemente las reacciones iniciales son realizadas por pequeños mediadores redox que pueden oxidar esas estructuras.

Es un hecho conocido que el aserrín de pino es un material ligninocelulósico muy difícil de degradar que se produce en grandes cantidades. Por eso es muy interesante la opción de utilizarlo como sustrato en fermentaciones con hongos ligninolíticos capaces de degradar la lignina y recuperar parte de las estructuras aromáticas contenidas en su estructura para la obtención de metabolitos secundarios de valor comercial.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tien M. and Kirk T. K. (1983) "Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* burds". Science. 221: 661-663.
2. Glenn J. K.; Morgan M. A.; Mayfield M.B.; Kuwahara M. and Gold M. H. (1983) "An extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*". Biochem. Biophys. 114: 1077-1083.
3. Kuwahara M.; Glenn J. K.; Morgan M. A. and Gold M. H.. (1984) Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidases from lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*". FEBS Lett., 169: 247-250.
4. Morohoshi N. ACS Symposium. Series 460. (1990) "Enzymes in biomass conversion". Ed. Gary F. Leathan. Chapter 17: 207-223.
5. Bumpus J. A. and Aust S. D. (1987) "Biodegradation of environmental pollutants by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* involvement of the lignin-degrading system". Bioessays 6: 166-170.
6. Jiménez G.A., Penninckx M.J. and Lejeune R.. (1997) "The relationship between pellet size and production of Mn (II) peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium* in submerged culture". Enzyme and Microb. Technol. 21: 537-542.
7. Jeffries T. W.; Choi S. and Kirk T. K. (1987) "Nutritional regulation of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*". Appl. Environm. Microb. 42: 290-296.
8. Cameron M. D.; Timofeevski S. and Aust S. D. (2000) "Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics". Appl Microbiol. Biotechnol. 54, 751-758.
9. Finch C.A.. (1992) *Poly(vinylalcohol), developments*. Wiley & Sons, New York,
10. Mejía A. I., López B.L. and Mulet PA. (1999) Biodegradation of poly(vinylalcohol) with enzymatic extracts of *phanerochaete chrysosporium*. Macromolecula Chem. Phys. Symposia. 148, 131-147.
11. Mejía A. I., López . B. L. and Hess M.. (2003) "Bioconversion of poly (vinylalcohol) -PVOH- to vanillin in a *Phanerochaete chrysosporium* culture medium". Research Material Innovations, 7 (3), 144-148.
12. Muheim A. and Lerch K. (2001) "Towards a high-yield bioconversion of ferulic acid to vanillin". Biotech. Progress, Jan, 457-461.

13. Li T. and Rosazza J. P. N. (2000) "Biocatalytic synthesis of vanillin". *Appl. and Environm. Microb.*, 66 (2), 684-687.
14. Moritani T. and Yamauchi J. *Polymer*, 39 (3), 559-572, 1998.
15. Kalincha, A.A. 1978. *Les-selskomu khozyaistvu*. [El bosque para la agricultura.] Lesnaya Promishlennost. Fecha de acceso abril de 2002.
16. Vidal, A.. (1995) "Estudio de las posibilidades de aprovechamiento de la biomasa de copa de coníferas en la provincia Pinar del Río". Tesis doctoral, Universidad de Pinar del Río, Cuba.
17. Álvarez Godoy E., Díaz Aguirre S. y Alessandrini Díaz M. (2002) Centro de Estudios de Biomasa Forestal, Universidad de Pinar del Río, Cuba.
18. Thompson D. N., Hames B. R., Reddy C. A. and Grethlein H.E. (1998) "In vitro degradation of natural insoluble Lignin in aqueous media by the extracellular peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*" *Biotech. And Bioeng.* 57 (6), 704-717.
19. Akileswaran L., Brock B. J., Cereghino J. L. and Gold M. H. (1999) "1,4- Benzoquinone reductase from *Phanerochaete chrysosporium*: cDNA cloning and regulation and expression", *Appl. And Environm. Micob.*, 65 (2), 415-421.
20. Hocking M. B. (1997) "Synthetic flavoring from spent sulfite liquor". *Journal of Chemic. Educ.* 74 (9), 1055-1059.
21. Krings U. and Berger R. G. (1998) "Biotechnological production of flavours and fragrances" *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49, 1-8.
22. Walton N. J., Narbad A., Faulds C. B., Williamson G. (2000) "Novel approaches to the biosynthesis of vanillin [Review]". *Current Opinion in Biotechnology.* 11(5):490-496,
23. Van den Heuvel R. H.H., Fraaije M. W., Laane C. van Berkel W. J.H. (2001) "Enzymatic synthesis of vanillin". *Journal of Agricultural & Food Chemistry.* 49(6):2954-2958.
24. Penninckx M. and Jiménez G.A. (1996) "Transformación Microbiológica de la Biomasa, Curso teórico-práctico". Université Libre de Bruxelles and Universidad de Antioquia. Medellín, Abril 22-27.
25. Bonnarme P and Jeffries T.W. (1990) "Mn (II) regulation of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidases from lignin-degrading white rot fungi". *Appl. Environm. Microb.* 56: 210-217.
26. Segura F., Mendoza N., Mejía A. I.. (2002) "Ensayo de diferentes tipos de biorreactores para escalar la producción de la enzima ligninoperoxidasa en cultivos sumergidos de *Phanerochaete chrysosporium*". *Vitae*, (2),.
27. Kirk T. K., Tien M., Kersten P.J., Mozuch M. D. and Kalyanaraman B. (1986) "Ligninase of *Phanerochaete chrysosporium*. Mechanism of its degradation of the non-fenolic arylglycerol B-aryl ether substructure of lignin". *Biochem J.* 236: 279-287..
28. Jiménez-Töbon G., Kurzatkowski W, Rozbicka, B., Solecka J., Poci I. and M.J. Penninckx.. (2003) "In situ localization of Manganese peroxidase production in mycelial pellets of *Phanerochaete chrysosporium*". *Microbiology. Nov.*
29. Meyrath and Bu'Lock, (1977) *Biotechnology and fungal differentiation*. FEMS Symposium N°. 4. Academic Press INC. LTDA. London. p 167, 138, 186.
30. Mitchell D.A., Marin B., Krieger N. (2000) *Biochemical Engineering Aspects of Solid State Bioprocessing*. Managing Editor: Th. Scheper © Springer-Verlag Berlin Heidelberg Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology, Vol. 68.
31. Cameron M. D.; Timofeevski S. and Aust S. D. (2000) "Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics". *Appl Microbiol. Biotechnol.* 54, 751-758.
32. Johjima T., Itoh N., Kabuto M., Tokimura F., Nakagawa T., Warrishi H. and Tanaka H. (1999) "Direct interaction of lignin and lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*". *Proc. Natl Acad Sci USA* 96, 1989-1994.

Fecha de Recibo: Mayo 18 de 2004

Fecha de Aceptación: Agosto 10 de 2004

Mediante resolución del Ministerio de Educación Nacional número 1177 del 4 de mayo de 2004, se autoriza por 7 años el registro calificado al programa de Tecnología de Alimentos en la sede del Municipio de Envigado.

Servicios de extensión de la Facultad de  
Química Farmacéutica  
**LABORATORIO ESPECIALIZADO DE ANÁLISIS**  
**-LEA-**

Presta el servicio de verificación de la calidad a materias primas,  
medicamentos, alimentos, cosméticos y similares.



**Mayores Informes**

Teléfono: 2 10 54 58 Telefax: 2 10 54 56

Dirección electrónica: [lea@farmacia.udea.edu.co](mailto:lea@farmacia.udea.edu.co)

SERVICIOS DE EXTENSIÓN DE LA FACULTAD DE QUÍMICA  
FARMACÉUTICA Y ESCUELA DE NUTRICIÓN Y DIETÉTICA  
**LABORATORIO DE ANÁLISIS SENSORIAL**

**Presta servicios a:** \* Industrias de alimentos  
\* Trabajos de investigación

**Cuenta con:** Jueces capacitados bajo normas técnicas  
Colombianas NTC 4129 y 4130

**Informes:** Universidad de Antioquia  
Fax 2 30 50 07 Medellín –Colombia  
Correo electrónico: [labsensorial@pijaos.udea.edu.co](mailto:labsensorial@pijaos.udea.edu.co)