

Universidad de Oriente
Centro de Estudios de Biotecnología Industrial



Tesis en opción al título académico de Master en
Biotecnología.
Mención Ambiental.

Título: Evaluación de la biodegradación del Extracto Líquido de
Pulpa con *Pleurotus sp.*

Autor: Héctor Ihosvani Álvarez Cortés.

Tutores: Dr. Rosa Catalina Bermúdez Sabón.
MSc. Suyén Rodríguez Pérez.

Consultante: MSc. Nora García Oduardo

Santiago de Cuba
2004

Resumen.

Hoy preocupan los grandes volúmenes de aguas residuales, que incorporan diversas industrias a los ecosistemas acuáticos, por los daños que ocasionan a mediano y largo plazo, debido a la carga contaminante que poseen y a su baja biodegradabilidad. El presente trabajo consiste en el tratamiento del extracto líquido de pulpa de café (ELP), con el hongo de pudrición blanca *Pleurotus sp.*, residual producido en la pasteurización de la pulpa de café en la planta de hongos comestibles del CEBI, en la Universidad de Oriente, el cual requiere de un tratamiento previo antes de ser vertido al medioambiente. Para la valoración de la descontaminación y/o tratamiento, se hace el estudio con dos cepas del hongo *Pleurotus sp.* bajo diferentes condiciones de cultivo, evaluando como parámetros fundamentales la remoción del color y la demanda química de oxígeno (DQO), la producción de biomasa, el contenido de azúcares reductores, especial atención se le da a la presencia de enzimas, las cuales caracterizan en parte las biotransformaciones que ocurren. Se evidenció que el tratamiento con el *Pleurotus sp.* remueve la DQO y el color en el residual estudiado, contribuyendo a la biodegradación del mismo. Se evalúan las ventajas de la utilización de la biomasa y el residual decolorado en la producción de setas comestibles.

Summary.

Today is necessary treated the great volumen of coloured wastewater, that many industry deliver to the aquatic ecosystem, due to the danger the it will produce in medley and long terms, because these wastewater have high organic charge and low biodegradability. The present work consists on the treatment of the **liquid extract of coffee pulp (ELP)**, wastewater from the pasteurization of coffee pulp in the mushroom producing plant of the Study Centre of Industrial Biotechnology at Oriente University, which requires of treatment before being dropped to the environment.

The study was carried out with two strain of the mushroom under different condition of culture, evaluating as main parameters, the colour and the chemical oxygen demand (COD) remotion. Also was determinated the production of biomass and the content of sugars reducing. Special attention is derated to the presence of enzymes, which characterize in part, the transformations that occurs. It was evident the treatment with *Pleurotus sp.* reduce the colour and the COD in the waste studied contributing to the biological treatment of it. The advantages of the depolluted material in the production of eating mushroom are evaluated.

1. Introducción.

En la actualidad, la protección del medio ambiente se convierte cada vez más, en una prioridad a tener en cuenta por el hombre, pues de la calidad del entorno depende su vida y la de los demás organismos.

Desde finales del siglo pasado se ha venido prestando gran interés para dar solución a los problemas medioambientales y en especial, evitar la contaminación de las aguas que provocan por el vertimiento de los subproductos de las industrias. Desde julio de 1997, en Cuba se aprobó en la Asamblea Nacional del Poder Popular, la Ley 81 del Medio Ambiente, la cual ha logrado imponerse gradualmente en defensa de la naturaleza y sus recurso (CITMA, 1997).

En la mayoría de los casos subproductos de la agroindustria representan una fuente valiosa de materia prima, que puede ser aprovechada, explotando las propiedades de los microorganismos. Este interés está determinado en gran medida por la imperiosa necesidad de encontrar nuevos procedimientos que contribuyan a mejorar situaciones tales como: el agotamiento de recursos energéticos, la escasez de alimentos y la búsqueda de soluciones a los problemas de contaminación ambiental creados por la deposición de residuos orgánicos al medio ambiente (Traba y col., 1992; Rolz y col., 1982).

Actualmente se ha incrementado el interés por el aprovechamiento integral de los residuos, y a la vez dar solución a los problemas ambientales provocados por estos desechos. Tal es el caso del cultivo de setas comestibles (**tabla 1**), aprovechando diversos residuos de la industria azucarera, (bagazo, mieles finales), residuos de la zafra cafetalera (pulpa, mucílago), la paja de arroz, residuos de cacao, bagazo de uva, residuos de algodón, etc; que al finalizar los proceso industriales normales, provocan grandes acumulaciones que son vertidas a la naturaleza. Hay que destacar que su aprovechamiento tiene varios propósitos: la producción de alimento humano de alto valor nutritivo, la producción de alimento para animales, el empleo de los residuales finales como materia prima para la elaboración de compost y por supuesto **la disminución del impacto ambiental** (GEPLACEA- ICIDCA – PNUD,1990).

Al respecto, se han obtenidos resultados alentadores en trabajos que tratan sobre el aprovechamiento de residuales líquidos de diversas industrias (maderera, de algodón, cafetalera, etc.), debido a que sus efluentes producen diferentes impactos ambientales que tienen que ver con la **demanda biológica de oxígeno** (DBO), **el color y la toxicidad**; los cuales pueden provocar en ríos y presas a largo plazo una disminución de la luminosidad de las aguas, con un incremento de la temperatura, al actuar como grupos de absorción de la misma y por tanto, provocarían una disminución en la actividad fotosintética, reduciendo el oxígeno disuelto en el medio acuático (Feijoo y Lema, 1995).

Por otra parte, se ha incrementado el interés por el empleo de sistemas biológicos, como tratamiento para reducir la carga contaminante de muchas aguas residuales agrícolas o agroindustriales, la disposición de los cuales puede causar o agravar la contaminación ambiental. Entre los más estudiados y prometedores están el empleo de los **hongos de pudrición blanca**, los cuales son una alternativa viable, debido a que estos poseen un sistema multienzimático que permite la degradación de compuestos de estructuras disímiles y complejas. Precisamente el hongo ***Pleurotus ostreatus*** es uno de los 4 hongos de pudrición blanca más estudiados y más cultivados a nivel mundial (Sánchez y Royse, 2002).

Tanto fuera, como dentro del país, varios autores realizan investigaciones con subproductos como punto de partida para la aplicación de tecnologías cada vez más sostenibles, y dentro de estos las biotecnologías son las más difundidas en el aprovechamiento de residuales agroindustriales, por sus elevados beneficios y bajos costos.

Entre los trabajos realizados, ha sido estudiado los residual extracto líquido de pulpa (ELP) de la **Planta de setas comestibles del CEBI**, con vista a ser tratados y obtener compuestos de interés como: alimento animal, biobonos, vitaminas, enzimas pépticas, etc (García, 1999). Por vía anaerobia se han logrado buenos valores de remoción de la carga orgánica en este residual obtenido de la pasteurización de la pulpa de café, en este caso se han obtenido valores de remoción de su carga orgánica de alrededor del 62%, pero manteniéndose su color (Pérez y Bermúdez, 1998). El color de estos residuales se debe a la presencia de compuestos de alto peso molecular, como polifenoles, taninos

hidrolizables y condensados, y cafeína, que pueden resultar tóxicos por su composición química.

Problema.

La tecnología de producción de setas comestibles partiendo de la pulpa de café como sustrato, aunque permite el aprovechamiento de este residual, genera durante la pasteurización de la pulpa un residuo líquido de color negro muy intenso (ELP), el cual requiere de un tratamiento previo antes de ser vertido al medioambiente, por la carga orgánica contaminante que posee.

Hipótesis.

La carga orgánica contaminante que posee el residual líquido resultante de la pasteurización de la pulpa de café, puede ser removida si se realiza un tratamiento biológico con el hongo *Pleurotus sp.*

Objetivo general :

Evaluar la actividad del hongo *Pleurotus ostreatus* y sus enzimas ligninolíticas en el tratamiento del residual líquido coloreado (ELP), generado durante la pasteurización de la pulpa de café.

Objetivos específicos:

1. Seleccionar la mejor cepa (3022 y 3024) de *Pleurotus sp.*, para la biodegradación de este residual.
2. Valorar el crecimiento de *Pleurotus sp.* en fermentación sumergida, con diferentes condiciones de cultivo.
3. Evaluar la participación de las enzimas ligninolíticas de *Pleurotus sp.* en la decoloración del residual.

II. Revisión bibliográfica.

II.1. Tratamiento de residuales industriales y agroindustriales:

Por los grandes volúmenes que se generan de desechos fuertemente coloreados en algunas industrias, en la actualidad se han utilizado diferentes métodos para la decoloración de residuales, entre los que se encuentran:

- I. **Tratamiento físico-químico.** El objetivo del tratamiento primario por métodos químicos físicos es reducir la cantidad de sólidos que presenta el efluente, alcanzándose simultáneamente cierta reducción del color y de la DBO (Vidal y col., 1996) Entre los métodos más usados tenemos: coagulación – sedimentación, adsorción y filtración y ozonización. Todos estos tratamientos son efectivos para la eliminación del color, sin embargo estas técnicas tienen el inconveniente de presentar altos costos de operación y de generar nuevas corrientes de residuos que deben ser tratados posteriormente.
- II. **Tratamientos biológicos con bacterias.** Han sido aplicados en el tratamiento y detoxificación de muchos efluentes industriales, incluso combinado con tratamiento físico químico, siendo una vía secundaria para su procesamiento. Casi siempre estas alternativas tienen limitaciones específicas en especial cuando son aplicadas en la decoloración de compuestos recalcitrantes como melazas, residuales de la industria del papel, colorantes sintéticos, etc. Estos tratamiento pueden ser aerobios y anaerobios (Palma y col., 1998). El tratamiento de los efluentes mediante procesos biológicos aerobios o anaerobios presentan numerosas ventajas frente a los métodos físico químicos; por lo que se han convertido en una de las herramientas fundamentales en la eliminación y reducción de su carácter contaminante, habiendo producido avances notorios en estos últimos años.
- III. **Tratamientos biológicos con hongos de pudrición blanca.** En la década del 80 el empleo de hongos como alternativa para realizar la decoloración de efluentes de la industria papelera, así como para la degradación de compuestos organoclorados y otros compuestos contaminantes de alto peso molecular y ya en los últimos años, diferentes grupos de investigación han estudiado la posibilidad de reducir muchos compuestos aromáticos (pesticidas, desinfectantes, fenoles) y en general,

numerosos contaminantes medioambientales, usando hongos y/o sus enzimas ligninolíticas (Martirani y col., 1996; Feijoo y Lema, 1999).

Actualmente se considera la aplicación de los *hongos de putrefacción blanca* para el pretratamiento y postratamiento de los efluentes de la industria maderera y en general, de aquellos efluentes industriales con componentes tóxicos de alto peso molecular. En este sentido, por una parte se está investigando el empleo de reactores de tratamiento con micelio libre o inmovilizado que permita la degradación total de los componentes, así como la utilización directa del complejo enzimático ligninolítico dentro de un sistema integral de tratamiento que optimice los procesos aerobios / anaerobios. En este último caso, los estudios que se están realizando pretenden el desarrollo de un biorreactor para la producción a gran escala de enzimas ligninolíticas (Feijoo y Lema, 1995).

El empleo de hongo basidiomicetos tiene varias ventajas respecto al tratamiento con microorganismos, para la biodegradación de compuestos xenobióticos. Por lo general, estos compuestos son de estructura compleja y elevados pesos moleculares, y su degradación por microorganismos está limitada debido a algunos factores referidos por Lema (1999): al actuar en fase líquida se limita su acción sobre compuestos hidrófobos, la adsorción de estos compuestos sobre las partículas de los sedimentos dificulta su biodegradabilidad o al menos su biodisponibilidad, la mayor parte de los sistemas microbianos no son capaces de degradar los compuestos orgánicos que sean altamente contaminantes a baja concentración debido a que no se activan los correspondientes sistemas enzimáticos degradativos y la dificultad de degradar enlaces diversos y complejos,

En contraposición los hongos de pudrición blanca, se caracterizan por poseer un sistema enzimático extracelular de carácter no específico capaz de romper una gran cantidad de enlaces diferentes y por lo tanto, no ha de extrañarse que estos hongos sean capaces de degradar una gran cantidad de compuestos orgánicos, incluyendo hidrocarburos policíclicos aromáticos, clorofenoles, policlorofenoles, fungicidas, dioxinas y pesticidas. (Higson, 1991; Eggen, 2000). Además como característica adicional, los compuestos intermediarios generados por la degradación son por lo general biodegradables, pudiendo ser mineralizados hasta CO₂ y H₂O. Estos hongos también son empleados en la decoloración de residuales industriales, ya que generalmente el color se

debe a la presencia de compuestos de alto peso molecular y compleja estructura que no pueden ser degradados por otras vías (Rodríguez 2000).

II.2 El color como forma no convencional de contaminación.

El agua es uno de los componentes vitales para la vida, sin embargo, ha sido víctima de la acción desmedida del hombre, ya que el 95% de los acuatorios del mundo han sido eliminados, transformados o contaminados, descontrolando el ecosistema y causando la muerte de poblaciones de plantas y animales. Según Campbel y Joice (1993) el color se define como una de las formas no convencionales de contaminación junto con la DQO y la DBO. Es por ello que la descarga de efluentes coloreados en el curso de las aguas constituye una problemática ambiental a eliminar. La presencia de color en las aguas viene asociado a contaminantes de compleja estructura molecular y de baja biodegradabilidad. Además estos compuestos coloreados reducen la cantidad de oxígeno disuelto y de la luz incidente provocando desbalances en las poblaciones e incrementos de la DQO. Los desechos industriales con alto grado de color, tienen un gran poder de bioacumulación y una baja velocidad de depolarización que supone su acumulación a largo plazo en los lagos y bahías, provocando una disminución de la luminosidad de las aguas, al actuar como grupos que absorben la luz visible, lo que trae como consecuencia una disminución de la actividad fotosintética de los ecosistemas acuáticos, reduciendo el contenido de oxígeno disuelto. También estos residuales tienen un efecto tóxico sobre los peces y otros animales marinos (Lema, 1996).

II.3 Pulpa de café: poder contaminante y alternativas de tratamiento.

Desde el punto de vista económico, el café ha sido por muchos años, uno de los cultivos más rentables, tanto en América Latina, como en otras áreas del mundo. Como toda gran industria, la cafetalera genera subproductos sólidos y líquidos, caracterizados por su repercusión ambiental negativa.

Entre los parámetros que se refieren como índice de contaminación, la presencia del color en residuales líquidos no siempre se ha considerado, aún cuando se conoce el efecto perjudicial que provoca en los sistemas naturales donde son vertidos.

Entre los desechos de café más importantes se encuentran la pulpa, el agua de despulpe y el agua de lavado de los granos fermentados, de ellas se plantea que la mitad de la contaminación corresponde al agua de percolado de la pulpa y la otra mitad al agua de fermentación del mucílago (Bressani,1987; Morales, 1989). Balances de materia realizados por Bressani y col. (1989) y expresadas en base seca, muestran que la pulpa constituye el 28,7 %de la materia seca de la cereza, el mucílago el 4,9 %, la cascarilla o pergamino el 11,9 % y el grano el 55,4%.

La pulpa de café, tiene un alto contenido de lignina, potasio, cafeína, taninos y fenoles. En América Latina se considera el contaminante de los ríos y lagos en las zonas cafetaleras. Es por tanto necesario buscar nuevas alternativas para una racional transformación de la pulpa en beneficio de los cafetaleros y del medio ambiente.

Una de las alternativas que existen para la utilización de la pulpa, es su uso como sustrato en el cultivo de *Pleurotus sp.*, con el fin de producir setas comestibles (Lozano, 1991; Martínez-Carrera, 1989). Al respecto en el Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI), de la Universidad de Oriente, en Santiago de Cuba, se ha implementado esta tecnología, en la que la pulpa sufre un tratamiento de pasteurización antes de ser inoculada con el micelio del hongo. Durante este tratamiento se genera un residuo líquido de color negro muy intenso debido a que pasan elementos de la fracción soluble de la pulpa, al agua de pasteurización y a la presencia en ella del ácido clorogénico y caféico. Este efluente es vertido al medio, convirtiéndose en un factor contaminante del proceso, por lo que la utilización de cepas de este género en el tratamiento de efluentes coloreados pudiera ser una alternativa para disminuir el efecto contaminante de este residual líquido y de esta manera hacer esta tecnología limpia y ecológicamente viable. Por lo que la presencia de un nuevo residual, genera la necesidad de darle tratamiento, para conformar un sistema cerrado y para esto se buscan nuevas alternativas de solución al problema.

El color presente en el residual extracto líquido de pulpa de café(ELP); tiene su origen en compuestos de diferentes naturaleza, pero de forma general el color es debido a la

presencia de compuestos orgánicos de alto peso molecular con estructuras complejas (Tabla 3 y 4).

II.4 Pleurotus: generalidades, ciclo de vida, requerimientos nutricional.

Pleurotus sp. es un hongo de putrefacción blanca muy utilizado en zonas tropicales por su capacidad de crecer sobre una gran diversidad de residuales agroindustriales y por la calidad nutritiva y organoléptica de sus cuerpos fructíferos (García, 1999). Este hongo ha sido investigado también por su capacidad para decolorar efluentes y degradar compuestos xenobióticos (Guzmán, 1993, Herrera y col., 1997, Sánchez y Royse, 2002).

Según Chang (1991), el número de especies de hongos comestibles, es de aproximadamente 2 000, incluidas en más de 30 géneros. La producción mundial de hongos comestibles entre 1989 – 1990, fue de 3 763 000 toneladas, decreciendo la producción de *Agaricus bisporus* y de *Lentinus edodes*, como consecuencia de la producción de otras especies, como las de *Pleurotus*, que alcanzó el 24.1% en este período.

A este género pertenecen varias especies de hongos de putrefacción blanca. Los hongos ostras son ahora ampliamente cultivados sobre pajas de cereales y otros residuales vegetales. Actualmente, cerca de un millón de toneladas se están produciendo anualmente en países como Japón, Corea del Sur, Singapur, Filipinas, USA, Alemania, Bélgica y Holanda.

La producción esta aumentando significativamente asociado a:

- ✓ Una tecnología simple en comparación con *A. bisporus*.
- ✓ La posibilidad del uso de un amplio rango de desechos (residuos de café, paja de trigo, bagazo de caña de azúcar).
- ✓ Se puede producir en temperaturas como las tropicales.
- ✓ Además, el uso de desechos agrícolas es una alternativas saludables, para evitar incorporarlos al medio ambiente. (Klibansky, 1993 y García, 1999).

En la naturaleza el crecimiento es fundamentalmente en zonas de temperaturas naturales o en zonas subtropicales frías, por ejemplo en las raíces de árboles, en general tienen un fragante y delicioso sabor.

II.4.1 Ciclo de vida de *Pleurotus*:

Su ciclo de vida (Figura 1), inicia con la germinación de las basidiosporas, las cuales originan el micelio primario, es decir, un conjunto de hifas septadas uninucleadas con capacidad de crecimiento indefinido, pero incapaz de completar el ciclo de vida, por lo que se hace necesario a fusión de dos micelios secundarios o dicarióticos. Este se caracteriza por presentar hifas septadas con dos núcleos y por la presencia de estructuras en forma de ganchos, llamadas fíbulas, las que permiten mantener el estado dicariótico del micelio (Árias, 1998).

El micelio dicariótico es capaz de mostrar crecimiento indefinido en ciertas condiciones ambientales y por control genético (ciclo sexual), se induce la formación del micelio terciario o cuerpo fructífero, en el que se forman los basidios, estructuras de reproducción sexual en la cual ocurre la cariogamia y rápidamente sufre la división reductora para la formación de 4 esporas en cada basidio y así completar el ciclo (Shan-Thiny, 1989).

II.4.2 Requerimientos para el desarrollo del micelio (Sánchez y Royse, 2002):

Las fuentes de carbono utilizables para el crecimiento del micelio son: glucosa, manosa, fructosa, maltosa, pepsina, celulosa y lignina. El etanol constituye otra fuente de carbono utilizada para el crecimiento del micelio. Al igual que en otros géneros de hongos, el oxalato, el citrato y otros ácidos no son beneficiosos para el crecimiento del micelio.

La fuente de nitrógeno para *Pleurotus sp.* es la peptona, polvo de levadura, sulfato de amonio, asparagina, serina, alanina y glicina. La utilización de urea es pobre.

La temperatura óptima del crecimiento del micelio es de alrededor 25° C a 33° C y el rango de pH es sobre 6.0 – 7.0. La tolerancia para el dióxido de carbono es algo fuerte. el micelio de este hongo puede estar floreciendo a una concentración de dióxido de

carbono de un 15 a un 20 %, cuando la concentración aumenta a un 30% ,entonces hace que el crecimiento del micelio decrezca rápidamente(tabla 2)

II.4.3 Características taxonómicas:

Existe una gran configuración taxonómica del *Género Pleurotus*, especialmente para aquellas especies que pertenecen al complejo *Pleurotus ostreatus*. El problema reside en que existe una gran variabilidad morfológica que puede ser atribuida a muchos factores, tales como: condiciones ambientales, plasticidad fenotípicas y variaciones genotípicas, según Bridge y Arora (1998).

Según Árias (1998), el *Género Pleurotus* se puede dividir en cuatro secciones, corroboradas mediante variaciones isoenzimáticas con un total de 39 especies. En la actualidad por medio de apareamiento y estudios moleculares, donde se utilizó la subunidad ribosomal más grande, encontraron una correlación entre este ADN y los grupos de interestabilidad, identificaron 25 especies biológicas, donde a cada una se le asocio con una o más especies morfológicas.

II.5.Obtención de inóculo en la tecnología de setas comestibles.

El **Inóculo** o también llamado comercialmente “semilla” (**Spawn** ,en inglés), es el desarrollo masivo del micelio del hongo sobre un sustrato determinado, como lo pueden ser granos o semillas de gramíneas u otros materiales dentro de un frasco, botella o bolso de polipapel (inóculo primario o semilla). Esto es lo que constituye la base para el cultivo comercial de los hongos comestibles (Guzmán, G. y Col. 1993, Sánchez y Royse, 2002).

Como se aprecia, el cultivo en medio sólido es el método usual de preparación de inóculos para la propagación de *Pleurotus ostreatus* y consiste en en propagar el micelio en granos de cereales como *Triticum aestivum* o *Sorghum vulgare* (Zadrazil, 1978). Dicho inóculo llamado primario o semilla, es el que se mantiene en mejores condiciones para su conservación, se resiembr de nuevo para la obtención del inóculo secundario sobre mayor cantidad de granos, para después inocularlo en el sustrato de producción. Este proceso presenta algunos problemas, como: un tiempo relativamente

largo hasta la producción del inóculo secundario (32- 34 días), contaminación frecuente por manipulación del sustrato e inseguridad en la disponibilidad del grano a lo largo del año y dificultades en el control del proceso (López, y col., 1995, Nieto-López y Sánchez- Vázquez, 1997).

Una alternativa para evitar los problemas antes mencionados, es la obtención del inóculo en cultivo líquido, este se asemeja a la tecnología usada en la industria cervecera para cultivar levadura. Esta forma de inoculación permite producir mayor cantidad de biomasa de mejor calidad en menor tiempo, favorece la dispersión y adaptación del hongo y facilita su manipulación durante la siembra en el sustrato final. Esto a su vez disminuye el tiempo de fructificación y mantiene la capacidad productiva, además de ciertas propiedades genéticas, fisiológicas y morfológicas de la cepa(Roaska, L. 1990).

II.6. *Pleurotus* sp. como biodegradador:

Los basidiomicetos pueden degradar una amplia gama de compuestos orgánicos elaborados por el hombre, como los plaguicidas, aunque no se sabe si lo utilizan como fuente de carbono o energía, son relativamente pocos los que por determinadas razones son capaces de utilizar los hidrocarburos y los polimeros más complejos como la lignina y queratina (Hawksworth, D.L.,1996).

Las propuestas de solución a la problemática de contaminación y la necesidad de búsqueda de nuevas alternativas para el aprovechamiento de los residuales agroindustriales, han permitido la implementación de aplicaciones biotecnológicas, que permitan dar solución al problema. Se sabe que *Pleurotus* es capaz de degradar selectivamente la lignina, es por eso que se ha seleccionado como un organismo modelo, por sus características morfológicas y fisiológicas, unido al hecho que es el hongo de putrefacción blanca más estudiado.

El cultivo de hongos de pudrición blanca, como *Pleurotus ostreatus*, permite la degradación de lignina más extensa y rápidamente que otros grupos de organismos conocidos. Este hongo es capaz de metabolizar y mineralizar hidrocarburos policíclicos aromáticos (Bezalel, 1992) y colorantes artificiales causantes de contaminación ambiental en industrias textiles, entre otros (Montaris, 1995).

El cultivo de *Pleurotus* en sistemas sumergidos ha sido utilizado en la degradación de compuestos orgánicos, como en hidrocarburos policíclicos aromáticos, aunque poco se conoce de sus características de crecimiento bajo estas condiciones (Besadle, 1996).

Por presentar un sistema enzimático ligninolítico no específico, *Pleurotus* es empleado en la biodegradación de compuestos tóxicos con la finalidad de transformarlos a formas compatibles con los ecosistemas y poder ser asimilados en los ciclos naturales. La extracción de fenoloxidasa de *Pleurotus* sp., para la remoción de fenoles coloreados (2-clorofenol, 2,4-diclorofenol) demuestran el gran potencial de estos para el tratamiento de contaminantes fenólicos clorados (Mungia y col., 1997).

Por la necesidad de degradar de lignina los sustratos agroindustriales, para que sean asimilados por los rumiantes en la dieta, además por la posibilidad de aprovechar toda la celulosa que queda retenida por la glucosa; se han realizado estudios sobre la producción de ligninasa de *Pleurotus* para posteriores estudios de sus actividades oxidativas en sustratos lignocelulosicos. El crecimiento sobre pulpa de café demuestra que *Pleurotus* es un reductor del contenido de cafeína en el sustrato (García, 1999). También se ha demostrado su capacidad de crecer en bagazo de caña y producir a su vez lacasa (GEPLACEA- ICIDCA – PNUD,1990, Ustariz y col., 1997).

El bioblanqueo de pasta Kraft delignificado por *Pleurotus*, en un 74%, fue reportado por Moreira y Sierra, (1995) por lo que se empleo en la industria de pasta y papel es recomendable, lo que permitirá eliminar o atenuar al menos el gran efecto contaminante de esta etapa para el medio ambiente.

Este hongo ha sido empleado en la biorremedación de suelos, para disminuir el contenido de hidrocarburos poliaromáticos (Eggen, 1998), en pretratamientos para mejorar la digestibilidad de residuos lignocelulósicos empleados en la alimentación animal (Keren y Hadar,1998), en procesos de biopulpeo de las industrias papeleras (Feijó y Lema, 1995), en la decoloración de colorantes industriales (Palma y col, 1998), entre otros. Este hongo comestible se ha usado además, como fuente para la obtención de enzimas empleadas en la decoloración de melazas y en la remoción de fenoles.

II.7. Sistema ligninolítico de los hongos de pudrición blanca

(ver figura 2).

Los hongos de pudrición blanca se pueden clasificar en tres grandes grupos según la producción de enzimas extracelulares de su sistema ligninolítico (Keren y Hadar, 1998).

1. Grupo lignina – peroxidasa (LiP) – Magnesio peroxidasa (MnP): en este grupo se encuentra el hongo de pudrición blanca más estudiado *Phanerochaete chrysosporium*, que es un eficiente degradador de la lignina y que posee ciertas propiedades industriales aprovechables como la degradación selectiva de la lignina en el biopulpeo. Existen otros hongos en este grupo como son *Trametes versicolor*, *Phlebia radiata* y *Bjerkandera adusta*, entre otros.
2. grupo LiP – Lacasa solo dos hongos han sido encontrados en este grupo los cuales degradan pobremente la lignina a CO₂ por la ausencia de la MnP, aun a altas concentraciones de Mn.
3. grupo Lacasa – MnP: muchos de los hongos de pudrición blanca no producen aparentemente LiP, siendo esta combinación enzimática más encontrada usualmente. Como ejemplo de este grupo tenemos el *Panus tigrinus*, *Lentinus tigrinus* y *Rigidosporus lignosus*, entre otros. Dentro de ellos se encuentran hongos comestibles como el *Pleurotus ostreatus* que posee además otro sistema enzimático que involucra a las enzimas lacasa y aril alcohol oxidasa (AAO).

El sistema enzimático ligninolítico presente en estos hongos es muy complejo e implica diferentes actividades, algunas básicas y otras complementarias, todas necesarias para completar el proceso.

De esta forma las enzimas que participan son:

- Oxidasas: entre estas enzimas se encuentran las que producen peróxido de hidrógeno, como la glucosa oxidasa, glioxal oxidasa o aril alcohol oxidasa. Dentro de este grupo se encuentra la lacasa cuya acción es diferente ya que no produce peróxido de hidrógeno, sino que utiliza el oxígeno disuelto para realizar la acción degradativa.
- Peroxidasas: descomponen el peróxido de hidrógeno, dando lugar a oxígeno atómico que es el agente iniciador del proceso oxidativo, entre ellas las más destacadas son la LiP, la MnP y la versátil peroxidasa (VP). El mecanismo de

acción de la degradación de la lignina se basa en los radicales libres. Las peroxidases comprometidas en la degradación de la lignina: LiP, peroxidasa independiente de manganeso (VP) y la peroxidasa dependiente manganeso (MnP) son similares a otras peroxidases por la actividad en ellas del peróxido de hidrógeno. Esta última es la peroxidasa ligninolítica más común en los hongos de pudrición blanca y otros hongos. Las VP son un tercer grupo de peroxidases y fueron reconocidas recientemente (Martínez y col. 1996). Pueden considerarse un híbrido entre LiP y MnP, ya que ellas pueden oxidar no solo el Mn^{2+} , también compuestos fenólicos y no fenólicos presentes en los tintes. Han sido descritas en *Pleurotus sp.* y *Bjerkandera sp.*.

- Enzimas productoras de metabolitos: producen alcoholes (alcohol veratrílico) o ácidos (Oxálico) que actúan como agentes protectores y estabilizantes.

La actividad de este sistema enzimático ligninolítico por lo general se produce durante el metabolismo secundario, como respuesta a la limitación del nitrógeno, carbono y/o azufre, pero no por las limitaciones de fósforo. Las condiciones medioambientales tales como la concentración de oxígeno en el medio, edad del cultivo, y composición del medio afectan el perfil de las diversas isoenzimas presentes en el medio extracelular, implicando diferentes niveles de actividad enzimática.(Yaropolov, 1994).

II.7.1 Características y aplicaciones de la lacasa

La lacasa (p-difenol:dioxígeno:oxido-reductasas, EC 1.10.3.2), es una multicobre azul oxidasa que cataliza la oxidación unielectrónica de *orto* y *para* difenoles, aminas aromáticas, por remoción de un electrón y un protón de un grupo hidroxilo, para formar un radical libre. Puede catalizar además la ruptura aquil – fenil y C-alfa y C-beta de dímeros fenólicos de la lignina (Keren Hadar, 1998). Su actividad de oxidación es acompañada por la reducción del oxígeno molecular a agua, lo cual la diferencia de las peroxidases, al no necesitar el peróxido de hidrógeno en su acción oxidativa.

Para la determinación de esta enzima han sido empleados varios sustratos, tales como el guayacol(orto- metoxifenol), el dimetoxifenol, syringoldazina, ABTS (2,2 – azino –bis - 3 etilbenzotiazolina – 6 –sulfonato). El sustrato artificial de la Lacasa ABTS es el más comúnmente utilizado para la determinación de la actividad enzimática, debido a su alta

afinidad, pero requiere de pH ácido (pH=3) para su uso, siendo estable para un rango estrecho del mismo (Palmeri y col., 1997). Este puede actuar como mediador, permitiendo la oxidación de compuesto modelos de la lignina no fenólicos, que por su estructura no son sustratos en particular de la lacasa (Muñoz y col., 1997).

El mayor uso de la lacasa esta en la industria de pulpa y papel donde su inclusión en el pulpeo ha sido seleccionada como una de la mejores alternativas industriales (Feijoo y Lema, 1995). Esta enzima inmovilizada se ha empleado para remover compuestos xenobióticos de residuales acuosos, la detoxificación de compuestos fenólicos en vinos (Kersten y col, 1990). Y en la obtención de hidrolizados de lignocelulosa antes de ser usados para la fermentación alcohólica por *S.cereviceae* (Josson y col, 1998). Numerosas aplicaciones de biosensores han sido desarrollados usando lacasa, teniendo como ejemplos los electrodos con enzimas inmovilizadas para medir el contenido de fenoles de muestras acuosas y de forma más especifica, para la determinación en jugos de frutas, té y otros brebajes. (Yaropolov y col, 1994). Lacasas de otras fuentes, como algunas plantas, han sido usadas en biosensores para medir el oxígeno en fase gaseosa. Se ha usado también como sustituyente de la peroxidasa del rábano (Kersten y col, 1990) en los inmunoensayos por ser más sensibles y simple su uso como marcador, ya que la peroxidasa del rábano exhibe un amplio espectro de tinción y forma ocasionalmente complejos no productivos con el peróxido de dihidrógeno.

En trabajos realizados con dos cepas de *Pleurotus ostreatus* en el tratamiento de los residuales líquidos: vinazas de destilería y extracto líquido de pulpa de café (ELP),se logró determinar actividad manganeso peroxidasa (MnP) y lacasa, evidenciando una mayor actividad Lacasa relacionado con la decoloración de estos residuales (Rodríguez y col. 2003).

La lacasa es estudiada además de sus aplicaciones en la industria, por su uso en la genética molecular y en la clonación (Karahanian y col., 1998; Hatamoto y col., 1999).

III. Materiales y métodos.

Para el desarrollo experimental se utilizaron los materiales y equipos disponibles en los laboratorios del CEBI , del Departamento de Química, Facultad de Ciencias Naturales y del Centro de Biofísica Médica, de la Universidad de Oriente, los cuales se relacionan a continuación:

III.1. Reactivos químicos fundamentales.

Se emplearon reactivos comerciales de gran calidad y pureza. Para los análisis químicos, bioquímicos y microbiológicos se requirió de los reactivos siguientes:

Ácido 3,5 – dinitrosalicílico	PANREAC
Ácido acético glacial	ENSUFARMA
Ácido sulfúrico	MERCK
Agar Czapeck	BIOCEN
Agar Extracto Malta	BIOCEN
Agar nutriente	BIOCEN
Cafeína	MERCK
Carbonato de sodio	REACHIM
Citrato de sodio	PANREAC
Cloruro de sodio	ENSUFARMA
Dicromato de potasio	AnalaR
Dihidrógenofosfato de potasio	REACHIM
EDTA	FLUKA
Extracto de levadura	OXOID
Fenol	FLUKA
Glucosa	REACHIM
Glucosa anhidra	PANREAC
Guayacol	SIGMA

Hidrogenocarbonato de sodio	BDH
Hidróxido de sodio	MERCK
Peptona	PANREAC
Peróxido de hidrógeno	MERCK
Sulfato de magnesio heptahidratado	FLUKA
Sulfato de manganeso tetrahidratado	REACHIM
Sulfato de mercurio	MERCK
Sulfato de plata	MERCK
Sulfito de sodio	REACHIM
Tartrato de sodio y potasio	REACHIM

II. 2. Materiales y equipamientos fundamentales.

- 1) Agitador eléctrico (MLW- MR 25)
- 2) Agitador magnético (Heidolph , Alemania)
- 3) Autoclave vertical (BK- 25)
- 4) Balanza analítica (Labor Muszeripapeari Muvek LB-1050)
- 5) Balanza técnica (OWA Labor)
- 6) Baño de María (MLW)
- 7) Centrífuga (Clay Adams)
- 8) Cocina de gas. (CLAY-ADANS-INC.,USA)
- 9) Espectrofotómetro UV/ VIS (Shangai Optical Instrument Factory 53WBI)
- 10) Estereoscopio (OLIMPUS, México)
- 11) Microscopio óptico (OLIMPUS, México)
- 12) Estufa (Frank Skorczemki)
- 13) Horno (Vebe Bebau)
- 14) Incubadora (Mytron)
- 15) Micropipetas (Research-Eppendorf, Canada)
- 16) pH- metro (MLW AT3)
- 17) Plancha eléctrica (MLW LP300)
- 18) Refrigerador (Antillano)

19) Termoreactor de DQO (HACH)

20) Zaranda (THYS 2- MLW)

Otros materiales:

- ✓ Cristalería (tubos de ensayo, pipetas, probetas, embudos, beaker, volumétricos, placas Petri, Tubos HACH)
- ✓ Gradillas, pinzas, agujas de siembra, mecheros, espátulas, termómetros, Cronómetros. Canastas metálicas, bandejas, tijeras, bisturí, pomos de vidrio, ollas, cubos, bolsas de nylon.

III. 3. Métodos analíticos empleados.

a) *Análisis del contenido de azúcares reductores por ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS)* (Miller, 1959).

Fundamento: este método se basa en la determinación colorimétrica de los azúcares reductores por la formación de un compuesto coloreado, producto de la reducción del ácido 3,5 Dinitrosalicílico a 3-nitro-5-aminosalicílico. El contenido de azúcares reductores es determinado por interpolación en la curva de calibración.

b) *Análisis de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) por refluo cerrado* (APHA, 1998).

Fundamento: la determinación de la DQO se emplea como una medida del contenido del oxígeno equivalente a la materia orgánica de la muestra, que es susceptible a la oxidación por un oxidante fuerte.

c) *Determinación de materia seca o sólidos totales* (APHA, 1989).

La biomasa crecida del hongo fue secada en estufa a 103 - 105 °C hasta peso constante, según Standard Methods(1998).

d) *Determinación del color* (APHA, 1998).

Se tomó como medida del color de las muestras, la determinación de la luminancia según refiere la bibliografía citada.

Fundamentación: este método consiste en la medición del porcentaje de transmitancia de la muestra para un conjunto de longitudes de onda específicas, utilizando agua destilada como blanco. La suma de los porcentajes de transmitancia multiplicada por un factor (0.1) nos da como resultado la luminancia (%) que es una medida de cuan clara es percibida la muestra por el ojo humano.

La remoción de color se calcula mediante la expresión:

$$R = (A_i - A_f) / A_i \quad (2)$$

$$A = 2 - \log L \quad (3)$$

Donde:

L: valor de luminancia.

R: remoción de color.

A_i :absorbancia obtenida a partir de los valores de luminancia inicial según ecuación. 2.

A_f : absorbancia obtenida a partir de los valores de luminancia final según ecuación. 3.

e) Determinación de actividad enzimática:

Se determinó en el ensayo biológico la actividad ***lacasa***, ***manganeso peroxidasa*** y ***versátil peroxidasa***.

La actividad ***lacasa*** fue medida siguiendo la oxidación del guayacol a 460 nm (Palmieri y col., 1997), en una mezcla de reacción a 30° C, que contiene 10 mmol/L de guayacol, 50 mmol/L de buffer fosfato pH 6 y 0.2 mL del crudo enzimático; para un volumen final de reacción de 5mL.

La actividad ***manganeso peroxidasa*** fue medida siguiendo la oxidación del sulfato de manganeso 270 nm (Giardina y col., 2000), en una mezcla de reacción a 30° C, que contiene 1 mL de sulfato de manganeso, 2.8 mL de buffer acetato a pH 4.5, 1 mL de peróxido de hidrógeno y 0.2 mL del crudo, para volumen final de reacción de 5mL.

La actividad ***versátil peroxidasa*** fue medida siguiendo la oxidación del guayacol a 460 nm (Martínez y col. 1996), en una mezcla de reacción a 30° C, que contiene 1 mL de guayacol, 2.8 mL de buffer acetato a pH 4.5, 1 mL de peróxido de hidrógeno y 0.2 mL del crudo, para volumen final de reacción de 5mL .

Para todas las enzimas, una unidad de actividad enzimática es definida como la cantidad de enzima que produce un incremento de absorbancia de $1 \Delta A/min$.

f) Análisis del contenido de fenoles, por el método de Folin –Denis en agua y agua residuales. (Maestro y col., 1991)

Fundamento: El método de Folin-Denis se basa en la formación de un complejo azul entre el ácido fosfotungstácico-fosfomolibdico y los fenoles, en medio básico. Permite la realización de una prueba cualitativa. El reactivo reacciona con todos los compuestos hidroxibencenos.

III. 4. Procesamiento estadístico:

En cada estudio se realizaron experimentos tipo, en los cuales se procesaron de 3 a 5 réplicas para cada tratamiento. Para el tratamiento estadístico de los resultados se utilizó el software STATGRAPHICS *Plus*TM. Se utilizaron las herramientas de Análisis de Regresión y Comparación de Rectas de Regresión, ANOVA (II). Se verificó la normalidad de los datos experimentales mediante el test de normalidad Kolmogorov - Smirnov y se aplicaron diseños de clasificación simple. En el caso de diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos experimentales, las medias fueron comparadas mediante el test de rangos múltiples de Duncan. En todos los casos se utilizó un nivel de significación del 1 %.

III. 5. Metodología experimental.

III.5.1 Residual coloreado empleado.

Se trabajó con Extracto líquido de pulpa de café (ELP). Se tomaron 50g de pulpa de café (*Coffea arabica*), secada al sol y se le adiciona 1L de agua destilada, y se pasteuriza a 80° -90° C durante una hora. Dicha pulpa procede de la despulpadora de *La Pimienta*, del Ramón de las Yaguas, en Santiago de Cuba. Posteriormente se separa el extracto líquido del material sólido residual, se envasa en frascos plásticos y se conserva en refrigerador comercial a 4° C.

III.5.2 Microorganismo empleado.

Se escogió las cepas 3022 y 3024 de basidiomiceto, de la especie *Pleurotus sp.*, de la Colección de Cultivos del **Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI)**, de la Universidad de Oriente, conservado en Agar Extracto Malta (AEM), a 4 °C en refrigerador comercial.

Pleurotus ostreatus var. Florida. CCBI 3024 y 3022.

III.5.3 Medios de cultivo empleado.

Para el cultivo en medio líquido de este hongo ligninolítico se empleó el medio mínimo que posee la siguiente composición: 2% de glucosa, 0.5% peptona, 0.2% de extracto de levadura, 0.2% de hidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO_4) y 0.05 de sulfato de magnesio, a pH = 6.5 (Martínez y col.,1997).

Además se utilizaron otros medios de cultivo comerciales de gran calidad para el cultivo Agar Extracto Malta (para crecimiento de *Pleurotus* en placa), Agar Nutriente (para conteo total de bacterias), Agar Czapeck (para el conteo total de mohos y levaduras).

III.5.4 Obtención del inóculo y procedimiento de inoculación:

Para iniciar cada experimento, se procedió a obtener primeramente el inóculo de cada cepa (3022 y 3024). Para ello, colocamos con ayuda de una aguja de siembra, una pequeña porción de micelio, crecido en tubo de ensayo, en el centro de una placa de Petri de 9 cm de diámetro, con medio agar extracto malta (AEM), para lograr una colonia gigante. Se incubó a 28 °C durante 7 días, hasta que el micelio cubra toda la placa (hasta el borde, aproximadamente 7 días).

Luego el micelio fue raspado con ayuda de una espátula estéril, adicionándolo a un erlenmeyer que contiene 50 mL (por cada placa a raspar) de cloruro de sodio (NaCl) al 1% y agitado vigorosamente para lograr la fragmentación del micelio. Se tomaron 5mL y se inocularon en balones con 50 mL del residual al 50% y 100% de ELP (según el tratamiento), con y sin los componentes del medio mínimo para el cultivo de hongos.

Todos los balones inoculados y el control, fueron colocados con zaranda (a menos que se especifique) en la oscuridad y a una temperatura de 27-30° C, durante un tiempo de fermentación de 10 días y a 160 rpm.

III.6 Diseño experimental .

III.6.1-Crecimiento de ambas cepas en diferentes concentraciones del ELP y condiciones de cultivo:

Se realizaron varios experimentos, en los que se cultivaron ambas cepas de *Pleurotus sp.* en diferentes condiciones de cultivo sumergido:

- Para diferentes concentraciones del residual: se ensayó al 50 % y al 100% de ELP.
- Con adición de los componentes del medio mínimo y sin suplementar con este, sólo con la adición de glucosa (fuente de carbono del medio mínimo) + residual y el cultivo en el medio mínimo (control). Cada variante fue ensayada para cada uno de los % de ELP referidos.
- Además se cultivó el hongo en cultivo estático al 50% de ELP suplementado con los componentes del medio mínimo, de forma comparativa con cultivos en agitación, para las mismas condiciones.

Para cada tratamiento se montaron 5 réplicas y al desmontar a cada muestra se les determinaron los siguientes parámetros: peso seco de la biomasa (g/l), porcentos de remoción de color y de DQO.

III.6.2- Cinética del crecimiento de *Pleurotus sp.* en el ELP:

En este experimento se cultivó la cepa de *Pleurotus sp. CCBI 3024* en el residual al 100 %, suplementado con el medio mínimo y con agitación, para estudiar la cinética de la actividad enzimática (lacasa y manganeso peroxidasa), de los azúcares reductores, la remoción del color y de la carga orgánica, a diferentes tiempos de fermentación (3, 6, 9 ,12 y 15 días). Se desmontaron tres balones para cada día seleccionado, para realizarle los análisis anteriormente referidos.

III.6.3- Tratamiento del ELP con *Pleurotus sp.*

Este experimento se diseñó con el objetivo de evaluar la reducción de la contaminación (color, DQO y fenoles) en las condiciones y con la cepa seleccionada. Para ello se trató el residual (100%) suplementado con medio mínimo, con el hongo ***Pleurotus ostreatus var. Florida. CCBI 3024***, hasta los 10 días de fermentación sumergida con agitación; determinando al final de la experiencia los parámetros seleccionados para medir contaminación.

A) Evaluación de la actividad de enzimas ligninolíticas.

Con el objetivo de establecer las actividades de las principales enzimas ligninolíticas y su posible relación con la decoloración, tomamos el efluente decolorado a los 10 días (procedimiento anterior) durante el tratamiento, se procedió a centrifuga (6000 r.p.m por 15 minutos.) para separar la biomasa, obteniéndose el crudo enzimático de *Pleurotus sp.*, que utilizamos en los ensayos enzimáticos. Al crudo se le determinó actividad lacasa, MnP, VP. Se evaluó el efecto de la concentración del sustrato (guayacol y H₂O₂) sobre la actividad enzimática que muestra el crudo.

Se monitoreó la decoloración del ELP al 25 % a diferentes cantidades del crudo enzimático (actividades enzimáticas) y en presencia (pH 6.0) y ausencia de H₂O₂ (pH 4.5). Se tomaron diferentes cantidades de este crudo (0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 mL), se adicionó 1.5 mL de ELP, se añadió H₂O₂ (para el ensayo con estas condiciones) y se completó a 6 mL (V_{total}) con buffer apropiado para el pH seleccionado. Se determinó la absorbancia a 465 y 570 nm a las 24 horas, sin tratamiento y para determinar la actividad enzimática predominante a los 10 días de fermentación, en el experimento #6.

Para el aprovechamiento de la biomasa obtenida por el crecimiento del hongo en el residual, durante la biodegradación del mismo, se procedió a evaluar la obtención de inóculos primarios (inóculos líquidos) comparándolo con la forma tradicional de producción de este inóculo primario, en el cultivo de setas comestibles, y la producción de dicho inóculo, a partir de la biomasa obtenida en cultivo líquido en el ELP.

A continuación se explican ambas variantes:

➤ **Primera variante (inóculo convencional):**

Inicialmente se realiza el pase del micelio, con ayuda del asa, del tubo de ensayo sembrado en cuña, a la placa de Petri con medio agar extracto malta (AEM), creciéndolo durante 7 días. Posteriormente, se toma el micelio crecido sobre el medio y se divide en 4 partes y se inoculan los frascos de vidrio(pomos Omnias), que contienen 200g de las semillas de trigo; las que fueron previamente hidratadas y escurridas. Se colocan en penumbra, hasta la colonización total del grano, durante 15 días, obteniéndose así el inóculo de primera generación o inóculo primario.(ver esquema).

➤ **Segunda variante (inóculo líquido):**

En este caso, una vez crecido el micelio en la placa de Petri de 9 cm de diámetro, hasta el borde a los 7 días, se procede al raspado del mismo con ayuda de la espátula estéril y se procede como se indica en el acápite 3. 3. 4.

Transcurrido los 10 días de fermentación en sumergido y con agitación, la biomasa y el líquido decolorado son adicionados en una batidora doméstica, donde se bate lentamente durante 5 segundos aproximadamente. De este líquido se toman 8mL (4% v/v) con una pipeta y se añade a cada pomo Omnia, que contienen 200g cada uno, de semillas de trigo, que fueron igualmente hidratadas y escurridas previamente. Se colocan en penumbra, hasta la colonización total del grano, obteniéndose así el inóculo de primera generación. (ver esquema).

III.6.4 - Tratamiento del residual en condiciones ambientales:

Este experimento se realizó para comprobar si la cepa 3024 de *Pleurotus sp*, era capaz de crecer en el ELP en condiciones no estériles. Para ello se sembró el hongo como en los experimentos anteriores, pero en un erlenmeyer con 2L del residual, al 100% y con el MM. En este caso se sustituyó la zaranda por un agitador eléctrico con impelente, a

250 r.p.m., durante 5 días de fermentación. Se cuantificaron DQO, color y actividades enzimáticas. Se cuantificó mediante el método de dilución y con el empleo de medios específicos la presencia de otros microorganismos crecidos durante el tratamiento: bacterias, levaduras, hongos filamentosos. Se confirmaron estos por observación microscópica.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

El estudio del crecimiento o producción de biomasa, resulta de primordial importancia para determinar las aplicaciones biotecnológicas de un microorganismo. Por otra parte desde el punto de vista medioambiental es también de vital importancia determinar las potencialidades de decoloración y de remoción de la carga orgánica de residuales líquidos fuertemente coloreados antes de ser incorporados a los ecosistemas acuáticos, tal es el caso del residual Extracto Líquido de Pulpa (ELP), generado durante la pasteurización de la pulpa de café en la planta de setas comestibles del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI), de la Universidad de Oriente, en Santiago de Cuba.

El residual ELP se caracteriza por ser muy coloreado y de la determinación del color por el método espectrofotométrico reportado en el Standard Methods (APHA,1998) su valor de luminancia es de 58.9%, lo que demuestra que menos de la mitad de la luz que incide atraviesa; el color que más lo caracteriza es el **amarillo verdoso** y la longitud de onda predominante es 570 nm.

Si a esto se le suman las características previamente determinadas en el residual, caracterizadas por elevada DQO, presencia de cantidades apreciables de sólidos y de compuestos tóxicos para el crecimiento de organismos como polifenoles, cafeína, entre otros (Field, 1987), es evidente la necesidad del tratamiento previo de este residual antes de ser vertido en cualquier recurso hídrico; para que no afecte el equilibrio biológico establecido, por afectación de los parámetros físico-químicos característicos; además de asegurar la sostenibilidad de la tecnología de setas comestibles

Atendiendo a su composición química se hace necesario estudiar previamente las condiciones más propicias para el crecimiento del hongo sobre el residual para que pueda ejercer su potencial biodegradativo sin problema y evitar cualquier posible inhibición o escaso crecimiento achacable a condiciones de cultivo y no, a las potencialidades propias del organismo con el que trabajamos para el tratamiento biotecnológico.

1) Comportamiento de la cepa 3022 en diferentes concentraciones del ELP y en el medio mínimo seleccionado:

Transcurrido los primeros 2 días del tiempo de fermentación definido al diseñar este experimento, pudimos constatar la forma en que crece el hongo *Pleurotus sp.* cuando se cultiva en condiciones de cultivo sumergido y con agitación, formando como pelotitas o las llamados *pellets*, que alcanzaron hasta 5 – 7 mm de diámetro (fig. 3). Por el contrario en condiciones de cultivo estático el crecimiento micelial fue en forma de una densa capa blanquecina en la superficie del líquido.

En la *tabla 5*, se exponen los resultados del peso seco de la biomasa (g/L) obtenidos con esta cepa. Se alcanza mejor crecimiento en el tratamiento 3 al suplementar el ELP sin diluir con los elementos del medio mínimo, con 9.95 g/L como promedio; seguido del ELP diluido (50%), con medio mínimo, con 8.3 g/L de peso seco, existiendo entre ellos una diferencia de 1.65. Estos resultados son superiores al control, que alcanzó valores de 6.8 g/L. Por el contrario, en los restantes tratamientos el hongo no sobrepasa los 0.5 g/L, siendo necesaria la suplementación de nutrientes al medio, pues se conoce (Rivera, 2000; Fernández, 2001) que este residual es escaso en concentraciones de nitrógeno y carbohidratos, nutrientes esenciales para el crecimiento de cualquier microorganismo.

Con respecto a la remoción del color, con esta cepa se alcanzan mejores valores en los tratamientos con ELP sin diluir, suplementado y con agitación, y al 50% del ELP con medio mínimo, pero estático, con valores de 56.3% y 55.2%, respectivamente; existiendo solo un 1.4 de diferencia entre ellos. En los restantes tratamientos el hongo solo remueve hasta el 35 % del color. Es sabido que los hongos de pudrición blanca pueden degradar compuestos recalcitrantes (a menudo asociados al color), a través de un proceso cometabólico que requiere de una fuente de carbono alternativa (Aust y Benson, 1993). En el parámetro de la reducción de la carga orgánica del residual (DQO), como se observa los más altos porcentajes se obtienen en los tratamientos 2 y 4 con 90.8 % y 90,3 %, respectivamente. Es decir, al 50 y 100% de ELP, pero sin suplementar con el medio mínimo, no existiendo diferencias significativa entre ellos. La adición de los componentes del medio mínimo incrementa la DQO a degradar, por lo que presupone una sobrecarga a los mecanismos de decoloración. A pesar de estos resultados, es

importante significar que el resto de los casos se remueve más del 66 % de la DQO, excepto del cultivo estático, por lo que se infiere que es indispensable la agitación para lograr mejores resultados en este sentido.

2) Comportamiento de la cepa 3024 en diferentes concentraciones del ELP y en el medio mínimo seleccionado:

Al cultivar la cepa 3024 en las mismas condiciones que la 3022, con el objetivo de comparar los comportamientos de las mismas y proceder a la selección de la mejor en el residual en estudio, obtuvimos los siguientes resultados:

Como se observa en la *tabla # 6*, en lo que respecta al peso seco de la biomasa esta cepa alcanza los mejores valores en los tratamientos 1 y 3. Es decir, diluido y sin diluir con la adición de los componentes del medio mínimo y en condiciones de cultivo agitado, respectivamente; alcanzándose mejores pesos en el medio con ELP al 100%, con 14,6 g/L. Ambos tratamientos superan al control, pues en este se alcanzan 7.7 g/L. De lo anterior se puede inferir que el ELP aporta otros nutrientes que inciden en el crecimiento de estas cepas de *Pleurotus sp.*, que exhibe el mismo comportamiento que la 3022 y se requiere la suplementación del residual con los componentes del medio mínimo para un mejor crecimiento de este Basidiomiceto.

En cuanto a la remoción del color, los tratamientos 1 y 2 (con el ELP al 50%) ofrecen mejores resultados, pues en ellos el hongo remueve el color del residual en un 74.6% y 78,0% , respectivamente, no observándose diferencias significativas entre ambos. En los restantes casos se obtienen remociones superiores al 50%, para cultivos agitados..

Por otra parte, al analizar los resultados de la remoción de la DQO, se observa que también los tratamientos 1 y 2 se comportan superiores al resto de los casos obteniéndose hasta 75,9% en el segundo de ellos, favoreciendo este parámetro en el tratamiento donde no se suplementa. Con respecto al anterior los restantes tratamientos reportan valores próximos al 50%.

A manera de resumen de estos dos primeros experimentos, podemos plantear que la cepa 3024 muestra resultados superiores a la 3022, en las condiciones de cultivo utilizadas,

para los parámetros crecimiento (biomasa) y decoloración. Además, que las dos cepas crecen mejor en el ELP sin diluir, pero suplementados con medio mínimo y en agitación. De todo esto se puede inferir que este hongo a pesar de ser cultivado en este residual fuertemente coloreado por la presencia de elementos de baja biodegradabilidad y de carácter tóxico como taninos, cafeína, ácido clorogénico y caféico (Field, 1987), aprovecha los nutrientes del medio mínimo, pero también los compuestos presentes en el ELP, influyendo positivamente en su crecimiento. Con esto se corrobora que este residual tiene potencialidades para ser utilizado como medio de cultivo de estos basidiomicetos, previamente referido (Fernández, 2001; Rodríguez y col., 2003), a pesar de encontrarse al 100% de concentración y puesto que posee enzimas en su complejo ligninolítico, capaces de degradar un alto espectro de enlaces de compuestos recalcitrantes a la biodegradación, lo que los hace mas disponibles para el metabolismo de estos organismos.

Con respecto a lo favorable que resulta la agitación, sobre todo si tenemos en cuenta el tratamiento del residual con la cepa 3024, en otros trabajos de biodegradación de residuales coloreados por hongos de pudrición blanca la remoción de la DQO y la decoloración se favorecen en agitación, con un rango óptimo de 150 – 200 r. p.m., coincidiendo con la utilizada en nuestros experimentos (160 r.p.m.). Yesilada y col. (1998) atribuyen este comportamiento al incremento de la cantidad de oxígeno disuelto como resultado de la agitación.

Por otra parte, desde el punto de vista del mejoramiento de las cualidades del ELP con esta cepa seleccionada, antes de ser incorporado a los ecosistemas acuáticos, los mejores tratamientos a utilizar son el 1 y 2 (ELP al 50 % con y sin suplementar con MM) teniendo en cuenta los porcentajes de remoción de la carga orgánica y de color, que se reportaron en ambas cepas. No obstante, se debe valorar el efecto que tiene el tratamiento sobre la implicación de incrementar los volúmenes a tratar por dilución del residual, con el consiguiente gasto de agua.

Como se observa hasta aquí con el ELP es posible obtener una biomasa apropiada de hongo *Pleurotus*, con valores de reducción de la DQO y de color por encima del 50% para 10 días de tratamiento.

3) Comportamiento de las cepas 3024 y 3022, en diferentes concentraciones del ELP con la suplementación del medio mínimo y solo con la adición de glucosa:

Tratando de reducir los gastos por concepto de suplementación se procedió a comparar el crecimiento en presencia de todos los elementos del medio mínimo (MM) y con sólo la adición de glucosa.

Como se observa en la *tabla 7*, los mejores rendimientos de biomasa en peso seco se reportaron en la cepa 3024, específicamente en el ELP al 100% y con medio mínimo, con 8.2 g/L, esto reafirma este tratamiento como la mejor variante para el cultivo de ambas cepas. De igual forma también al diluir el residual, es necesario suplementar con todos los elementos del medio mínimo, pues solo se alcanzan 1,5 – 3.4 g/L al adicionar únicamente la glucosa a esta concentración, por debajo del control que rindió 7.0 g/L.

Siempre como se observa al no diluir el residual este hongo crece más, evidenciando el aprovechamiento del residual por el hongo para la sustracción de nutrientes. Con glucosa solamente no es suficiente para una buena producción de biomasa.

Con respecto a la remoción de la carga orgánica, es importante significar que cuando se suplementa con glucosa solamente, se obtienen buenos resultados en este sentido; sobre todo en concentraciones de 100% del residual ELP tratados con ambas cepas (79.3 % y 70.7%), de lo que se infiere que la glucosa no es el único de los elementos del medio sintético que contribuye a los valores de DQO y sobrecargan los mecanismos degradativos, como habíamos explicado anteriormente. Estos resultados son superiores con la 3024 a los de la cepa 3022.

Por último, se analizaron los resultados de la remoción del color, obteniéndose buenos porcentajes cuando suplementamos sólo con la glucosa. Con la cepa 3024, se logra remover hasta 73.5 % del color del residual, en el caso del cuarto tratamiento: ELP sin diluir, C/G, a pesar de que el hongo solo crece 3,2 g/L. En este parámetro, la cepa 3022 reportó 57,9 % de color , también en su cuarta variante. Ya se había comentado de la necesidad de una fuente de carbono para la remoción de compuestos asociados al color

por cometabolismo, significando la incidencia de esta. Al respecto, Pellinen y col. (1988) reportó que la glucosa es necesaria para remover colorantes sintéticos y en la decoloración de residuales, pero una concentración mínima de 2 g/L es requerida para que se mantenga una decoloración efectiva, mayores valores de remoción de color son obtenidos a mayor concentración de glucosa (20 g/L).

Todos estos resultados ratifican a la cepa 3024, como la mejor cepa en todos los parámetros ambientales estudiados y en las condiciones de cultivo diseñadas hasta el momento.

4) Cinética del crecimiento de la cepa 3024 en el ELP:

Ante todo hay que aclarar, que existen diferencias en cuanto al perfil enzimático en el tiempo y los valores de decoloración obtenidos, atendiendo al tipo hongo empleado, al residual tratado y a las condiciones del cultivo empleado, según los trabajos de otros autores consultados.

En la *tabla 8* y las figuras 4 y 5, se exponen de forma resumida el comportamiento de la cepa 3024 ante las condiciones de cultivo y los resultados de los parámetros de respuestas estudiados en este experimento. Se observa un incremento de la biomasa (hasta 19.1 g/L), de los % de remoción del color (hasta 77.8) y de la DQO (hasta un 80.8) a los 15 días de incubación, y de la actividad enzimática entre los días 6 y 9. También se verifica como disminuye la excreción de las enzimas al final de la cinética, sin embargo la decoloración y la reducción de la carga orgánica, continúan hasta valores de 77.8 % y 80,8 %, de remoción en los tiempos finales de la cinética, respectivamente. De lo anterior, se infiere que la **lacasa** (Lac) y la **manganeso peroxidasa** (MnP) no son las únicas enzimas responsables de la biodegradación del residual, que existen otras enzimas del sistema ligninolítico u otros mecanismos que contribuyen. La acumulación de subproductos del metabolismo del hongo o presentes en el residual, podrían inhibir su producción, por lo que la influencia de la edad del cultivo puede incidir en la producción de las enzimas y su actividad, cuestión que ha sido objeto de estudio en otros trabajos (Fernández, 2001).

Al analizar (figuras 4 y 5) la excreción de las enzimas durante el crecimiento del hongo en este residual (ELP), se observa que ambas enzimas son liberadas durante la fase de crecimiento, tanto las peroxidasas como la lacasa, coincidiendo con algunos autores que refieren que *Pleurotus sp.* en contraste con *Phanerochaete chrysosporium*, expresa el sistema ligninolítico durante la fase de crecimiento, y la producción de enzimas ligninolíticas no es inhibida por altas concentraciones de nitrógeno (Martinez y col., 1994^a ; Rodríguez y col., 2003).

Se observa en todo momento mayor actividad lacasa (8.53 U/mL) que peroxidasa, lo que podría estar dado en que aunque el tipo de compuesto a degradar (compuestos fenólicos) son sustratos propicios para inducir ambas enzimas, para la actividad efectiva de las peroxidasas se requiere de Mn^{2+} y/o peróxido como cofactores, lo que requiere la participación de otras enzimas auxiliares (Leonowicz y col., 1999). Dentro de estos se reportan las glioxal oxidasas y superóxido dismutasas para la producción intracelular de H_2O_2 y las aril alcohol oxidasa (AAO) para la producción extracelular.

Por otro lado, se ha reportado que la producción de LiP y MnP de hongos de pudrición blanca en cultivo sumergido, es generalmente óptima a altas tensiones de oxígeno, pero es reprimida por agitación, mientras que la producción de lacasa es a menudo incrementada por agitación (Wesenber y col., 2003). Esto podría explicar el hecho de la reducción significativa de manganeso peroxidasa (MnP), recordando que trabajamos en condiciones de cultivo agitado y en balones, donde se agota la disponibilidad e intercambio de oxígeno. Es bueno hacer la observación de que durante la cinética se detectó la actividad peroxidasa, no diferenciándose la versátil peroxidasa (VP) y la MnP, pues tanto una como la otra actúan sobre Mn^{2+} (aunque con diferente efectividad) en presencia de H_2O_2 . Consideramos que la actividad que prevalece es VP porque requiere de menos cofactores (pues como el cultivo se hace sin suplementar con sulfato de manganeso), donde el máximo de esta actividad se observa a los 6 días con valores de 1.78 U/mL y luego hay una reducción de esta hasta desaparecer a los 15 días. Rodríguez y col. (2004), trabajando con *P. pulmonaris* para la degradación de 2,4 diclorofenilos en medio sintético líquido, observó que la VP desaparece después de 4 días de incubación debido a los altos niveles de aril alcohol oxidasa (AAO) secretado por este hongo. Se ha

probado que la excreción de AAO por *P. pulmonarius* coincide con la biosíntesis de compuestos resultando en un incremento de H₂O₂ e inactivación de la VP (Bockle y col., 1999). En fermentación en estado sólido por *P. Eringii*, *P. ostreatus* y *P. sajor- caju*, estos autores detectaron las máximas actividades de lacasa y VP durante la primera semana de incubación y no fue detectado AAO (Bezalel y col., 1996).

Esta nueva peroxidasa de hongo muestra algunas ventajas tecnológicas, comparadas con las bien conocidas peroxidasas de *Phanerochaete chrysosporium*, principalmente relacionado con la habilidad para actuar directamente con contaminantes aromáticos, mientras que la LiP y MnP requieren alcohol veratrílico, Mn²⁺ y lípidos insaturados para ello (Martínez y col., 2004).

Continuando con la cinética descrita en la figura 4, se aprecia consumo de glucosa, concomitante con la producción de enzima ligninolítica por este hongo en la fase de tropofase; donde a su vez es en esta fase en la que se observan las mayores velocidades de reducción de color y de la carga orgánica contaminante(DQO); soportando el análisis de los experimentos anteriores, en los que se plantea que se requiere de glucosa para la decoloración efectiva del residual. Otras enzimas auxiliares que se reportan por Leonowicz y col.(1999), relacionan estas actividades como la glucosa oxidasa, la AAO, otras deshidrogenasas involucradas en circuitos de retroalimentación y de unión de la ligninólisis con la degradación de celulosa y hemicelulosa en la naturaleza. Es probable que mecanismos similares sean utilizados por este tipo de hongo para la degradación de compuestos recalcitrantes como los polifenoles presentes en este residual, de ahí la relación entre suministro de glucosa, decoloración y remoción de carga orgánica.

La reducción de la materia orgánica (DQO), tuvo dos etapas , al igual que la actividad lacasa, donde es posible que primero se biodegraden con una mayor velocidad compuestos mas simples como la glucosa suplementada en el MM, carbohidratos, pectinas; los polifenoles, fenoles y otros compuestos recalcitrantes con una menor velocidad, pero propiciando la mayor actividad lacasa, para quien estos compuestos resultan excelentes sustratos e inductores, y el mantenimiento de la actividad VP, por encima de los tiempos que se reportan en medio sintético.

Como se aprecia en la figura 5, la mayor parte del color y de la carga orgánica desaparecen en los primeros 9 días, precisamente cuando el hongo tiene mayor actividad **lacasa**, a pesar de que luego ambas remociones continúan aumentando, pero en menor proporción. Todo esto corrobora lo que reportan otros trabajos realizados, donde se plantea que existe cierta correlación entre la excreción de esta enzima por *Pleurotus* y la decoloración de residuales con tintes (Rodríguez, 1999; Torcazo y col., 2003; Martínez y col., 2004). También se plantea la existencia de otros sistemas enzimáticos que participan en la reducción del color con el empleo de este hongo de putrefacción blanca, como la **citocromo P- 450 o peroxidasas** (Shin y col., 1997).

Por último con respecto a la cantidad de azúcares reductores en el tiempo de fermentación estudiado, se observa como va disminuyendo en el tiempo, según las necesidades nutricionales del hongo, desde 20,07 g/L hasta 3,02 g/L al final del experimento. Se destaca una estrecha relación con el crecimiento al ocurrir una disminución de la concentración de los azúcares y paralelamente un incremento de la biomasa de forma exponencial, a razón de 2 g/L de azúcares, por 2 ó 3 g/L de incremento de la biomasa del hongo, como se observa en la *tabla 8, figura 4*. Es importante señalar que la remoción de la carga orgánica podría ser mayor, si se tiene en cuenta que el hongo no consume toda la glucosa, pues al final de la cinética aún queda un remanente de 3.02 g/L de la misma.

5) Tratamiento del ELP con *Pleurotus sp.*: evaluación de la actividad de sus enzimas ligninolíticas.

Los resultados obtenidos en las actividades enzimáticas cuantificadas en el tratamiento del ELP (100%) con *Pleurotus sp.* a los 10 días, confirman lo que planteamos en el experimento anterior, pues no se detecta actividad MnP, hay poca actividad VP (1.3 ± 0.2 U/mL) y prevalece la actividad lacasa (12.7 ± 0.5 U/mL) (Fig. 6)

La mayor actividad decolorativa coincide con los del perfil de actividad lacasa (Figura 5), lo que avala la participación de esta enzima en la decoloración de este residual durante la fase de crecimiento de *Pleurotus sp.*, por la biodegradación de compuestos fenólicos responsables del color. A los 10 días de tratamiento se obtuvo un 92 % de la

remoción de los fenoles, con una elevada remoción de DQO y color (tabla 9, Fig. 7 y 8). Además esta enzima constituyó la de actividad predominante durante la caracterización enzimática del efluente obtenido después del tratamiento con este hongo (*ver la Fig. 6*).

La lacasa ha sido reconocida como la principal enzima involucrada en la decoloración de tintes por cultivo de *Pleurotus sajor – caju* (Chang y Durant, 2001) y la decoloración del agua residual de la producción de aceite oliva (Kissi y col., 2001), con *P. ostreatus*.

Al proceder a caracterizar la enzima lacasa presente en el crudo enzimático frente al sustrato tipo guayacol para diferentes concentraciones del mismo a pH 6 (figura 9), se obtuvo una K_m aparente de 4.8 mM y una V_{max} aparente de 13.2 U/min. Valores similares de K_m son reportados por Palmieri y col.(1997), con el mismo sustrato a pH 6, para las isoenzimas de la lacasa POXA2 y POXC (3.1 ± 0.6 y 1.2 ± 0.2 , respectivamente). Esta K_m aparente calculada puede estar afectada por la presencia de VP que se detectó en este crudo, la cual ha presentado valores muy bajos para la oxidación de colorantes con *P.ostreatus* de 6 – 11 U/ mL (Shin y col., 1997). Muchas isoformas de lacasa son expresadas por diferentes taxas y condiciones de cultivo (Wesenber y col., 2003).

En la etapa final de crecimiento del hongo (idiofase) se reducen las actividades de lacasa y peroxidasas, reduciéndose además la decoloración y la remoción de la carga orgánica (figura 4 y 5). Aunque hay presencia de lacasa como se evidencia en este experimento de tratamiento, la remoción de color y de la carga orgánica a partir de estos 10 días no será mucho mayor que lo obtenido (*ver cinética en fig. 4*). La actividad decolorativa residual que queda puede deberse a la oxidación en el ELP por esta enzima de compuestos no fenólicos (como glucosa remanente, metabolitos intermediarios) para lo cual se requiere de mediadores apropiados sintetizados en el hongo para este tiempo, los que no estarán en el medio fresco. También pueden haberse excretado o formado en el crudo decolorado, inhibidores de la lacasa, los que no son eliminados durante la centrifugación e inciden en que exista muy poca actividad decolorativa por el crudo enzimático, cuando se enfrenta a cantidades frescas del

residual; aun cuando se adicionan cantidades crecientes de enzimas en presencia y ausencia de H₂O₂ (figura 10). Recordemos que el peróxido puede ser inhibitorio de VP en ciertas cantidades y puede ser el causante de por qué disminuye su actividad.

Utilización de la biomasa y el ELP obtenidos como inóculo líquido en la producción de inóculos primarios y secundarios.

A partir del tratamiento del residual ELP con *Pleurotus sp.* a los diez días, se obtuvo un crecimiento abundante de biomasa (micelio) el cual valoramos su empleo en el propio cultivo de setas comestibles, partiendo de la suposición de que el hongo estuviese mejor adaptado a las condiciones del residual que se emplea como sustrato para esta tecnología que es la pulpa de café.

Partiendo de que para la producción de inóculos primarios, el cultivo en medio sólido es el método usual en la producción de setas comestibles, y que la obtención de estos en medio líquido ofrece algunas ventajas con respecto al método tradicional (Zadrazil, 1978 y López, Arébalos y col., 1995), empleamos la biomasa de *Pleurotus* obtenida en cultivo sumergido y una parte del residual decolorado, con este fin, siguiendo los pasos que se describen en el diseño de este experimento, para las dos variantes, obteniéndose los siguientes resultados (fig. 11).

Después de inocular en los pomos con semillas de trigo o millo, la variante convencional alcanzó la máxima colonización pasados los 15 días, mientras que los pomos de la segunda variante (inoculación líquida) colonizó completamente a los 12 días. Por otra parte, el crecimiento del micelio no ocurrió de la misma forma, en la variante tradicional se produce la irradiación del mismo primeramente desde la superficie, que es donde se deposita la porción del hongo tomada de la placa de Petri, luego pasa hacia la pared del pomo y por último se dirige hacia su interior completando la colonización al tornarse blanco el contenido del recipiente; mientras que en la segunda variante, al ser un inóculo líquido, el micelio se propagó en todas direcciones pues el líquido y la biomasa inoculada se distribuyen homogéneamente entre las semillas del cereal. En la bibliografía consultada al respecto, se obtienen resultados

parecidos en el caso del empleo del inóculo líquido, a partir de la batición del micelio crecido en placa de Petri o el inóculo primario obtenido en frascos y su posterior inoculación para preparar el inóculo secundario (Guzmán, G. y col. 1993; Sánchez y Royse, 2002), solo que en nuestro caso se logra el agotamiento del residual, se resuelve un problema ambiental y se sustituyen reactivos y semillas de cereales que no están disponibles todo el año.

6) Tratamiento del residual en condiciones ambientales:

Teniendo en cuenta la importancia que tiene llevar a condiciones de escalados cualquier propuesta de tratamiento físico- químico o biológico, de un residual, procedimos como estaba previsto en el diseño experimental. Se pudo comprobar que a los 5 días de fermentación hubo un 44.1 % de remoción de la carga orgánica, un 20.0 % de remoción del color y se pudo cuantificar la actividad lacasa en 1.39 U/mL (figura 5), correspondiéndose con los valores obtenidos en otros trabajos con este residual y sus enzimas (Rodríguez y col., 2002). Además se corroboran los resultados de la cinética enzimática del experimento 4 del presente trabajo para este pequeño tiempo demostrándose la excreción de esta enzima y del hongo, a pesar que al cuantificar la presencia de otros microorganismos crecidos durante el tratamiento realizado, se pudo determinar la presencia de 8 a 11×10^6 U.F.C. de bacterias, de levaduras 32 a 40×10^6 U.F.C. y 1×10^6 U.F.C., en el caso de hongos filamentosos.

VI. 1. Valoración económica

La protección del medio ambiente constituye una de las premisas del estado cubano, por lo que las Empresas se ven comprometidas a ejecutar acciones que redunden en estos objetivos.

El tratamiento de residuales que son coloreados y que pueden presentar además compuestos tóxicos para los ecosistemas acuáticos, como polifenoles, derivados furfúricos, taninos, requiere de tratamientos físico-químicos asociados a tratamientos

biológicos para la degradación final. La biorremediación de aguas y suelos contaminados a menudo requiere de consorcios microbianos por la especificidad de actividades que presentan los microorganismos componentes, formulaciones que muchas veces son compradas a precios elevados y que requiere de una conservación adecuada para mantenerlas viables.

A nivel mundial se ha incrementado el empleo de enzimas de hongos ligninolíticos para la degradación de compuestos recalcitrantes, teniendo en cuenta lo inespecífico de sus enzimas que permiten un rango mayor de compuestos posibles a tratar. Por lo que se han realizado numerosas aplicaciones del empleo de estos tipos de hongos para la biorremediación, fundamentalmente de suelos con resultados alentadores (Eggen, 1999). Las lacasas fúngicas son vendidas parcialmente purificadas en soluciones que presentan una actividad de 10 000 U en un valor de \$ 50.00 USD (*TienzymeTM*, *sitio web*) promoviendo su empleo de forma inmovilizada para la remoción de compuestos xenobióticos y oxidación de fenoles en bebidas. Las lacasas también se le avizora su aplicación en otros campos como los de diagnóstico, para reemplazar enzimas tradicionales que se emplean como reveladores en métodos de gran uso en nuestro país como los ELISA, lo que haría incrementar su valor añadido por el área de aplicación tan sensible.

La obtención de enzimas, empleando como medio de crecimiento residuales como el que se refiere en este estudio, permite abaratar los precios por concepto de ahorro en aditivos a los medios tradicionales; además de agotar estos, reducir su poder contaminante, reducir el color que presentan y promover la mayor excreción de enzimas por la presencia de inductores de la actividad enzimática.

El cultivo en medio sólido es el método usual de preparación de inóculo para este hongo y consiste en propagar el micelio en granos de cereales (inóculo primario o semilla) donde es conservado o resembrado en mayor cantidad del cereal (inóculo secundario) para luego ser inoculado en el sustrato de producción. Este proceso presenta algunos problemas como: un tiempo relativamente largo hasta la producción del inóculo secundario (32-34 días), contaminación frecuente por la manipulación del sustrato y dificultades en el control del proceso (Sánchez y Royse, 2002).

La propuesta que se presenta de cultivo de hongo *Pleurotus sp.* sobre el residual ensayado partiendo de los estimulantes resultados obtenidos en cuanto a producción de biomasa, permitiría la obtención de inóculos en medio líquido para la planta de hongos comestibles, con los consabidos beneficios que estos traen aparejados como: optimización del tiempo para la producción del inóculo secundario, reducción de gastos por reducción de la contaminación, mayor productividad, mayor viabilidad, ahorros por empleo de menos trigo o millo como soporte para crecimiento y reducción del área destinada a este paso. Además existe muy poca experiencia en el país en la obtención de inóculos por esta vía.

Para sustentar aún más todo lo anteriormente planteado, podemos resumir a manera de comparación, que por la variante convencional (ver Materiales y Métodos) de obtención de inóculos, a partir de una placa de Petri de 9 mm de diámetro con micelio del hongo *Pleurotus sp.*, se obtienen 8 frascos de inóculos primarios, y a partir de ellos 80 nuevos frascos de inóculos secundarios, con una duración total de 30 días (15 días de inóculo primario y 15 en inóculo secundario), con los consiguientes gastos de electricidad de los equipos de regulación de temperatura a 28° C en el cuarto de inóculos y en granos de cereal. Mientras que en la variante de inoculación líquida se optimiza tanto el mínimo de tiempo, como el máximo de pomos de inóculo primarios y secundarios, pues de una sola placa de Petri con el micelio, se obtienen 500 m/L de inóculo líquido, los cuales sirven para inocular 60 pomos de inóculos primarios y 600 de inóculo secundarios, con un tiempo de duración de 27 días (12 días en inóculos primarios y 15 en inóculos secundarios), con reducción de los gastos de electricidad de los equipos de regulación de temperatura. Por otra parte, los componentes del medio mínimo, que se utilizan en 500mL de ELP al 100%, no encarecen nuestra propuesta si se tienen en cuenta las cantidades que se requieren para este volumen de residual (ver figura de precios del MM). Por otra parte, la poca cantidad de los componentes del medio mínimo, que se utilizan en 500mL de ELP al 100%, no encarecen nuestra propuesta si se tienen en cuenta las cantidades que se requieren para este volumen de residual (ver tabla 10).

El amplio conocimiento que tiene el CEBI sobre estos residuales y en el cultivo de setas (García, 1999; Bermúdez *et al.*, 2001), permiten abordar estrategias para llegar a una

metodología de cultivo del organismo que sea efectiva para la reducción del color de estos residuales y de la carga contaminante y además obtener una enzima con un amplio espectro de aplicación

v. Conclusiones.

Podemos concluir finalmente que:

- En los ensayos realizados con el ELP, la cepa del hongo *Pleurotus sp.* que mejor se comportó fue la 3024, la cual puede cultivarse en este residual sin necesidad de diluir.
- Se demuestra que el ELP sin diluir y suplementado es biodegradable por el hongo *Pleurotus sp.*, ya que se obtienen mejores porcentajes de remoción de la carga orgánica (DQO), del color, de los fenoles y buenos valores de biomasa.
- La mayor remoción del color y de la carga orgánica se alcanza durante la tropofase del crecimiento del hongo *Pleurotus sp.*, prevaleciendo la actividad de las enzimas ligninolíticas, en especial la **versátil peroxidasa y la lacasa**, sugiriendo la relación entre la actividad de ambas enzimas y la degradación de polifenoles, causantes de estas formas de contaminación.
- La biomasa obtenida conjuntamente con el residual decolorado, puede ser empleada para la preparación de inóculos primarios en la producción de setas comestibles, lo que valoriza el tratamiento biológico con el hongo *Pleurotus sp.*.

VI . Recomendaciones.

1. Profundizar en el estudio de los mecanismos de biodegradación de los compuestos contaminantes del ELP, para dilucidar aun más la participación del sistema enzimático de *Pleurotas sp.*.
2. Emplear la biomasa obtenida conjuntamente con el residual decolorado en la preparación de inóculos primarios en la producción de setas comestibles.

VII . Bibliografía.

- A.O.A.C (1980). Oficial methods of analysis of association of official analytical chemist..13 edition ,Washington D. C..
- APHA.(1998). Standard Methods for the examination of water and wastewater. 20th Edition, Washington D.C, USA.1124.
- Aust, S.D., Benson, J. (1993). The fungus among us-use of white rot fungi to biodegrade environmental pollutants. *Enveronmental Health Perspectives* 101: 232-233.
- Bello, R. (1999). Digestión anaerobia de residuales del cultivo de setas comestibles. *W. J. Microbial. Biotecnology* 33.357-359.
- Bermúdez, R. C., Pérez J. L. (1998).Biogás a partir de los efluentes de la pulpa del café. *Cubasolar* 98 (abril 13 – 17).Cuba.
- Bezalel, L; Hadar, Y. (1996). Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbial* 65: 923-928.
- Bridge, P. D.; Arora, D. K. (1998). Interpretation of PCR methods for species definition. In: P. D. Bridge, D. K. Arora, D. K. Reddy and R.P. Elander (eds). *Application of PCR in Mycology*. CAB International, London, United Kingdom; 63-84.
- Campbell, J., Joyce, T. (1993).. Enzymatic pretreatment of pulp mill effluents prior colorization by lime precipitation, *Water Resources* 22: 1213-1217.
- Cerniglia, C. E. and M. A. Neitkamp. (1984). Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the aquatic environment in *Metabolism* Varanosi, U. (Ed) CRC Press. Boca Ratón, Florida.
- CITMA. (1997). Informe de la situación ambiental de la provincia Santiago de Cuba. Informe Anual: 25.
- Dubois, M.; Guilles, K.; Hamilton, J.; Robert, P.; Smith, F. (1956). Colorimetric determination of sugars and related substances. *Analyt. Chem.* 28: 350-356.

- Eggen, Trine. (1999) . Biorremediation of recalcitrant aromatic organic pollutants with white rot fungi. Doctor Scientiarum Theses.
- Feijoo, J., Lema, J. (1995) . Tratamiento de efluentes de industria de la madera con compuestos tóxicos y recalcitrantes, mediante hongos. *Afinidad* 4, tomo II: 57.
- Fernández, M. (2001). Ensayo de decoloración en residuales líquidos de vinaza de destilería y extracto líquido de pulpa. Universidad de Oriente. Trabajo de Diploma. Santiago de Cuba. Cuba: 36
- Field, J.; Lettinga, G. (1987). The effect of oxidative coloration on the methanogenic toxicity and anaerobic biodegradability of phenols. *Biological Waste* 29: 161-179.
- García, N. (1999). Producción de setas comestibles *P. ostreatus* sobre subproductos de café y cacao. Tesis de maestría. Universidad de Oriente, CEBI.
- GEPLACEA – PNUD. (1990) Manual de los derivados de la caña de azúcar. Programa GEPLACEA – ICIDCA – PNUD. La Habana, Cuba.
- Giardina P., Palmieri, G., Fontanella B., Riviaccio V., Sannia G. (2000) Manganese preoxidase isoenzymes produced by *Pleurotus ostreatus* grown on wood Sawdust. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 376 (1): 171-179.
- Giardina, P.; Palmieri, G.; Scalani, A.; Fontanella, B.; Cennama, G.; Sonnia, G (1999). Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochem. P.* 314, 655- 663.
- Giardina, P., Palmieri, G, Scalani, A., Fontanella, B., Cennama, G., Sonnia, G (1999). Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Rev. Applied Environmental Microbial.* 66 (3): 920- 924..
- Giardina, P.; Palmieri, G.; Scalani, A.; Fontanella, B.; Cennama, G.; Sonnia, G. (1997). A novel white lacasa from *Pleurotus ostreatus*. *The Journal of Biological Chemistry.* 272, (50). pp. 31301-30307..
- Guillén, G., F. Márquez, J. Sánchez . (1998). Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. *Rev. Iberoam. Micol.* 15: 302 – 306.

- Gutiérrez, A. (1994). Anisaldehyde production and Aryl – Alcohol oxidase and dehydrogenase activities in ligninolytic fungi of the genus *Pleurotus*. *Applied and Environmental Microbiology* 60 (6): 1123-1128.
- Guzmán, G., Mata, G., Salmones, D., Soto-Velazco. (1993). El cultivo de hongos comestibles. Primera Edición .Xalapa, Veracruz, México.
- Hatamoto O., Sekine H., Nakano E. Abe K. (1999). Cloning and expression of a cDNA encoding the laccase from *Schizophium commune*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63: 58-64.
- Hawksworth, D.L. (1995). The dimension of biodiversity magnitude, significance, and conservation. *Micological Research* 35: 641- 655.
- Herrera, Y. (1997). Oxidación enzimática de compuestos tóxicos en medio acuoso. Memorias VII Congreso Nacional de Biotecnología y Ingeniería y II Simposio Internacional sobre Ingeniería de Bioprocesos. Veracruz, México.
- <http://www.etsav.upc.es/tienzyme/precios1301.htm>
- Karahanian E., Corsini G., Lobos S., Vicuña R. (1998). Structure and expresión of laccase genes from the ligninolytic basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. Genes structure and expression. *Biochim. Biophys Acta* 1443: 65-74..
- Bredberg, K. et al.(2001) Microbial detoxification of waste rubber material by wood- rotting fungi. *Bioresource Technology* 83: 221-224..
- Lema, J. Moreira, M., Feijoo, M.. (1996). Producción y empleo de enzimas ligninolíticas para la degradación de compuestos Xenobióticos. Edición Galindo. Fronteras en Biotecnología y Bioingeniería. España.
- Leonowicz, A.; Trojonowski, I. (1999). Induction of new laccase from the fungus *Pleurotus ostreatus* by ferulic acid. *Microbios* 13: 167-174.
- López , Arebalos A y col. (1995). Contamination during cultivation of *Pleurotus ostreatus* in tropical. México. p 495-502.
- Maestro, D.; Borja, R.;Martin, A.; Fiesta, J.A. y Mendoza, J. (1991).Biodegradación de los compuestos fenólicos presentes en el alpechín. *Fasc. Vol.42: 271-276..*

- Marañón, A. y Llórente, I. (1995). Estudio preliminar de las características físico químicas de aguas de café. Trabajo de curso. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba, Cuba.
- Martínez, A. T.; Camarero, S.; Guillén, F.; Gutiérrez, A.; Muñoz, C.; Varela, M.; Martínez, E.; Barrosa, J.; Ruel, K.; Pelayo, M. (1994a). Progress in biopulping of non woody materials: chemical, enzymatic and ultrastructural aspects of wheat –straw delignification with ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*. FEMS Microbiology Review 13: 265-284.
- Martínez, M. J. (1996). MnP Isoenzymes Produced by two *Pleurotus sp.* in liquid Culture and During Wheat- Straw Solid-state Fermentation. Edición Galindo. Fronteras en Biotecnología y Bioingeniería. Madrid, España.
- Martínez-Carrera, D. (1989). Simple Technology to cultivate *Pleurotus sp.* on coffee pulp in the tropics. Mushroom Sci. 12 (Part. II): 169-178.
- Martirani, L.; Giardina, P.; Marzullo, L., Sannia, G. (1996). “ Reduction of phenol content and toxicity in olive oil mill wastewaters with the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*”. Water Research 30 (8), 1914- 1918.
- MERCK. (2003) .Catálogo de reactivos y productos químicos. Frankfur, Alemania.
- Miller, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Ana. Chem. 31, 426-428.
- Montaris, H. P. (1995). Involvement of an extracellular H₂O₂ dependent ligninolytic activity of the white – rot fungus *Pleurotus ostreatus* in decolorization of remazol brilliant blue. Applied Environmental Microbiol. 37: 567-571.
- Morales, José J. (1989). Tratamiento de aguas residuales. Reutilización y prensado de pulpa en el beneficio de café. I Seminario Internacional sobre Biotecnología en la Agroindustria Cafetalera, México.
- Muñoz, C.; Guillén F., Martínez A. T., Martínez M. J. (1997). Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties and participation in activation of molecular oxygen and Mn²⁺ oxidation. Applied and Environmental Microbiology 63, 2166-2174.

- Nieto- López, C. and Sánchez – Vázquez, J.E. (1997). “Micelial growth of *Pleurotus auricularia* in agroindustrial effluents. *Micology Neotropical*. México. 10 : 47 – 56.
- Palmieri, G.; Giardina, P.; Bianco, C.; Scalani, A.; Ceppaso, A.; Sannia, G. (1997). A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Biological Chemistry* 272 (50): 31301-31307.
- Paszeznski, A. col. (1988). Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: purification. *Methods enzymology* 35. 67-71.
- Pelaez, F., Martinyland M. J., Martínez, A.T., .(1995). Screening of 68 sp of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. *Micol. Res.* 99 : 37–42.
- Pellinen, J.; Yin, C.; Joyce, T.; Chang, H. (1988). Treatmentof chlorine bleaching effluent using a white-rot fungus. *Journal of Biotechnology* 8: 67-76.
- Rodríguez, S.; Fernández, M.; Pérez, R. (2000). Biodegradabilidad de las aguas residuales de beneficio húmedo del café. *Rev. INTERCIENCIA* 25(7):12-15.
- Peter Baldrian, Jiri Gabriel. (2003). Lignocellulose degradation by *Pleurotus ostreatus* in the presence of cadmium. *FEMS Microbiology Letters*, 220,235 – 240.
- Rivera, Y. (2000). Determinación de las condiciones experimentales para el cultivo de *Pleurotus sp.* en efluentes coloreados. Tesis de Diploma. Universidad de Oriente, santiago de cuba, Cuba.
- Roaska, L. (1990). Production of *Lentinus edodes* micelium in liquid medium of micelial growth by medium modification. *Mash J. Tropics.* p 10, 79-92.
- Rodríguez, E .; Pickard, M.; Vazquez- Duhalt, R. (1999). Industrial Dye Decolorization by Laccases from Ligninolytic Fungi. *Current Microbiology* 38, 27-31.
- Rodríguez, S., Fernández, M., Bermúdez, R. C.; Morris, H. (2003). Tratamiento de efluentes industriales coloreados con *Pleurotus sp.* *Rev. Iberoam. Micol* 20 (4): 164-168.

- Rodríguez, S.; Fernández, M.; Bermúdez, C.; Morris, H. (2002). Purificación de la enzima lacasa a partir del cultivo de *Pleurotus ostreatus* en medios residuales coloreados. Rev. Cubana de Química XIV(3): 31-37.
- Sánchez, José ; Royse, Daniel. (2002) . La Biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. Editorial Lemusa, S. A. México. pág 27-47.
- Shin, K.; Oh, I.; Kim, C. (1997). Production and purification of Remazol Brilliant Blue R. Decolorization peroxidase from the culture filtrate of *Pleurotus ostreatus*. Appl. Environ. Microbiol.63,1744- 1748.
- Sunagowa, Massahide and Magoé,Yumi. (2001) .Transformation of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* by partide boombardment. FEMS Microbiology Letters, 21: 143 – 146.
- Toscano, G.; Colarieti, M.; Greco, G. (2003) .Oxidative polymerization of phenols by a phenol oxidase from green olives. Enzyme and Microbial Technology XX: 1145-1149.
- Traba, J. A; Marañón, A; I. Salgado; S. Castillo y R. C, Bermúdez. (1992) . Composición y aprovechamiento de los residuales del café. Estación experimental de Café y cacao, Cruce de los Baños, Santiago de Cuba, Cuba,
- Traba, J. A; Marañón, A; I. Salgado; S. Castillo y R. C. Bermúdez. (1994) .Caracterización de los residuales sólidos del café, *sp Coffea arabica*. Ciencias 45. 375- 380.
- Tuomela M. et al. (2002) .Degradation of synthetic C- lignin by various white-rot fungi in soil. Soil Biology Biochemistry. 34:11613- 1620.
- Vidal, G., Méndez, R., Lema, J. (1996) .La industria de pastos celulósicos y papel, Revista Ingeniería Química. 53. 357
- Villa, C.; Huerta, G.; Sánchez, J. (2002) .Fermentation of mixture of corn – cobs and coffe pulp for the cultivation of *Pleurotus ostreatus*. Micol Neotropical Appl. 12: 67-69.
- Wesenberg, D.; Kyriakides, I.; Agathos, S. (2003). White rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. Biotechnology Advances 22: 161-187.

- Yaropolov, A. I.; Skorobogotko, U.; Vortanov, S.; Vorfolomeyev, S. (1994). Lacase Properties, Catalytic Mechanism, and Applcability. *Applied Biochem and Biotechnol.* 49: 257-280.
- Yesilada, O; Sik, S. and Sam, M.(1998). Biodegradation of olive oil mill wastewater by *Coriolus versicolur and Funalia trogi*: effects of agitation, initial COD concentration, inoculum size and immobilization. *World Journal of Microbiology- Biotchnology* 14:37-42.
- Yidiz, Silbel et al. (2002) .Some lignocellulosic waste used as row material in cultivation of the *Pleurotus ostreatus* culture mushroom. *Process Biochemistry.* 38: 301 – 306.
- Young, L., Jian, Yu. (1997). Ligninase–catalized decoloration of syntetic dyes. *Water researh.* Vol 31, N. 5..
- Zadrazil, F. (1978). *Cultivation of Pleurotus.* London, Academic Press. United Kingdom: p 521- 567.
- Zuluaga, Jaime. (1988). Utilización integral de los subproductos de café. I Seminario Internacional sobre Biotecnología en la Agroindustria Cafetalera. México.

Tabla 1. Valor nutritivo estimado de varias especies de setas comestibles (%).

Especies	Índice Aminoácidos	Valor Biológico	Digestibilidad In vitro	Índice nutricional	Récord (a) Proteínas
Pleurotus eonus	95.7	92.7	89	16.7	59.7
Pleurotus florida	84.7	80.4	79	15.9	67.4
Pleurotus flabellatus	82.7	78.4	87	17.8	47.0
Pleurotus sajor-caju	70.9	59.2	63	14.4	67.6
Pleurotus ostreatus	64.8	58.9	82	13.6	40.0
Agaricus bisporus	55.8	49.1	N.D.	17.0	43.1
Volvariella diplasia	87.9	84.1	N.D.	25.1	58.1
Lentinus edades	55.8	49.1	N.D.	9.8	N.D.

Fuente: Andrade , 1996.

Nota: N.D. – no determinada.

(a) – usando el huevo como proteína de referencia (Rajarathanam, 1988)

Tabla 2 Valores óptimos de los factores que influyen en el crecimiento de Pleurotus sp.

Factor	Crecimiento micelial	fructificación
Temperatura	25-33 °C	28 °C
Humedad relativa	Baja humedad	85%
Humedad del sustrato	70%	50%
Concentración de CO ₂	20- 25 %	más de 0.6 % (buena ventilación)
Luminosidad	oscuridad	Suficiente para leer.
pH del sustrato	6.0- 7.0	6.5- 7.0

(Zadrazil,1978; Chang y Miles ,1989; Kurtman, 1989; Sánchez y Roice, 2002)

Tabla 3. Caracterización físico-química del líquido residual de la pasterización de la pulpa café (ELP).

Parámetro	Valor
Temperatura	90 °C
pH	4.51
Densidad (g/mL)	1.039
Conductividad (ms)	4.52
Índice de refracción	1.32
Oxígeno disuelto (mg/L)	7.4
DQO (mg/L)	59.423
DBO (mg/L)	31.551
Nitrógeno total (%)	0.0396
Fósforo (mg/L)	1.9
Sodio (mg/L)	7.96
Potasio (mg/L)	28.47
Calcio (mg/L)	19.8
Magnesio (mg/L)	8.9

(Fuente: Marañon, 1995)

Tabla 4. Comparación entre la composición bromatológica de los sustratos empleados. (% base seca)

Parámetros	Pulpa de café
Humedad	13.01
Materia seca	86.99
Proteína bruta	11.16
Grasa cruda	7.98
Fibra bruta	1465
Carbohidratos	58.24
Cenizas	7.97
Digestibilidad	76.01
Cafeína	2.00
Taninos	1.34
Fenoles	0.38

(Fuente: García, 1999)

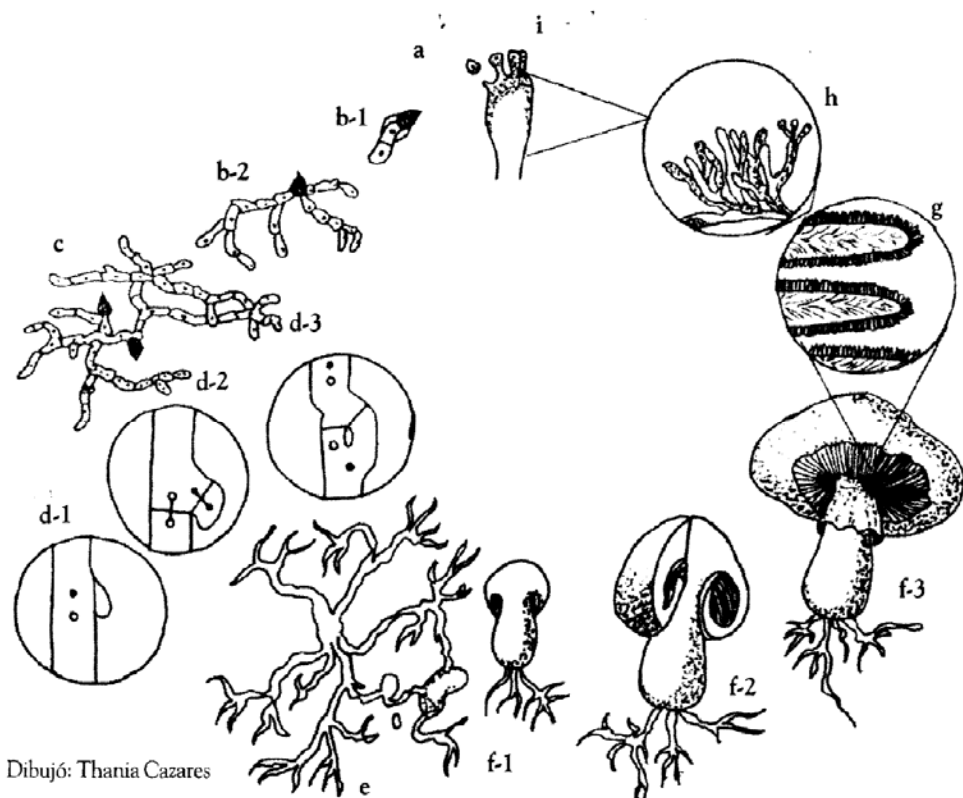


Figura.1 .Ciclo de vida de hongos comestibles: a) basidiospora; b)germinación formación del micelio homocarión; c) fusión de dos micelios homocarión compatibles; d) formación del micelio dicarión; e) formación de primordios; f) desarrollo del carpóforo; g) himenio; h) formación de las basidias; i) basidia diferenciada y basidiosporas.

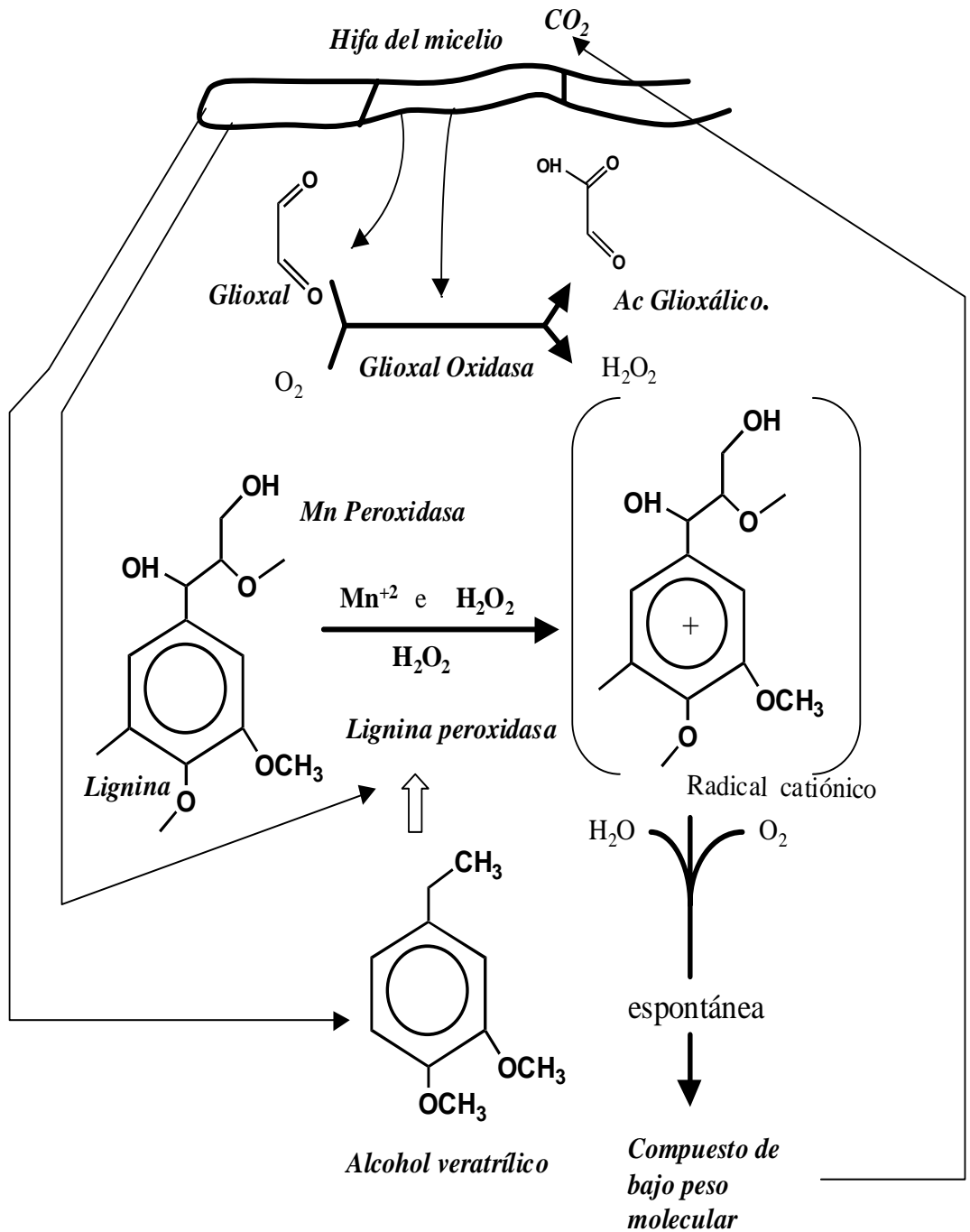


Figura.2 . Sistema ligninolítico de hongos de pudrición blanca



Figura 3
Crecimiento de la cepa 3024 de *Pleurotus* sp. en el ELP, en cultivo sumergido..



Figura 8
Decoloración del ELP por el tratamiento con el hongo *Pleurotus* sp..

Tabla 5 Influencias del crecimiento de la cepa 3022 en la remoción del color y la carga orgánica, bajo diferentes condiciones de cultivo,.

Tratamientos	Biomasa (g/L)	Remoción de color (%)	Remoción de DQO (%)
1 (50% ELPc/MM)	8.3 b	35.9 a	81.6 b
2 (50% ELPs/MM)	0.17 d	28.3 ab	90.8 a
3(100% ELPc/MM)	9.95 a	55.2 a	66.1 c
4 (100% ELPs/MM)	0.3 d	10.0 b	90.3 a
5 (50% ELPc/MM) (estático)	0.5 d	56.3 d	31.6 d
6 (Medio mínimo)	6.9 c	----	----

c/MM: suplementado con medio mínimo.

s/MM: sin suplementar con medio mínimo

Letras iguales en columna significan no diferencias estadística; letras diferentes, diferencias estadísticamente demostradas para $\alpha = 0.05$.

Tabla 6 . Influencias del crecimiento de la cepa 3024 en la remoción del color y la carga orgánica, bajo diferentes condiciones de cultivo.

Tratamientos	Biomasa (g/L)	Remoción de color (%)	Remocion de DQO (%)
1 (50% ELPc/MM)	8.2 b	74.6 a	71.63 a
2 (50% ELPs/MM)	0.16 c	78.0 a	75.93 a
3 (100% ELPc/MM)	14.6 ab	68.6 ab	49.69 b
4 (100% ELPs/MM)	0.2 c	69.0 a	52.4 b
5 (50% ELPc/MM) (estático)	2.45 b	49.7 b	49.2 b
6 (Medio mínimo)	7.7 b	----	----

Letras iguales en columna significan no diferencias estadísticas; letras diferentes, diferencias estadísticamente demostradas para $\alpha = 0.05$.

Tabla .7. Influencias del crecimiento de las cepas 3022 y 3024 en la remoción del color y la carga orgánica, bajo diferentes condiciones de cultivo.

Cepas	Tratamientos	Biomasa (g/L)	Remoción de color (%)	Remoción de DQO (%)
3 0 2 4	1 (50% ELPc/MM)	7.0 b	53.3 ab	77.3 ab
	2 (50% ELP, CG)	1.5 d	58.0 ab	46.5 d
	3(100% ELPc/MM)	8.2 ab	44.0 b	73.8 ab
	4 (100% ELP, CG)	3.2 d	73.5 a	79.3 a
3 0 2 2	1 (50% ELPc/MM)	5.5 c	2.8 c	76.5 ab
	2 (50% ELP, CG)	2.7 d	46.3 b	41.5 d
	3 100% ELPc/MM)	7.4 b	35.3 bc	65.2 c
	4 (100% ELP, CG)	3.4 d	57.9 ab	70.7 bc

CG: adicionando sólo glucosa al residual;

ELPc/MM: suplementando con todos los componentes del medio mínimo.

Letras iguales en columna significan no diferencias estadísticas; letras diferentes, diferencias estadísticamente demostradas para $\alpha = 0.05$.

Se reportan los valores medios pues los C.V no sobrepasan el 5% para todos los casos

Tabla 8. Cinética del crecimiento de la cepa 3024 cultivada en el ELP sin diluir, suplementado con medio mínimo y agitación de 160 r.p.m.

Días	Biomasa (g/L)	Azúcares Reductores (g/L)	Lac (U/mL)	MnP (U/mL)	Remoción de color (%)	Remoción de DQO (%)
0	0.00	20.07	0.00	0.00	0.00	0.00
3	12.25	18.05	1.40	0.61	50.00	22.20
6	12.50	14.85	1.93	1.72	55.50	29.50
9	15.07	5.19	8.53	1.42	66.70	70.80
12	18.94	4.91	3.84	0.82	77.80	80.00
15	19.10	3.02	3.48	0.00	77.80	80.80

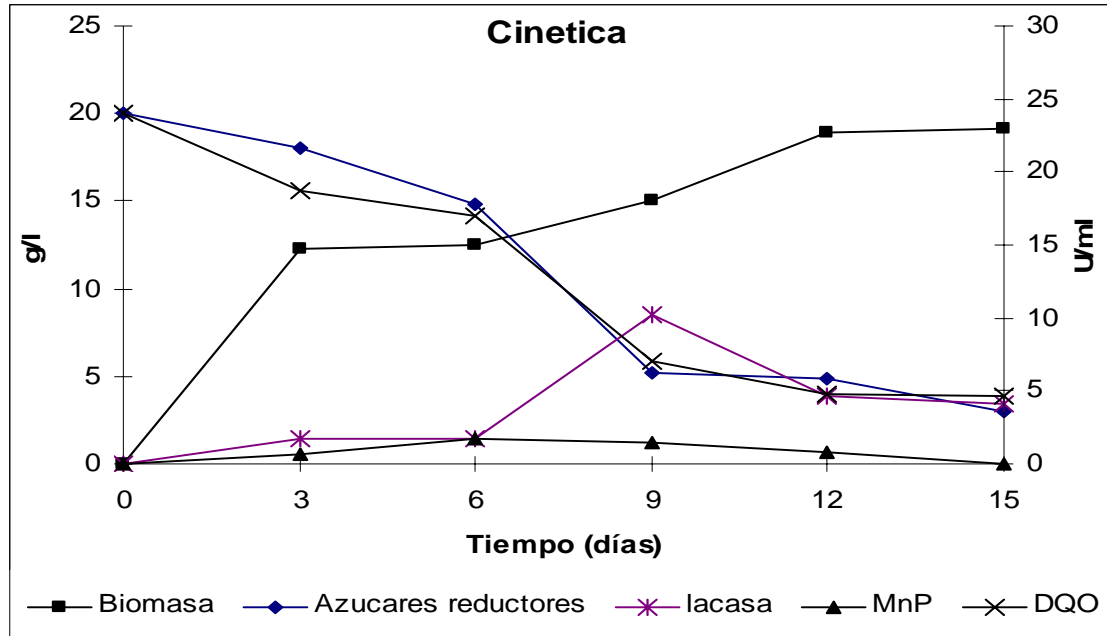


Figura 4. Cinética del crecimiento de la cepa 3024 y la excreción de las enzimas lacasa y peroxidasa, y su influencia en la reducción de los azucres reductores, el color y la DQO.

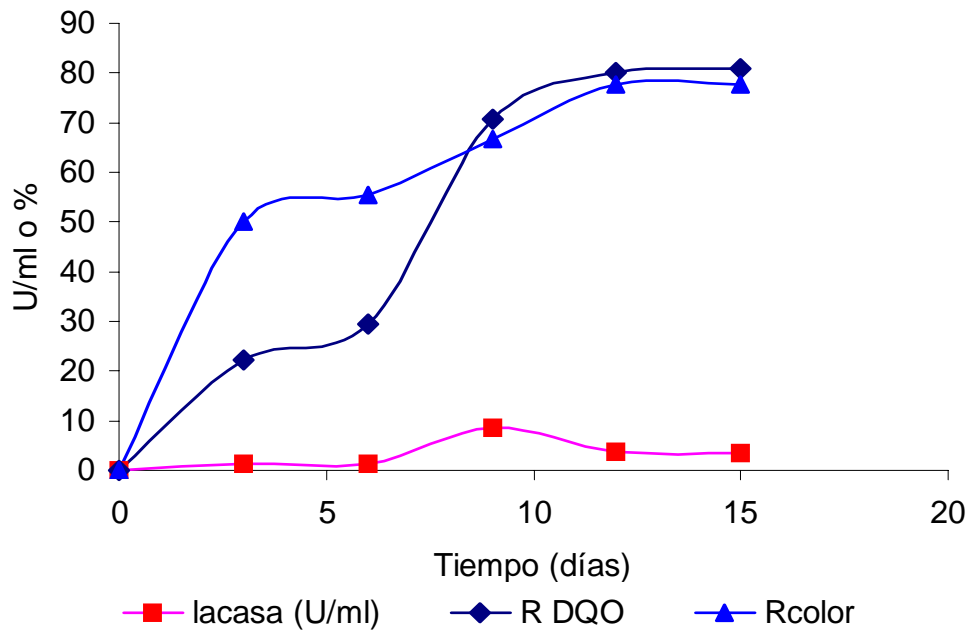


Figura 5. Excreción de la enzima lacasa por la cepa 3024, y su relación con la remoción del color y la carga orgánica del ELP.

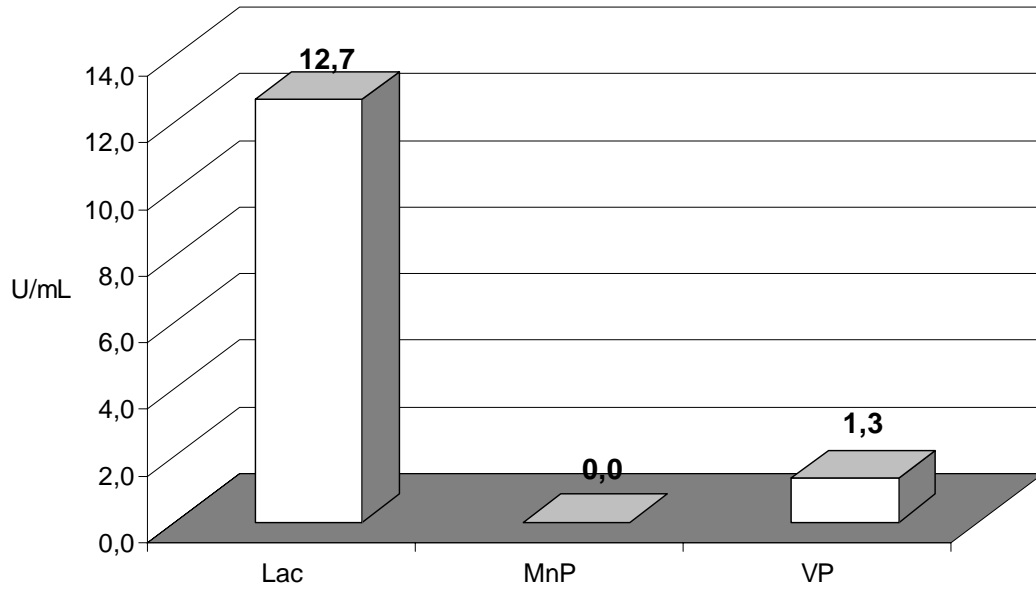


Figura 6. Comportamiento de las actividades enzimáticas al finalizar el tratamiento del ELP con la cepa 3024 de *Pleurotus sp.*a los 10 días de fermentación.

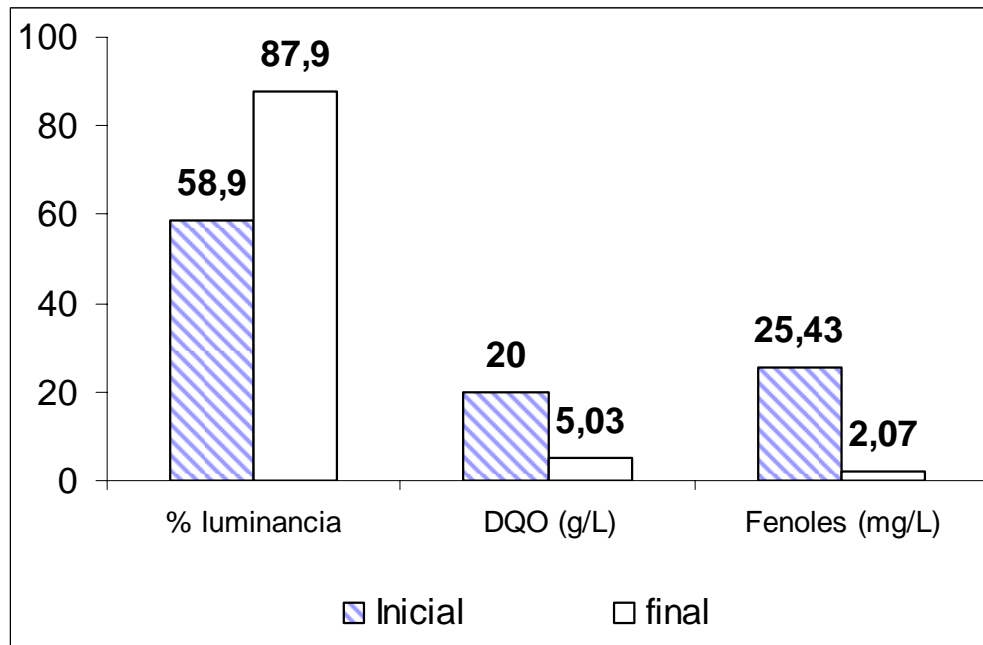


Figura 7. Resultados del tratamiento del ELP con la cepa 3024 de *Pleurotus sp.* a los 10 días de fermentación.

Tabla 9. Tratamiento del ELP por la cepa 3024 y su influencia en la remoción de fenoles, DQO y el color.

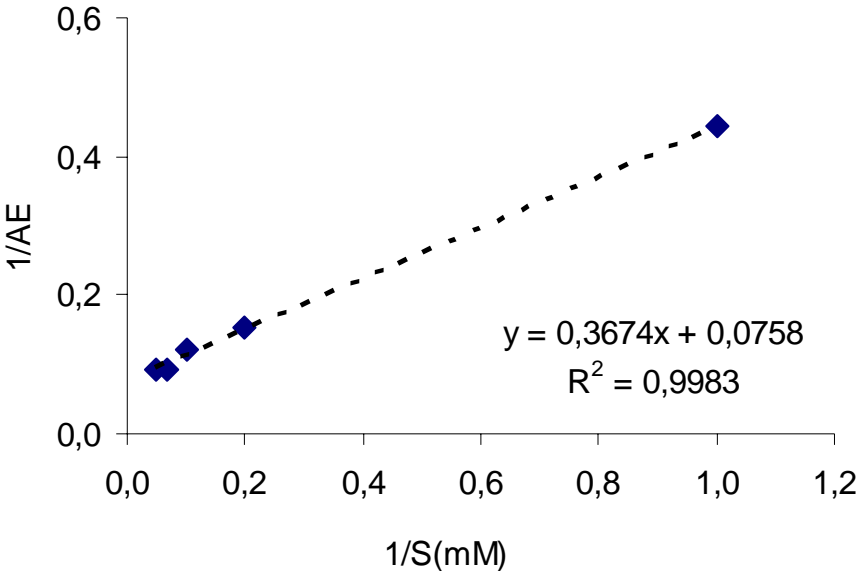
Muestra	Remoción de color (%)	Remoción de DQO (%)	Remoción de Fenoles (%)
ELP decolorado	74.5	78.9	92.0

Tabla 10. Precios de los componentes del medio mínimo(Martinez,1997)

Cantidad/500mL	Precios
Glucosa(10g)	11.00 USD/ kg
Extracto de levadura(1g)	107.00 USD/500g
Peptona(2.5g)	198.00 USD/2.5kg
MgSO ₄ (0.25g)	40.00 USD/2.5kg
KH ₂ PO ₄ (0.5g)	35.00 USD/kg

Agar Extracto Malta*	55.00 USD/ kg
----------------------	---------------

(* El agar extracto malta no es parte del medio minimo.)



C(S)(mM)	AE	1/S	1/AE
1	2,26	1,000	0,442
5	6,56	0,200	0,152
10	8,29	0,100	0,121
15	10,87	0,067	0,092
20	10,85	0,050	0,092

Vmax = 13,2 U/ml
Km = 4,85 mM

Figura 9.
Determinación de parámetros cinéticos de Lac ensayados con guayacol (pH 6) en el
crudo decolorado

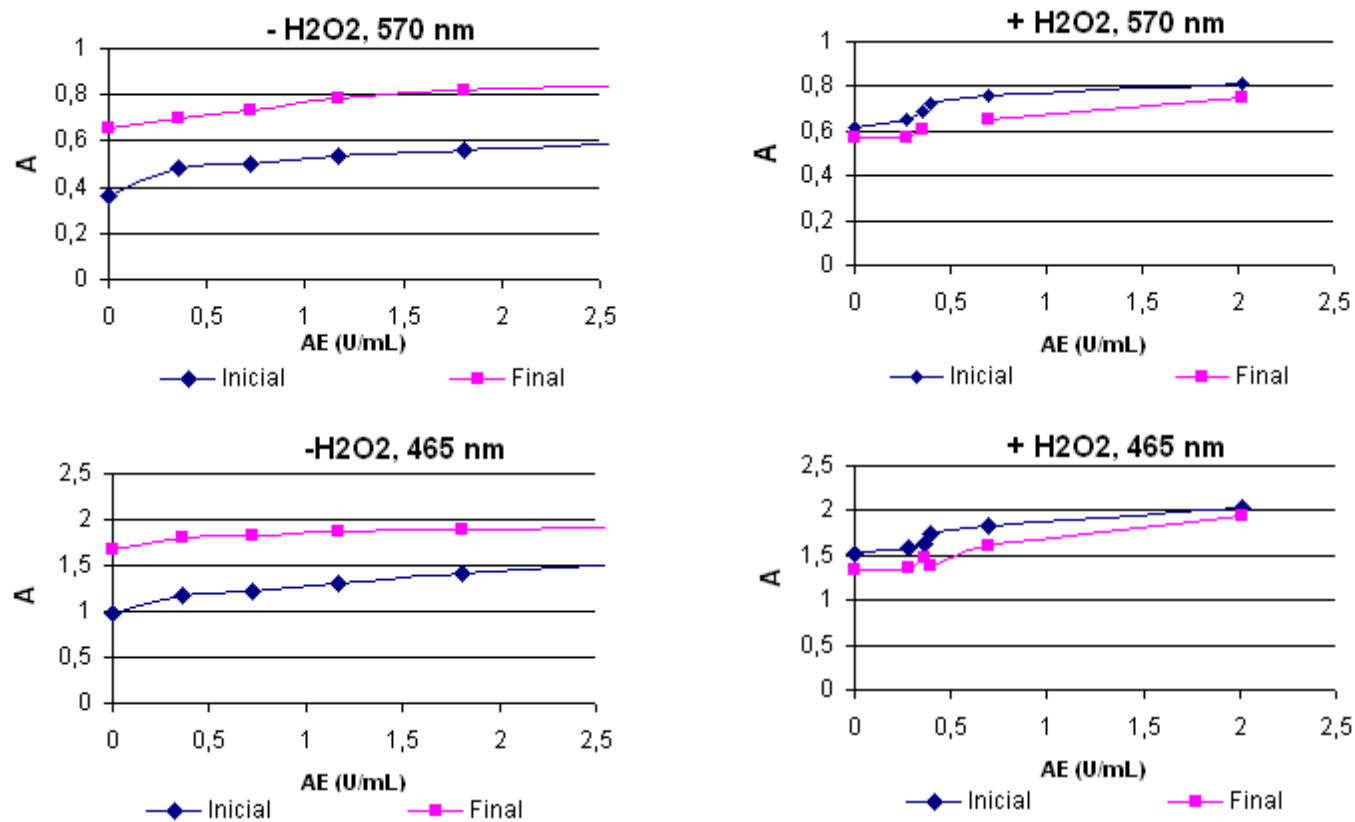


Figura 10. Relación de la actividad enzimática con la decoloración de ELP fresco, en presencia y ausencia de H₂O₂.

Figura 11.
Inóculos primarios obtenidos por vía convencional a partir de cultivo sólido (A) y a partir de biomasa obtenida en ELP (B).

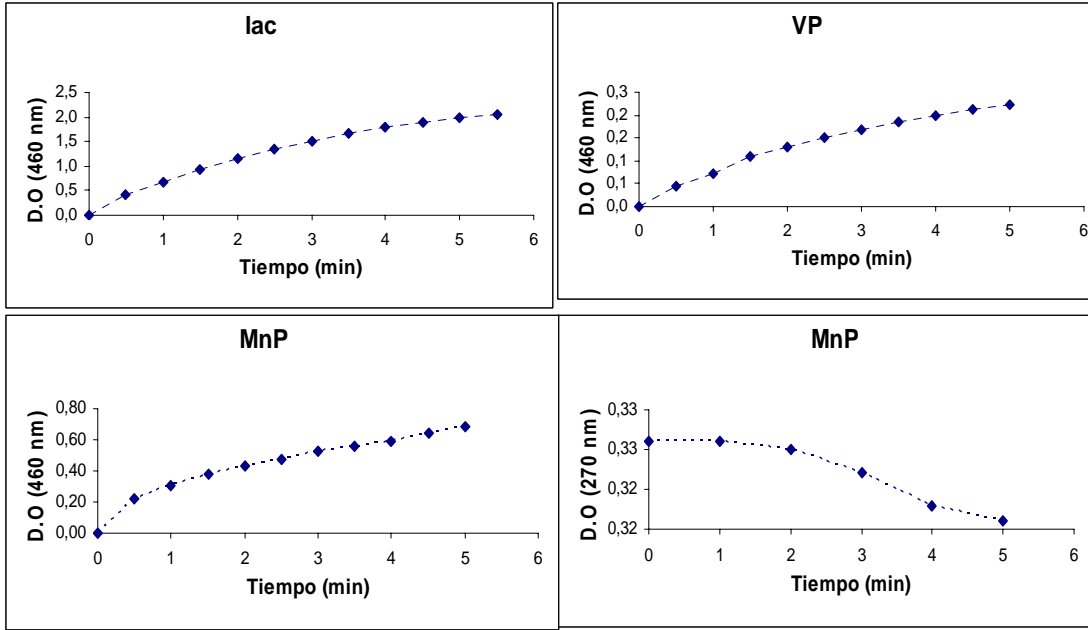


Figura 12. Cinéticas enzimáticas desarrolladas para determinar los tiempos de ensayo, el cual fue escogido 3 minutos para todas las enzimas: Lac, MnP y VP

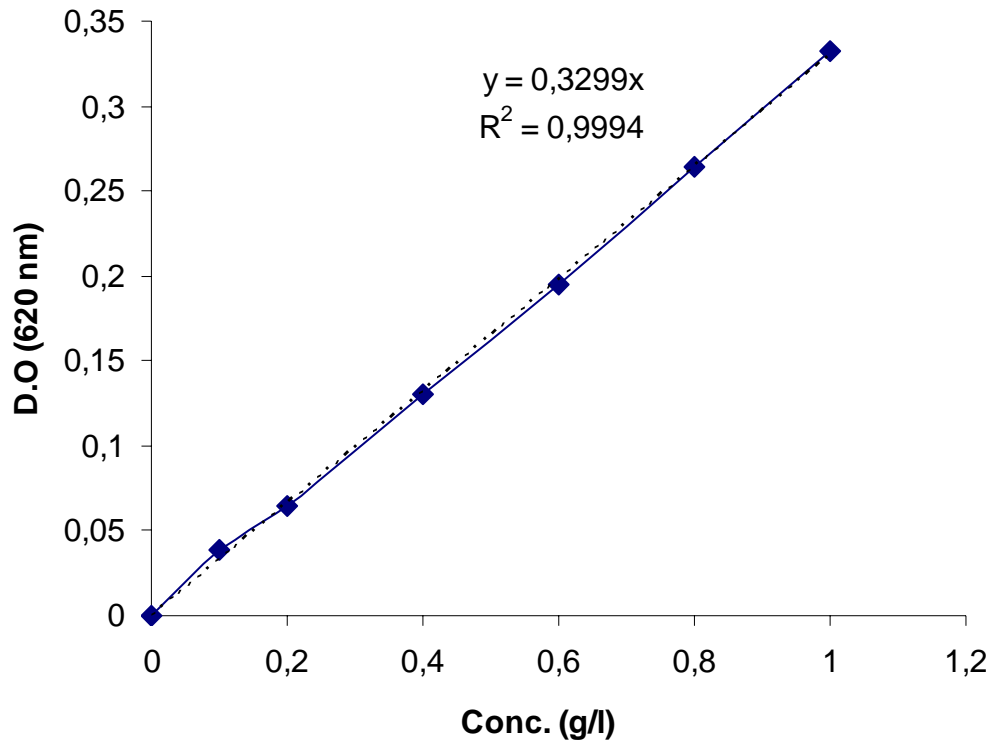


Figura 13.
Curva de calibración de la DQO obtenida con la cepa 3022 de *Pleurotus sp.*

