

FIRMA INVITADA**APLICACIÓNS DOS FUNGOS
LIGNINOLÍTICOS Ó TRATAMENTO DE
RESIDUOS E Ó BIOBLANQUEO DE PASTA
DE CELULOSA****LEMA, Juan M.****FELJOO, G.***Dpto. de Enxeñería Química*

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

INTRODUCCIÓN

Os afeccionados á búsqueda de cogumelos nas nosas fragas, non lles prestamos unha atención especial a aqueles, como o amosado na figura 1, *Trametes versicolor*, que medran sobre madeira. O máis probable é que, aínda que puideran ser comestibles, non foran agradables de sabor. Sen embargo, moitos destes fungos presentan unha característica extraordinaria xa que son capaces de degrada-los constituíntes da madeira incluíndo a lignina.



Figura 1. Trametes versicolor

A lignina é o segundo composto orgánico máis abundante na biosfera, sobrepasado soamente pola celulosa. Esta confire resistencia ás paredes da planta formando unha rede tridimensional sobre as microfibras de celulosa. Posúe unha estrutura moi complexa consistente nunha rede amorfa de subunidades de fenilpropano

en secuencia non repetida unidas por varios enlaces carbono-carbono e éter entre os carbonos do anel e das cadeas laterais (Figura 2).

A eliminación e separación de lignina da celulosa é o proceso fundamental na industria papelera. Tamén a posibilidade de biodegradar ou modifica-la lignina implicaría a mellora na eficiencia do emprego da celulosa e hemicelulosa da biomasa vexetal como substratos de fermentación para obtención de combustibles e compostos orgánicos, así como o acceso a outro polímero de gran abundancia na natureza como a lignocelulosa. Así mesmo, a degradación hidrolítica e a desmetoxilación da lignina permitiría obter monómeros fenólicos e outros produtos químicos de gran interese industrial, como por exemplo a vainillina e o ácido vainílico empregados na industria farmacéutica, co que se atinxiría un maior aproveitamento dos recursos dispoñibles.

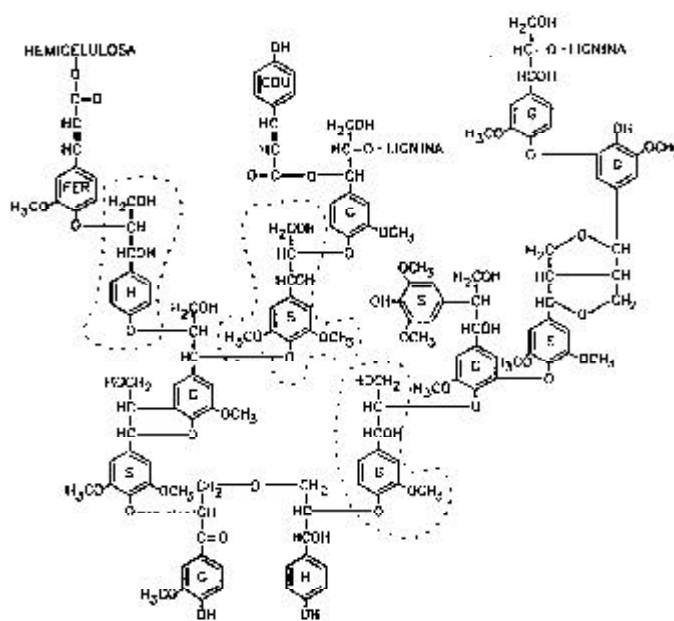


Figura 2. Estructura proposta para a lignina, onde se detallan os monómeros básicos da mesma: alcohol cumarílico (H), alcohol coniferílico (G) e alcohol sinapílico (S)

Entre os fungos ligninolíticos podéanse distinguir tres grupos ben diferenciados: os fungos de putrefacción branda, putrefacción escura e putrefacción branca. Os fungos de putrefacción branda están constituídos por certos ascomicetos e deuteromicetos capaces de ataca-la madeira baixo condicións de alta humidade, caracterizándose polo amolecemento dos tecidos da mesma acompañado dunha significativa perda de peso. Os fungos de putrefacción escura son basidiomicetos

que principalmente descompoñen os polisacáridos da madeira, pero que baixo certas condicións atacan a lignina, pero non son capaces de recubrila totalmente.

Os que presentan un maior interese son os fungos de putrefacción branca, xa que son capaces de degradar tódolos compoñentes da madeira, incluíndo a oxidación da lignina. A velocidade relativa de degradación de celulosa, hemicelulosa e lignina varía segundo o fungo e as condicións ambientais, que determinan a potencialización dun ou outro mecanismo de acción. Entre estes fungos, que na súa maioría son basidiomicetos, *Phanerochaete chrysosporium* é a especie máis estudada pola súa actividade e pola facilidade de manexo que presenta (crecemento rápido, produción de esporas e posibilidade de medrar sobre un medio químicamente definido).

2. SISTEMA ENZIMÁTICO LIGNINOLÍTICO

O sistema enzimático ligninolítico presente nos fungos de putrefacción branca é moi complexo, e implica diferentes actividades, algunhas básicas e outras complementarias, todas elas necesarias para completa-lo proceso (figura 3).

- *Oxidasas*. Entre estas enzimas atópanse as que producen peróxido de hidróxeno, como a glucosa oxidasa, glioxal oxidasa ou aril alcohol oxidasa. A acción da lacasa e diferente xa que non produce peróxido se non que utiliza o osíxeno para realiza-la acción degradativa.
- *Peroxidasas*. Descompoñen o peróxido de hidróxeno, dando lugar a osíxeno atómico que é o axente iniciador do proceso oxidativo. De entre elas as máis destacadas son a lignina peroxidasa (LiP) e a manganeso peroxidasa (MnP).
- *Enzimas* productoras de metabolitos como alcoholes (alcohol veratrílico) ou ácidos (oxálico,), que actúan como axentes protectores ou estabilizantes.

Por seren as enzimas máis específicas dos fungos ligninolíticos, preséntanse a continuación, as principais características da LiP, MnP e Lacasa así como os seus mecanismos de actuación.

Lignina peroxidasa

Foi descuberta no líquido de *P. chrysosporium* unha vez comezado o seu metabolismo secundario baixo condicións limitantes de nitróxeno (Tien e Kirk, 1983). A LiP está constituída por diversas isoenzimas de peso molecular entre 38.000 e 43.000, con puntos isoeléctricos entre 3,3 e 4,7. Estas isoenzimas son glicoproteínas cun grupo hemo do tipo oligomanosas cun ou máis puntos de N-glicosilación e posiblemente tamén con O-glicosilación. A LiP cataliza unha variedade de oxidacións, todas dependentes do peróxido de hidróxeno, amosando unha ampla especificidade para substratos aromáticos.

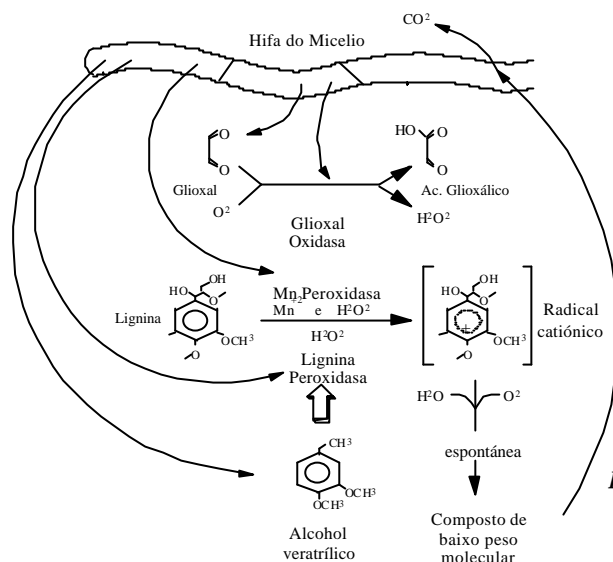


Figura 3. O sistema ligninolítico dos fungos de putrefacción branca

A figura 4 amosa o ciclo catalítico da LiP, semellante ó doutras peroxidases. O ciclo comeza coa oxidación da enzima a LiP I (composto intermediario, complexo radical catiónico do Fe⁺⁴) mediante o peróxido de hidróxeno. O composto LiP II (complexo Fe+4) xérase en presenza dun doador de electróns (por exemplo, un aromático fenólico ou non fenólico producindo un radical aromático fenoxilo (R[•]). Compre unha segunda redución, empregando outro substrato para xera-la enzima nativa e un radical (R[•]). Na presenza dun exceso de H₂O₂, a LiP convértese irreversiblemente nun intermediario inactivo, LiP III (complexo Fe⁺³ superóxido).

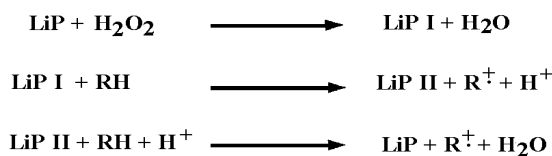
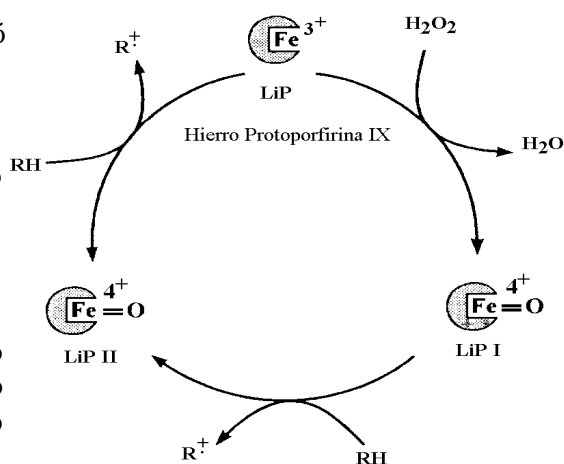


Figura 4. Ciclo Catalítico da LiP

Manganeso peroxidasa

A MnP (Figura 5) é a peroxidasa máis común nos fungos de putrefacción branca, atopándose en maior ou menor grao case que en tódolos fungos illados ata o momento, e cun papel determinante no seu mecanismo oxidativo. A MnP ó igual que a LiP é unha glicoproteína cun grupo hemo e un peso molecular aproximado de 46.000. Foi descrita por primeira vez en *P. chrysosporium* (Kuwahara *et al.*, 1984).

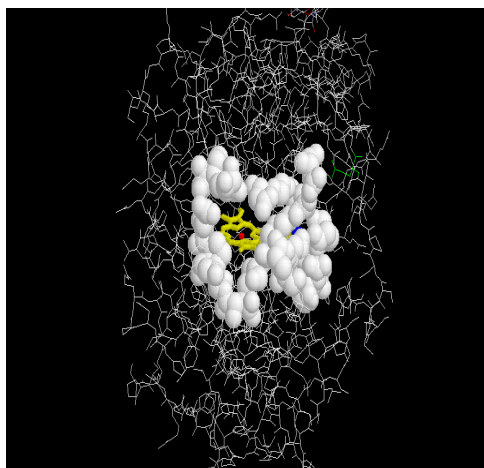


Figura 5. Estructura da MnP de *P. chrysosporium*. En forma tridimensional amósase o sitio activo da enzima co grupo hemo no centro.

A principal función da MnP é propicia-la oxidación de Mn^{2+} a Mn^{3+} mediante o osíxeno producido trala descomposición do H_2O_2

(Figura 6). O Mn^{3+} pode oxidar, á súa vez, unha variedade de compostos fenólicos e non fenólicos. Con tal de estabiliza-lo Mn^{3+} o fungo produce, como xa foi dito, axentes complexantes como ácidos dicarboxílicos ou α -hidroxilos.

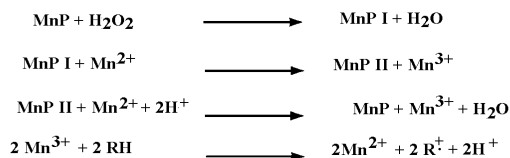
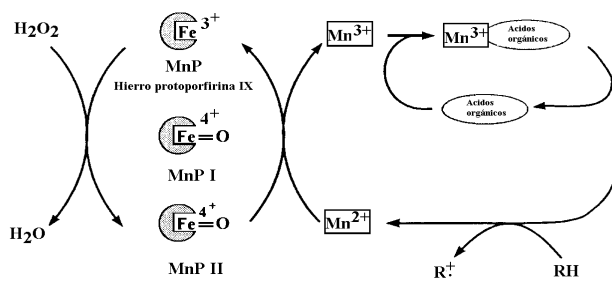


Figura 6. Ciclo catalítico da MnP.

Lacasa

Tal como se indicou anteriormente, a Lacasa é unha oxidasa que permite efectuar a oxidación de macromoléculas utilizando o osíxeno molecular, catalizando a oxidación de o- e p-difenoles, aminofenoles, poliamidas e polímeros de lignina. Para a súa actividade necesita a presenza dun composto intermedio (mediador), de estrutura moi complexa, que actúa como transporte de electrones cara o substrato.

3. BIODEGRADACIÓN DE COMPOSTOS ALTAMENTE POLUENTES

Os primeiros estudos de biodegradación de compostos orgánicos aromáticos datan de comezos de século, cando se illaron bacterias capaces de empregar este tipo de compostos como única fonte de carbono. Na década dos 70 ten sido profusamente estudiada a degradación de xenobióticos por microorganismos, atopándose que fundamentalmente o mecanismo tiña lugar intracelularmente e que a molécula de osíxeno xogaba un papel primordial. Mais a capacidade de biodegradación destes compostos redúcese ós de baixo peso molecular, pois os de alto peso molecular resisten o ataque microbiano debido a varios factores:

- A maioría dos sistemas microbiolóxicos actúan en fase acuosa polo que ven imposibilitada a súa acción sobre compostos moi hidrófobos.
- Estes compostos presentan unha gran absorción sobre das partículas sólidas constituíntes dos sedimentos, chans, etc., o cal dificulta a súa biodegradabilidade ó ser menos “biodisponíbles”.
- A maioría dos sistemas bacterianos non son capaces de degradar os compostos orgánicos altamente tóxicos en baixos niveis de concentración, debido fundamentalmente a tres razóns:
 - A baixas concentracións non se activan os correspondentes sistemas enzimáticos degradativos
 - Aínda que cheguen a estar presentes, posúen unha baixa afinidade, o que conleva unha incompleta degradación.
 - Quizais, o maior problema sexa que a maioría dos microorganismos non son capaces de degradar enlaces tan diversos, como os que se presentan neste tipo de compostos.
- Como alternativa, podería pensarse na enxeñería xenética, pero pode suceder que os microorganismos modificados non sexan capaces de competir cos microorganismos dos propios efluentes industriais.

En contraposición, como xa se sinalou, os fungos de putrefacción branca caracterízanse por posuír un sistema enzimático extracelular de carácter non específico, capaz de romper unha gran cantidade de enlaces diferentes. Polo tanto, non é de estrañar que estes fungos sexan capaces de degradar substratos pobremente biodisponíbles, tales como a maioría dos compostos orgánicos altamente tóxicos, incluíndo certos hidrocarburos poliaromáticos, clorofenois, policlorobifenilos, (PCB), trinitrotolueno (TNT), dioxinas, funxicidas e pesticidas. Diversos autores puxeron de manifesto que tanto a LiP como a MnP están directamente involucrados no mecanismo de degradación.

En cultivos en estado sólido con *P. chrysosporium* tamén se observou a capacidade de biodegradar os compostos xenobióticos antes sinalados, por exemplo o pentaclorofeno e o benzo[a]pirreno, o que supón unha vantaxe para poder ser usados na biorremediación de chan e sedimentos. Así mesmo ademais de *P. chrysosporium* outras cepas teñen demostrado unha gran capacidade de degradar os poliaromáticos (Field *et al.*, 1993) (Figura 7).

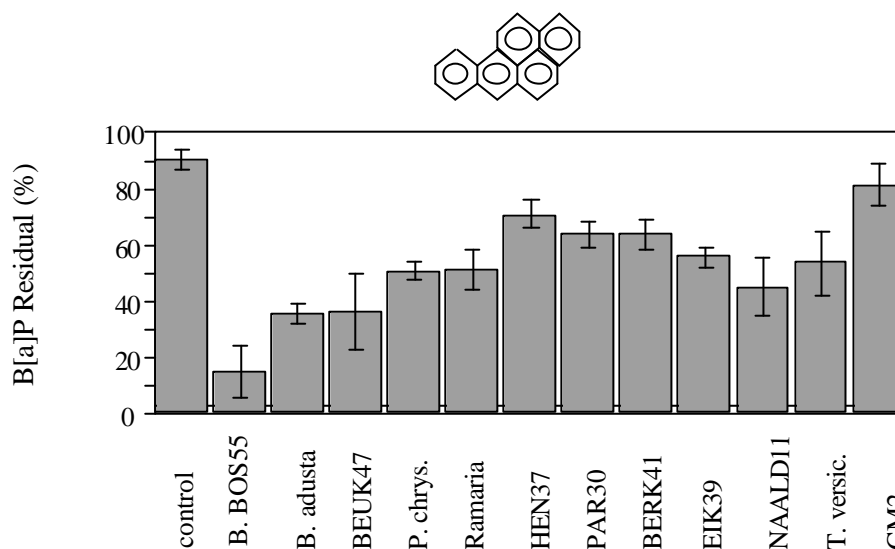


Figura 7. Biodegradación de benzo[a]pirreno por diversos fungos ligninolíticos tras 28 días de incubación

4. ELIMINACIÓN DA COR DOS EFLUENTES INDUSTRIAIS

A eliminación da cor de efluentes industriais é un problema de especial importancia no tratamento de augas. Ademais, unha elevada cor das augas vai a miúdo asociado á presenza de contaminantes tóxicos de estrutura complexa e de

moi difícil biodegradabilidade. Aínda que se dispón de tratamentos físico-químicos, tales como a coagulación-sedimentación, absorción, branqueo con ozono ou cloro, intercambio iónico sobre resinas sintéticas, ósmose reversa etc., os devantidos procesos presentan como principal desvantaxe uns altos custes de operación e unha limitada aplicabilidade (Cooper, 1993). Os procesos convencionais de tratamento biolóxico (aerobio-anaerobio), se ben teñen sido aplicados con éxito no tratamento e detoxificación de numerosos efluentes industriais, son relativamente ineficaces na decoloración de efluentes da industria papeleira, téxtil e de fermentación alcohólica, que empregan melazas como fonte de carbono.

A cor presente nas augas residuais da industria da madeira débese principalmente á lignina e ós derivados de alto peso molecular da mesma, os cales non contribúen nin na demanda bioquímica de osíxeno nin na toxicidade, dado que os microorganismos teñen dificultades na súa asimilación polo impedimento que supón o que atravesen as súas membranas. A súa bioacumulación e a baixa velocidade de despolimeración pode supor nos ríos e lagoas, a longo prazo, unha diminución da luminosidade das augas, ó actuar como grupos de absorción da mesma, e por tanto, unha diminución da fotosíntese que pode alterar finalmente o ecosistema por unha menor concentración de osíxeno disolto. As industrias téxtiles consumen grandes cantidades de auga e compostos químicos asociados a cada unha das etapas que teñen lugar no proceso, como descolado, limpeza, branqueo, tinte, impresión e remate. Estes compostos son substancias orgánicas, inorgánicas e elementos poliméricos. Hai máis de 8.000 produtos químicos asociados ó proceso de tintado edispóñense duns 100.000 tintes comerciais. Os procesos de fermentación empregando melazas como fonte de carbono (producción de levaduras, etanol, etc.) xeran efluentes cunha alta carga orgánica, pero tamén cunha forte cor, debido á presenza de compostos orgánicos de alto peso molecular tipo melanoidinas.

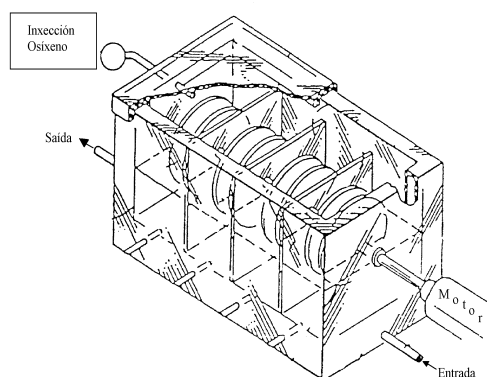


Figura 8. Sistema MyCoR para decoloración de efluentes

Decoloración de Efluentes da Industria da Madeira

Dous sistemas, MyCoR (“mycelial color removal” e MyCoPOR (“mycelial color removal in porous carrier”), teñen sido patentados para a eliminación da cor e dos compoñentes organoclorados dos efluentes da industria da madeira. O sistema MyCoR (Figura 8) consiste nun reactor de contacto biolóxico rotacional no cal *P. chrysosporium* está inmobilizado formando unha película nuns discos rugosos, tal como se amosa na figura 8. O sistema MyCoPOR (Figura 9) consiste nun filtro percolador onde *P. chrysosporium* está inmobilizado nun soporte poroso (espuma de poliuretano), realizándose a aireación pola parte inferior cun condensador adosado para así evita-la perda de auga pola evaporación. Fontes suplementarias de carbono, como glucosa ou celulosa, no reactor proporcionan unha maior efectividade, conseguíndose velocidades diarias de decoloración de ata 50-80%. O principal problema de aplicabilidade dos dous sistemas radicaba nun excesivo crecemento do fungo filamentososo que daba lugar a unha compactación do sistema coas conseguintes perdas de carga do mesmo, polo que a súa operación víase dificultada e encarecida. Estudos posteriores trataron de deseñar novos biorreactores que puideran evitar este inconveniente, ademais de poder traballar directamente coas enzimas oxidativas en sistema “in vitro”, mais ata o momento trátase de traballos a escala laboratorio (Feijoo e Lema, 1995).

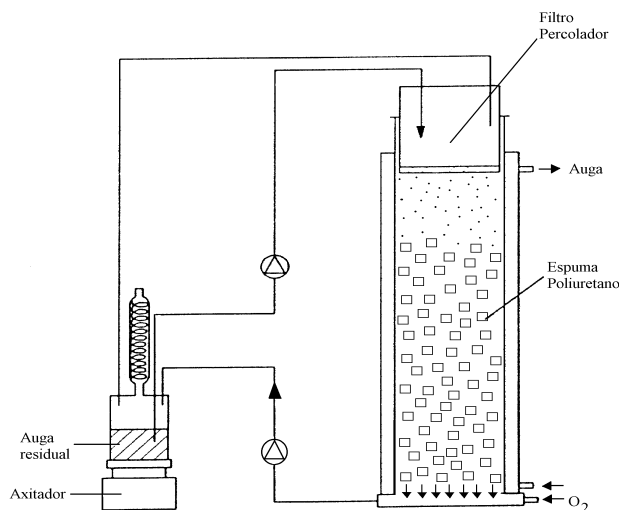


Figura 9. Sistema MyCoPOR

Decoloración de tintes industriais.

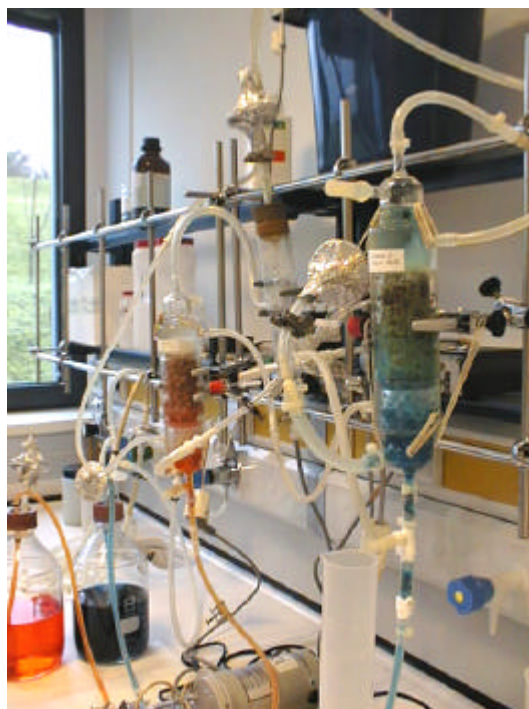
Baseándose na estrutura química dos grupos cromóforos, os tintes clasifícanse en tres grupos fundamentais (Figura 10): a) tipo azo (por exemplo, Bermello Congo, Orange II); b) tipo antraquinona e antrapirodina (Poly B-411 e Poly R-478, respectivamente); c) tipo talocianina (por exemplo o Reactive blue 38). Os tintes tipo azo son o grupo comercial máis importante; as talocianinas son empregadas para produción de tintes verdes, azuis e pigmentos.

A maioría dos experimentos na degradación de tintes por fungos ligninolíticos leváronse a cabo en matraces erlenmeyer cunha completa eliminación da cor incluso con sucesivas adicións do tinte. Pero como xa se sinalou a súa extensión a sistemas que operen en continuo vese dificultado polo feito de que nestes cultivos prodúcese finalmente a interconexión entre as biopartículas o que provoca innumerables problemas operacionais tales como o ensuciamento das sondas, crecemento nas liñas de alimentación, compactación do leito e unha perda de eficacia do proceso. A inmovilización sobre un soporte deste tipo de fungos pode ofrecer vantaxes tales como a de atinxir elevadas densidades celulares no biorreactor, así como unha mellor resistencia mecánica en operacións levadas a cabo durante períodos longos.



Figura 10. Estructura do Orange II (tinte tipo azo) e do Reactive Blue 38 (tinte tipo talocianina)

Co obxectivo de deseñar un sistema que sexa capaz de aplicarse ós sistemas industriais, no noso grupo de investigación estanse a desenvolver diversos traballos de investigación para atinxir unha decoloración en biorreactores operados en continuo con *P. chrysosporium* inmovilizado en espuma de poliuretano, cunha estratexia de alimentación e inxección de aire/osíxeno en pulso que permita un control da morfoloxía e o tamaño das biopartículas. Os resultados previos, a escala laboratorio, son moi satisfactorios xa que se obteñen porcentaxes de decoloración próximas ó 95% durante períodos de ata 4 meses de operación (Figura 11).



*Figura 11. Biorreactores de leito fixo con *P. chrysosporium* inmobilizado en espuma de poliuretano que mediante unha estratexia de operación axeitada son capaces de decolorizar o Orange II e o Reactive Blue 38 de forma continua.*

5. BIOBRANQUEO DE PASTA DE PAPEL

O proceso de produción da pasta de celulosa require dun paso inicial de pulpeo despois do descortezado e estelado da madeira. O propósito do pulpeo é reduci-lo contido en lignina co gallo de facilita-la separación das fibras e mellora-las súas propiedades físico-químicas que favorezan unha mellor calidade do papel. Existen basicamente dous métodos para levar a cabo o devandito proceso: o pulpeo mecánico e o químico, representando un 33% e 67% da produción total, respectivamente. A maioría do pulpeo químico faise seguindo o denominado proceso Kraft (o sulfato) ou o proceso ó sulfito. O proceso Kraft consiste en trata-las estelas de madeira a 160-180 °C cun licor (tamén denominado lixivia branca) que contén hidróxido de sodio e sulfuro de sodio que promoven a ruptura dos enlaces éter na lignina. Os produtos de degradación da lignina disólvense no licor alcalino de pulpeo (chamado lixivia ou licor negro). Dependendo das condicións de pulpeo obtéñense

nesta fase do proceso unha redución na lignina entre un 90-95%. Agora ben, a lignina restante non se pode eliminar sen danar seriamente as cadeas de polisacáridos e por ende a calidade da pulpa, sendo esta responsable dunha cor fortemente escura da pasta de celulosa obtida.

Para acadar un grao de brancura axeitado e reducir esa lignina residual cómpre establecer unha serie de etapas de branqueo con axentes químicos, sendo o cloro e o dióxido de cloro os máis comúns, alternadas con extraccións alcalinas (NaOH). Para a elección dunha determinada secuencia cómpre ter en conta non tan só as características iniciais e finais que se desexen na pasta, senón tamén o cumprimento das restricións medioambientais impostas pola lexislación con respecto á composición dos efluentes xerados e da propia pasta. Unha secuencia clásica de branqueo con cloro supón a produción de efluentes cun alto contido en compostos organoclorados, que supoñen un dos maiores riscos medioambientais da industria de pasta celulósica e papel (Vidal *et al.*, 1997). A minimización da presenza de compostos organoclorados nestes verquidos fixo muda-la concepción das tecnoloxías convencionais de branqueo, desenrolándose novas secuencias onde o cloro elemental tense substituído polo dióxido de cloro (secuencias ECF, “elemental chlorine free”) ou por outros axentes branqueantes como osíxeno, ozono e/ou o peróxido de hidróxeno (secuencias TCF, “totally chlorine free”). Deste xeito atínxese unha clara diminución do impacto ambiental ó mellora-la biodegradabilidade e reduci-la toxicidade dos efluentes. Nembargantes, estes procesos supoñen custos adicionais de produción, podendo afectar á calidade da pasta de celulosa ó reaccionar coas cadeas de polisacáridos e diminuír, en consecuencia, o contido de celulosa da pasta de papel.

O emprego de procesos biolóxicos ou enzimáticos en diferentes procesos da industria de pasta e papel tense considerado tralo desenvolvemento de microorganismos cunha alta especialización, ben utilizados de forma directa (tratamento “*in vivo*”) ou ben mediante o uso das súas enzimas (tratamento “*in vitro*”) (Lema *et al.*, 1999). En canto ó biobranqueo de pasta de papel puxéronse en marcha diversas liñas de investigación: 1) Utilización dun prebranqueo mediante hemicelulasas, co obxectivo de reduci-lo uso de compostos químicos nas posteriores etapas de branqueo; 2) Emprego dunha secuencia de branqueo coas enzimas producidos por fungos ligninolíticos (Paice *et al.*, 1995; Moreira *et al.*, 1997).

No primeiro intento de empregar *Phanerochaete chrysosporium* como axente branqueante de pasta kraft conseguiuase reducir lixeiramente o contido en lignina aínda que produciu unha importante degradación da celulosa. Posteriormente, descubriuse que outros fungos, como *Trametes versicolor*, *Phanerochaete sordida* e *Bjerkandera* sp. BOS55 (Moreira *et al.*, 1997), tiñan unha alta capacidade para a delignificación selectiva sen afecta-lo contido en celulosa da pasta (Figura 12).

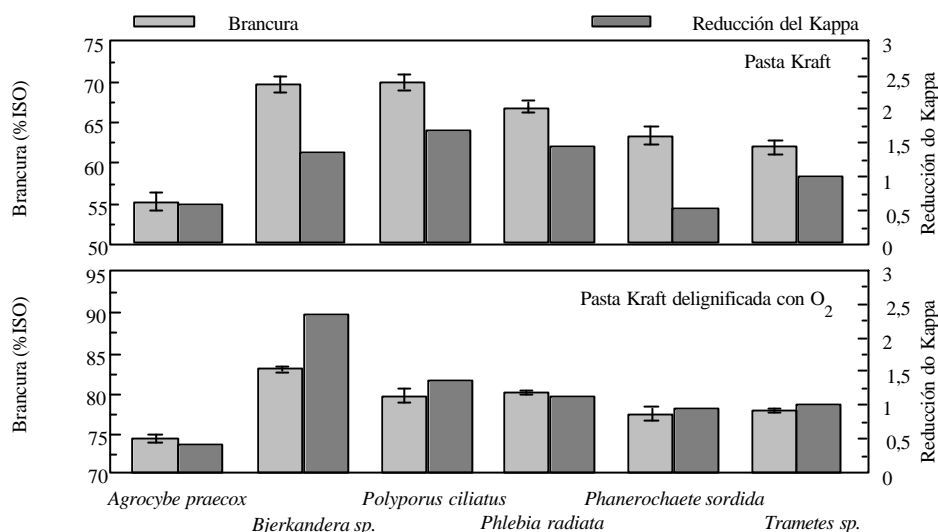


Figura 12. Reducción do número Kappa (indicador do contido en lignina) e brancura atinxida de pasta Kraft de *Eucalyptus* tralo tratamento con diversos fungos ligninolíticos

Existen traballos nos que se amosa como as enzimas ligninolíticas purificadas son capaces de producir un branqueo e delignificación limitado de pasta Kraft con tal de que o H₂O₂ se dosifique coidadosamente e as enzimas se incuben xunto cos cofactores de baixo peso molecular: alcohol veratrílico para LiP; o manganeso, ácidos orgánicos e tensioactivos para MnP (Paice *et al.*, 1995 e compostos aromáticos nitroxenados para Lacasa (Call e Mücke, 1997). O papel da LiP no biobranqueo da pasta de celulosa aínda non está moi claro xa que nos cultivos “in vivo” dos fungos ligninolíticos non se detectou ata o momento (Moreira *et al.*, 1997). A tecnoloxía do sistema Lacasa-mediador probouse con éxito a un ensaio da planta piloto con pastas de celulosa de diferentes madeiras. A actuación deste sistema mellorouse protexendo a enzima fronte á inactivación e reforzando a cinética da reacción para obter unha redución da cantidade do mediador que é o custe da produción principal do proceso. Para moitas pastas, poderíase obter un 50% de delignificación empregando 5 kg de mediador por tonelada de pasta. Un problema importante a resolver radica na elección dun mediador axeitado, posto que se ben os compostos aromático N-substituídos son moi eficaces no proceso de delignificación, son moi pouco biodegradables (Call e Mücke, 1997).

Existen numerosas evidencias que poñen de manifesto a importancia da MnP no branqueo biolóxico: 1) a actividade de MnP xeralmente atópase nos cultivos de

diversos fungos ligninolíticos con gran capacidade branqueante; (Moreira *et al.*, 1997), coincidindo ademais o nivel máximo da MnP co período de tempo no que ten lugar o branqueo da pasta de celulosa; 2) cepas mutantes de *Trametes versicolor* incapaces de sintetizar MnP non branquea, mentres que unha vez engadida a MnP consegue restaurar parcialmente a súa capacidade de branqueo; 3) A presenza de catalasa, unha enzima que destrúe o peróxido de hidróxeno, inhibe o branqueo; 4) atínxese delignificación con MnP purificada en sistema “in vitro” cando se engade o sistema Mn(II), Tween 80 (tensioactivo), ácido malónico (efecto tampón) e H₂O₂ nas concentracións axeitadas. Agora ben, neste sistema “in vitro”, tanto con MnP purificada como cos líquidos extracelulares dos fungos ligninolíticos, non se poideron obter, ata o momento, os excelentes resultados de brancura que se atopan cos cultivos “in vivo”. Isto pon de manifesto que soamente se consegue unha acción combinada da enzima, os seus cofactores necesarios e unha axeitada estabilización con ácidos orgánicos poderase acadalo obxectivo marcado. Nembargantes, as contribucións específicas de cada compoñente do sistema ligninolítico está aínda por definir (Moreira *et al.*, 1998).

6. PERSPECTIVAS

A implementación a un nivel piloto-industrial das aplicacións mencionadas dos fungos ligninolíticos ou das súas enzimas oxidativas require a solución de alomenos dúas cuestións importantes: 1) A produción de cantidades suficientes de enzimas oxidativas implicadas na degradación da lignina; 2) Un coñecemento detallado dos mecanismos de actuación das enzimas ligninolíticas e daqueles factores que o regulan nos sistemas *in vitro*. Ámbalas dúas cuestións estanse a abordar fondamente, entre outros, polo noso grupo de investigación. A aplicación con éxito deste sistema biotecnolóxico suporá unha alternativa de solución a unha gran variedade de problemas medioambientais.

7. REFERENCIAS

- Call, H.P. e Mücke, I. (1997) History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym[®]-process). *J. Biotechnol.* 53, 163-202.
- Cooper, P. (1993) Removing colour from dyehouse waste waters – a critical review of technology available. *JSDC* 109, 97-101.
- Eaton, D.C., Chang, H.M., Joyce, T.W., Jeffries, T.W. e Kirk, T.K. (1982) Method obtains fungal reduction of the color of extraction/stage kraft bleach effluents. *TAPPI J.* 65, 89-92.

- Feijoo, G. e Lema, J.M. (1995) Tratamiento de efluentes de industrias de la madera con compuestos tóxicos y recalcitrantes mediante hongos. *Afinidad* 52, 171-180.
- Field, J.A., de Jong, E., Feijoo, G. e de Bont, J.A.M. (1993) Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Trends in Biotechnol.* 11, 44-49.
- Kirk, T.K. e Yang, M.H. (1979) Partial delignification of unbleached kraft pulp with ligninolytic fungi. *Biotechnol. Lett.* 1, 347-352.
- Kuwahara, M., Glenn, J.K., Morgan, M.A. e Gold, M.H. (1984) Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures from *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* 169, 247-250
- Lema, J.M., Moreira, M.T., Palma, C. e Feijoo, G. (1999) Clean biological bleaching processes in the pulp and paper industry. Olgin, E. (Ed.). *Environmental Technology and Cleaner Processes*. Taylor & Francis, New York (en prensa).
- Moreira, M.T., Sierra-Alvarez, R., Feijoo, G., Lema, J.M. e Field, J.A. (1997). Biobleaching of oxygen delignified kraft pulp by several white-rot fungal strains. *J. Biotechnol.*, 53, 237-251.
- Paice, M.G., Bourbonnais, R., Reid, I.D., Archibald, F.S. e Jurasek, L. (1995). Oxidative bleaching enzymes: A review. *J. Pulp Pap. Sci.* 21, 280-284.
- Swamy, J. e Ramsay, J.A. (1999) The evaluation of white-rot fungi in the decolorization of textile dyes. *Enzyme Microb. Technol.* 24, 130-137.
- Tien, M. e Kirk, T.K. (1983) Lignin-degrading enzyme from the myxomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Science*, 221, 661-663.
- Vidal, G., Soto, M., Méndez-Pampín, R., Field, J.A. e Lema, J.M. (1997) Anaerobic biodegradability and toxicity of wastewaters from chlorine and total chlorine free bleaching of eucalyptus kraft pulps. *Wat. Res.* 31, 2487-2494.