



**UNIVERSIDAD DE ORIENTE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
Centro de Estudios de Biotecnología Industrial**

**DECOLORACIÓN DE LOS RESIDUALES DE LA
PASTEURIZACIÓN DE LA PULPA DE CAFÉ Y LA
VINAZA POR *Pleurotus sp.***

**TESIS PRESENTADA EN OPCIÓN AL GRADO CIENTÍFICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Autor: MSc. Suyén Rodríguez Pérez

**Tutoras: Dra C. Rosa Catalina Bermúdez Savón
PhD Paola Giardina**

**Santiago de Cuba
2006**

🇺🇸 *A mis dos familias: la del Distrito y la de Versalles.*

🇺🇸 *A mis amigos sinceros*

🇺🇸 *Al colectivo del CEBI*

🇺🇸 *A la Revolución por hacerme sentir orgullosa de ser cubana,
dondequiera que he estado.*

Toda nuestra ciencia, comparada con la realidad, es primitiva e infantil...
y sin embargo, es lo máspreciado que tenemos.

Albert Einstein

Quisiera en esta simple, pero necesaria hoja, recoger mis agradecimientos a quienes han hecho más transitable el camino a la realización del doctorado.

Agradezco

A mis tutoras: A la Dra. Rosa C. Bermúdez, jefa y amiga además, por sus enseñanzas, confianza y sus horas de desvelos y a la Dra. Paola Giardina por sus consejos profesionales oportunos y su empeño en que yo saliera adelante en esta investigación.

A mis compañeros y amigos: A los permanentes críticos de mi trabajo, pero en los que siempre encontré una frase de aliento para seguir adelante y la seguridad de que lo lograría: Serrat (mi eterno oponente), Arelis, Nora, Morris. A Isa, además por todo su apoyo analítico y a Rosa, por su disposición a todo. A María del Carmen, aunque distante siempre presente. A Tania, por demostrarme que es posible la colaboración y forjar una gran amistad, si se ama la investigación.

A profesores. Aquellos de la U.O que han sido cómplices en este empeño y de los cuales siempre he recibido apoyo: Alina, América, Bigan, Bernardo. Los de la Facultad de Biología de la UH que han estado dispuestos a dedicar parte de su tiempo para hacer más comprensible y valioso este trabajo: Gilda, Miguel, Jorge (permítanme tutearlos). A todos los que hicieron posible mi predefensa, tránsito obligado para llegar a esta etapa.

A mis estudiantes. A ellos que compartieron conmigo cada paso de esta investigación, con la profesionalidad y deseos de quién se sabe parte de ella: Héctor y Kourouma.

A quien, no por mencionarlo casi de último, pierde el privilegio de sentirlo muy necesario para mí. A mi colega, amigo y esposo: Maikel.

A la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado de la U.Ote por su ayuda material y a la Comisión de Grado. A Eugenio por "vestir" esta tesis. Al equipo de apoyo: Daniel, Elia, Roberto, en quienes sobraba la disposición y con ellos todo era más fácil.

A todos aquellos que siempre confiaron en que podía hacerlo o simplemente, me desearon mucha suerte.

MUCHAS GRACIAS!!

LEYENDA

AAO: .Aril-alcohol oxidasa.

ABTS: Acido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)

AGV: Acidos grasos volátiles

APD: Agar papa dextrosa.

COT: Carbono orgánico total

DBO: Demanda bioquímica de oxígeno.

DDT: Pesticida 1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)etano

DMP: 2,6-dimetoxifenol

DQO: Demanda química de oxígeno.

DyP: Peroxidasa decoloradora de colorantes.

ELP: Residual de la pasteurización de la pulpa de café.

HAA: Acido hidroxiantranílico.

HBT: Hidroxibenzotriazol.

HPA: Hidrocarburo policíclico aromático.

Km: Constante de Michaelis-Menten.

Lac: Enzima lacasa.

Lac1, Lac1a, Lac2, Lac2a, Lac3: Isoenzimas de lacasa (descritas en este trabajo).

LC1, LC2, LC3, LC4: isoenzimas de lacasa (descritas en los trabajos de Mansur y col.)

LiP: Enzima lignina peroxidasa.

MBH: Medio basal para hongos.

MIP: Enzima peroxidasa independiente de manganeso.

MnP: Enzima manganeso peroxidasa.

MSH: Medio sintético para hongos.

PDY: Medio papa dextrosa-extracto de levadura.

PMSF: Inhibidor de proteasa, Fluoruro de bencil-sulfonilo.

POX1b: Isoenzima de lacasa, fenol oxidasa 1b (descrita en los trabajos de Palmieri y col.).

POXA3: Isoenzima de lacasa, fenol oxidasa A3 (descrita en los trabajos de Palmieri y col.).

POXC: Isoenzima de lacasa, fenol oxidasa C (descrita en los trabajos de Palmieri y col.).

RBBR: Colorante textil Azul de Remazol Brillante R.

R_{color}: Remoción del color.

R_{DQO}: Remoción de la demanda química de oxígeno.

SS: Sólidos Suspendidos.

TY: Medio triptona-extracto de Levadura.

V: Vinaza de destilería.

VA: Alcohol veratrílico.

Vmax: Velocidad máxima.

μ: velocidad de crecimiento específica

Síntesis

En el presente trabajo se evalúa la capacidad de *Pleurotus sp.* y sus enzimas ligninolíticas para decolorar las aguas residuales de la producción de setas comestibles (sobre pulpa de café) y de alcohol: residual de la pasteurización de la pulpa de café (ELP) y la vinaza (V), respectivamente. Se seleccionó la cepa de *Pleurotus sp.* CCEBI 3024 para el estudio y se evaluó la influencia de las condiciones de cultivo en la decoloración, definiendo que se requiere de la adición de una fuente carbonada y se favorece el proceso en cultivo agitado, a pH 6,5. Se determinaron las enzimas ligninolíticas involucradas en el proceso de decoloración de ambos residuales, concluyendo que este microorganismo exhibe diferentes actividades enzimáticas y aparición de las mismas (en distintas etapas del crecimiento) en dependencia del residual. Se comprobó que la lacasa es la enzima más relacionada con la decoloración de los dos residuales y en específico, la isoenzima Lac2 participa de forma activa en la reducción del color. Se obtuvieron valores similares de decoloración por encima del 70 %, reduciéndose también de modo significativo otros parámetros (DQO y fenoles). El estudio realizado contribuye al conocimiento teórico y la aplicación práctica de los hongos de pudrición blanca, en procesos de tratamiento y biorremediación de efluentes industriales.

INDICE

	página
INTRODUCCIÓN	1
I. REVISION BIBLIOGRAFICA	7
I.1 Impacto de los residuales industriales coloreados.	7
I.1.1 Residuales industriales de interés en este estudio.	10
I.2 Utilización de los microorganismos en la biodegradación de contaminantes: los hongos de pudrición blanca.	13
1.2.1. <i>Pleurotus sp.</i> como biodegradador.	16
.....	
I.3 Enzimas ligninolíticas de los hongos de pudrición blanca.	17
I.3.1 Mediadores de pequeño tamaño molecular y cooperación de enzimas ligninolíticas.	21
II. MATERIALES Y MÉTODOS	25
II.1 Caracterización de los residuales.	25
II.1.1 Residuales industriales utilizados.....	25
II.1.2 Determinación de pH.....	25
II.1.3 Determinación de color (luminancia).....	25
II.1.4 Demanda química de oxígeno.....	26
II.1.5 Demanda bioquímica de oxígeno.....	27
II.1.6 Sólidos totales y en suspensión.....	27
II.1.7 Determinación de fenoles.....	27
II.1.8 Determinación de fósforo.....	27
II.1.9 Determinación de nitrógeno.....	27
II.1.10 Carbohidratos totales solubles.....	27
II.1.11 Determinación de metales e iones.....	28
II.1.12 Determinación de ácidos grasos volátiles (AGV).....	28
II.2 Microorganismos y su conservación.	28
II.3 Medios de cultivo.	29
II.4 Selección del microorganismo.	30
II.4.1 Criterios de selección.....	30
II.4.2 Medios y condiciones de cultivo.....	30
II.5 Cultivos en medio líquido.	31
II.5.1 Preparación del inóculo.	31
II.5.2 Condiciones generales para los cultivos líquidos.....	32
II.5.3 Cultivos con los residuales.....	32
II.5.4 Cultivos para estudiar el patrón enzimático en presencia de los residuales en estudio.....	33
II.6 Medición de las actividades enzimáticas ligninolíticas.	34
II.6.1 Actividad lacasa.....	34
II.6.2 Actividad lignina peroxidasa.....	35
II.6.3 Actividad manganeso peroxidasa.....	35
II.6.4 Actividad peroxidasa versátil o peroxidasa independiente de manganeso.....	35
II.6.5 Actividad peroxidasa decoloradora de colorantes.....	35

II.6.6	Actividad aril-alcohol oxidasa.....	36
II.7	Decoloración de la vinaza con extractos enzimáticos crudos.....	36
II.8	Decoloración de la vinaza con enzimas lacasas purificadas.	37
II.9	Fraccionamiento cromatográfico de lacasas.	37
II.10	Ensayo de toxicidad.	38
II.11	Otras técnicas empleadas.....	39
II.11.1	Determinación del peso seco.....	39
II.11.2	Determinación de glucosa.....	39
II.11.3	Zimogramas de lacasas.....	39
II.11.4	Determinación de proteínas.....	40
II.12	Análisis estadístico de los resultados.....	40
III.	RESULTADOS.....	41
III.1	Caracterización de los residuales coloreados de la pasteurización de la pulpa de café (ELP) y la vinaza de destilería (V).....	41
III.2	Selección de la cepa de <i>Pleurotus sp.</i> para el trabajo con los residuales. Ensayos cualitativos.	42
III.2.1	Evaluación de la capacidad ligninolítica de cepas de <i>Pleurotus sp.</i> en medio sólido.	44
III.3	Estudio de las condiciones y medios de cultivo para favorecer la decoloración de los residuales industriales ELP y V.	46
III.3.1	Influencia de la fuente de carbono y su concentración.	47
III.3.2	Utilización de diferentes nutrimentos de los medios de cultivo y del cobre como inductor.	48
III.3.3	Influencia de la agitación y el pH en la decoloración de la vinaza y el residual de la pasteurización de la pulpa de café por <i>Pleurotus sp.</i> CCEBI 3024.	50
III.4	Ensayo de decoloración del ELP y cinética del biotratamiento.	51
III.5	Ensayo de decoloración de la vinaza y cinética del biotratamiento.	53
III.5.1	Cinética del biotratamiento de la vinaza.....	54
III.5.2	Determinación de las enzimas ligninolíticas involucradas en la decoloración de la vinaza.....	55
III.5.2.1.	<i>Estudio de las isoenzimas de lacasa presentes en la decoloración de la vinaza.....</i>	58
III.5.3	Estudio de la decoloración de la vinaza con isoenzimas de lacasa y extracto enzimático crudo.....	60
IV.	DISCUSION DE LOS RESULTADOS.....	62
IV.1	Caracterización de los residuales coloreados de la pasteurización de la pulpa de café y la vinaza de destilería.....	62
IV.2	Selección de la cepa de <i>Pleurotus sp.</i> para el trabajo con los residuales. Ensayos cualitativos.....	64
IV.3	Condiciones de cultivo para favorecer la decoloración de ELP y vinaza por <i>Pleurotus sp.</i> CCEBI 3024.....	72
IV.4	Decoloración y biotratamiento del residual de la pasteurización de la pulpa de café (ELP).	80
IV.5	Decoloración y biotratamiento de la vinaza de destilería (V) por <i>Pleurotus sp.</i> CCEBI 3024.	85

IV.5.1	<i>Decoloración de la vinaza con isoenzimas de lacasa y extractos enzimáticos crudos</i>	92
		
V.	CONCLUSIONES	96
VI.	RECOMENDACIONES	97
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	98
	ANEXOS	

I.REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La acción antropogénica ha causado un desequilibrio de los ecosistemas a escala mundial, provocando daños irreparables para el medio ambiente. El agua, un componente esencial para la vida de los organismos, es uno de los elementos naturales en que más se ha evidenciado la acción descontrolada del hombre; puesto que cerca del 85 % de los ecosistemas acuáticos han sido transformados, eliminando con esto la dinámica natural de las poblaciones de plantas y animales (Maier, 2002). La mayor afectación de los acuatorios se debe a la liberación en su curso de aguas residuales industriales, las que provocan diferentes efectos negativos sobre sus propiedades y los organismos a ellos asociados.

I.1. Impacto de los residuales industriales coloreados.

Los efluentes industriales causan diferentes impactos sobre el medio ambiente, que están relacionados con su contribución en cuanto a: sólidos en suspensión (SS), materia orgánica (DQO y DBO), toxicidad y color. La demanda química de oxígeno (DQO) representa a los compuestos químicos susceptibles a la oxidación por vía biológica o química. La demanda bioquímica de oxígeno (DBO) se atribuye a la presencia de compuestos orgánicos como carbohidratos, ácidos orgánicos de bajo peso molecular, alcoholes, entre otros, fácilmente biodegradables por microorganismos (bacterias generalmente). La toxicidad se relaciona con compuestos de estructura compleja como hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA), fenoles, polifenoles, compuestos organoclorados y otros. La presencia de color en un agua residual es el resultado de la presencia de grupos cromóforos o polímeros de alto peso molecular, como los colorantes y la lignina; los que pueden constituir a su vez compuestos tóxicos.

Según Campbell y Joyce (1993) el color se define como una forma no convencional de contaminación de las aguas. Es por ello, que la descarga de efluentes coloreados en el curso de los recursos hídricos, constituye una problemática ambiental a considerar desde el punto de vista de los sistemas acuáticos. Los compuestos coloreados presentes en estas aguas, reducen la cantidad de oxígeno disuelto y de la luz incidente; provocando una disminución en el proceso fotosintético que afecta no solo al fitoplancton, sino a toda la cadena alimenticia a él asociada; provocando desbalances en las poblaciones e incrementando la DQO (Kort, 1979; Sodergren, 1989).

El color en las aguas puede resultar de la presencia de iones metálicos naturales (Fe^{2+} o Mn^{2+}), humus, turba, el plancton y residuales industriales (APHA, 1998). Cuando nos referimos a aguas

residuales industriales, el color viene a menudo asociado a contaminantes de compleja estructura molecular y de baja biodegradabilidad, lo que hace más difícil su biodisponibilidad y degradación, produciéndose una bioacumulación de los mismos y aparición de la recalcitrancia y toxicidad, como características no deseables.

El color en las aguas residuales puede ser clasificado como aparente y verdadero (Sawyer y McCarty, 1967). El color aparente es de fácil eliminación, ya que se origina por la presencia de materiales sólidos en suspensión y se elimina al desaparecer éstos por filtración, sedimentación o centrifugación. Mientras el color verdadero, es el atribuido a sustancias disueltas, siendo por tanto de mayor complejidad su eliminación por tratamientos químico-físicos o biológicos.

Se han logrado identificar las industrias de mayor emisión de efluentes coloreados, sus características y efectos directos al medio ambiente; pero no siempre se le ha dado la importancia que merece el solucionar los problemas que causan por lo que a continuación ejemplificaremos con alguna de ellas.

Tanto por el caudal de sus efluentes, como por la composición de los mismos (organoclorados, derivados lignínicos de alto peso molecular, poliaromáticos, etc.), la industria forestal es una de las industrias potencialmente más contaminantes; siendo el tratamiento de sus aguas residuales uno de los problemas más críticos a resolver (FAO, Julio 2004). La DBO de estos efluentes se genera por la elevada biodegradabilidad de los carbohidratos, ciertos alcoholes y ácidos orgánicos presentes en elevadas concentraciones (Aktar y col., 1997). Sin embargo, el color procede de los derivados lignínicos de alto peso molecular, que no contribuyen a la DBO, pero sí incrementan notablemente la DQO y la toxicidad.

Los residuales líquidos generados por ésta industria producen efectos tóxicos sobre los peces y otros organismos marinos, provocados por los propios componentes de la madera como son los taninos y las resinas. De igual forma, las fracciones de lignina y sustancias húmicas pueden causar problemas en las plantas de potabilización de aguas al transformarse en compuestos organoclorados durante la etapa de cloración, los que pueden tener efectos cancerígenos (Feijoo y Lema, 1999).

Los problemas planteados en los últimos años referentes a la contaminación producida por las industrias de pasta de celulosa y papel, requieren de su atención en el aspecto medioambiental para su solución inmediata. En algunos casos la contaminación puede ser debida, no solo a los propios procesos de obtención de celulosa, sino también a las fábricas que suministran sustancias químicas para el uso específico en esta industria (Feijoo y col., 1997). La etapa de blanqueo es la de mayor contaminación puesto que se utilizan grandes cantidades de agua para la eliminación de

la lignina residual, las cuales se convierten en elevados caudales de aguas residuales de baja carga orgánica pero fuertemente coloreados. La secuencia clásica de blanqueo con cloro supone la generación de efluentes con alto contenido de organoclorados, compuestos estos de gran riesgo para los sistemas biológicos (Pellinen y col., 1988; Vidal y col., 1996).

La industria textil genera en los procesos de teñido y estampado, enormes volúmenes de aguas residuales con elevado contenido de colorantes y otros compuestos químicos. Alrededor del 15 % de los tintes empleados son liberados en los efluentes, junto con otros compuestos químicos (Robinson y col., 2001). Por lo que el tratamiento del agua de desecho de esta industria puede ser muy complejo debido a la diversidad estructural de los colorantes y la presencia de residuos de productos químicos diversos (Willmott y col., 1998).

Los colorantes que se utilizan en esta industria son diseñados para resistir la exposición a factores ambientales, muchos agentes químicos oxidantes y el ataque microbiano, lo cual supone la bioacumulación en los sistemas naturales donde se liberan las aguas residuales que los contienen. Además del efecto visual negativo que provoca la liberación de estos efluentes coloreados y el efecto adverso sobre la DQO de estas aguas, muchos colorantes sintéticos son tóxicos, mutagénicos y carcinogénicos; por lo que su tratamiento y biodegradación es de gran importancia (Robinson y col., 2001).

En la industria alimenticia también se generan grandes volúmenes de aguas residuales y en este sentido se destacan dos residuos, cuyas características de poseer un color muy oscuro ha atraído la atención de los investigadores para sus tratamientos y reducción de la toxicidad que manifiestan. Ellos son los residuales de la industria de aceite de olivas y los de la destilación para obtención de alcohol.

La contaminación generada por las aguas residuales del procesamiento del aceite de oliva se ha convertido en un problema crucial, sobre todo en el área mediterránea; pues más de 30 millones de metros cúbicos son producidos por año. Este efluente, también llamado “alpechín”, es negro y altamente tóxico conteniendo una elevada concentración de compuestos aromáticos. La máxima concentración de DBO y DQO pueden alcanzar los 100 y 200 g/L, respectivamente. En este residual están presentes compuestos fenólicos en altas concentraciones (hasta 10 g/L), los cuales son responsables de su color y sus propiedades fitotóxicas y antimicrobianas (Maestro y col., 1991; Ramos-Cormenzana, 1996).

I.1.1- Residuales industriales de interés en este estudio.

En países tropicales y subtropicales, donde la caña de azúcar es un cultivo importante, las melazas por lo general son utilizadas como sustrato para la producción de etanol con levaduras. El producto final puede ser alcohol 95 % o licor 40-45 % (ron, aguardiente) y vinazas, como residuo líquido fuertemente coloreado y contaminante de las fábricas de ron y licores.

Estudios realizados concluyen que después de la destilación de alcohol, se obtienen aproximadamente 15 litros de vinaza por cada litro de alcohol producido (Singh y col., 1995). Una destilería típica puede producir diariamente 20 000 litros de aguas residuales muy coloreadas que constituyen una amenaza para el medio ambiente. Por una parte porque el color oscuro puede bloquear el paso de la luz en ríos y cursos de agua donde sean vertidas, afectando la fotosíntesis y por tanto, la oxigenación necesaria para la vida acuática; y por otro lado, por la alta carga orgánica que significa el tener valores de demanda química de oxígeno (DQO) que pueden llegar a 120 g/L y de demanda biológica de oxígeno (DBO), que puede oscilar entre 30 y 50 g/L (Maiorella y col., 1983)

Las vinazas se caracterizan además por presentar color marrón muy oscuro, que se debe a la presencia de melanoidinas y caramelos.

Las melanoidinas pueden constituir el 70-80 % del peso de las sustancias coloreadas de la miel (ICIDCA, 1986). Son polímeros de alto peso molecular formados al reaccionar, en condiciones alcalinas, azúcares y aminoácidos (reacción de Maillard); o de manera más general, por la reacción entre los grupos amino y carboxilo de las sustancias orgánicas (Reynolds, 1968). Las melanoidinas tienen propiedades antioxidantes y frecuentemente son tóxicas para los microorganismos utilizados en el biotratamiento de efluentes (Kitts y col., 1993).

En cuanto a los caramelos, estos se producen debido a la descomposición térmica y condensación de azúcares (Kort, 1979).

La presencia de estos polímeros recalcitrantes a la biodegradación y de compuestos fenólicos de bajo peso molecular, como los ácidos gálico y vainillínico que pueden inhibir el crecimiento de los microorganismos, interfiere en la aplicación de los métodos convencionales anaerobio-aerobios al tratamiento de las vinazas de destilería; lo que ha provocado la búsqueda de alternativas para la decoloración y la eliminación de la elevada carga orgánica de este tipo de efluentes (Fitzgibbon y col., 1995; Sirianuntapiboon y col., 1998). También la disposición de la vinaza sobre suelos ha tenido efectos adversos sobre la microflora edáfica, principalmente por incremento de la salinidad (Agrawal y Pandey, 1994). Este efluente coloreado requiere pretratamientos para su disposición final en el medioambiente.

El otro residual es el generado durante la producción de setas comestibles empleando pulpa de café como sustrato, el residual de la pasteurización de la pulpa de café (ELP), cuyo tratamiento para eliminar color y carga orgánica ha sido poco estudiado.

Desde el punto de vista económico, el café ha sido por muchos años uno de los cultivos más rentables tanto en América Latina como otras áreas del mundo. Como toda gran industria, la cafetalera genera subproductos sólidos (pulpa de café, mucílago, cascarilla) y subproductos líquidos (aguas residuales); caracterizados por su negativa repercusión ambiental. De estos subproductos, se han estudiado numerosas alternativas para el aprovechamiento de la pulpa de café (principal residuo generado) como: composteo, producción de biogás, vermicultivo, producción de proteína celular, enzimas y probióticos, entre otros (Zuluaga, 1988; Perraud-Gaime y col., 2000; Bermúdez y col., 2001).

Aunque pocos procesos han podido ser escalados eficientemente, es la producción de setas comestibles la que se ha logrado establecer como una tecnología probada y apropiada en las condiciones en que se desenvuelve esta industria (Martínez-Carrera, 1989 y 2000; García, 1999). El cultivo de setas comestibles sobre residuos agroindustriales es un proceso biotecnológico que se lleva a cabo en casi todo el mundo a pequeña, mediana y gran escala. La pulpa de café es un buen sustrato para el cultivo no sólo de *Pleurotus* (tecnología bien aceptada en América Latina) sino también de *Lentinula* y *Auricularia* (Martínez-Carrera, 2000; Sánchez y Royse, 2002). La misma presenta un problema ambiental, pues durante la preparación de la pulpa de café como sustrato para el crecimiento de la seta, se liberan de cuatro a cinco litros de agua residual por cada kilogramo de pulpa procesada (Martínez-Carrera y col., 2000). Por lo que una planta promedio de 60 ton de producción de setas comestibles frescas al año, producirá 750 m³ de esta agua residual en igual período.

A pesar de que los volúmenes generados de efluentes generados no son comparables a los de las industrias anteriormente referidas, las condiciones rurales sobre las que se desarrollan, el incremento continuado en la producción de setas en los últimos años y la similitud con otros residuos cafetaleros y no cafetaleros, son algunos de los factores que han hecho centrar la atención sobre ellos en la presente investigación.

La presencia de polifenoles como taninos condensados y ácido clorogénico son los que le confieren el color característico a este residual, similar al alpechín, además de cierta toxicidad para el crecimiento de algunos organismos de la microbiota natural, incrementada por la presencia de la cafeína, (Field y Lettinga, 1987; Scalbert, 1991). La presencia de estos compuestos polifenólicos ha hecho a este residual recalcitrante en su decoloración por digestión

anaerobia, que es el método usual estudiado para reducir su carga contaminante (Pérez y Bermúdez, 1998; Bello, 1999).

Los residuos industriales anteriormente referidos son en la actualidad objeto de investigaciones, pues aún cuando se han aplicado métodos biotecnológicos convencionales de reducción de sus impactos ambientales como lodos activados, digestión anaerobia, lagunas de oxidación; aún muestran recalcitrancia a su decoloración o han dado al traste con la implementación de los mismos, por la toxicidad que manifiestan algunos de sus componentes en los microorganismos involucrados en estos procesos (Field y Lettinga, 1987; Sodergren, 1989; Singh y Nigam, 1995; Vidal y col., 1996; Robinson y col., 2001).

Como se evidencia el color no es un problema solamente estético, la presencia de éste en los residuales a menudo está asociado con parámetros de contaminación no deseables para el tratamiento de los efluentes, como toxicidad o recalcitrancia. Su origen puede estar asociado a componentes estructurales diversos, como se ejemplificó en los residuales anteriormente descritos (Fig. 1). Por lo que la presencia del color en las aguas residuales exige su atención en las nuevas normativas y la búsqueda de métodos más efectivos para su eliminación o la reducción de su impacto ambiental.

I.2. Utilización de los microorganismos en la biodegradación de contaminantes: los hongos de pudrición blanca.

De interés potencial en el análisis de las estrategias a seguir para la reducción del efecto que causan estos efluentes industriales en el medio ambiente, en las últimas investigaciones ha sido sugerido un acercamiento biotecnológico para la disminución de estas fuentes de contaminación de una manera ecoeficiente; que presupone el uso de bacterias u hongos, a menudo en combinación con procesos físico-químicos (Willmott y col., 1998; Robinson y col., 2001; Howard y col., 2003).

El descubrimiento, clasificación y estudio de microorganismos endógenos o exógenos o de productos microbianos que puedan tener aplicaciones prácticas para la protección del medio ambiente, la protección de la salud humana y aplicaciones comerciales, han hecho consolidar a la **Microbiología Ambiental** como una herramienta fundamental para el desarrollo de la Biotecnología Ambiental; muy útil en procesos de biorremediación de ecosistemas afectados o de tratamientos de residuos para reducir el impacto de su vertimiento en el medioambiente.

Los métodos físico-químicos de descontaminación tienen el inconveniente de remover principalmente los sólidos suspendidos, reduciendo por este concepto el color aparente, y de

generar nuevas corrientes de residuos (lodos, sólidos a regenerar). Otras técnicas emergentes como la ozonación, la destrucción electroquímica, y la fotocátalisis, pueden tener muchas potencialidades para la decoloración; sin embargo, tales tecnologías usualmente implican procedimientos complicados o no son económicamente factibles (Southern, 1995; Sirianuntapiboon y col., 1998).

Los microorganismos ofrecen alternativas basadas en sus disímiles rutas metabólicas que pueden ser utilizadas o manejadas con un fin determinado, potenciadas en sus interacciones con los contaminantes en el medio. Pero se debe tener muy en cuenta que la actividad microbiana para la biodegradación de un compuesto, está limitada por factores biológicos y las propiedades físico-químicas de los mismos (Maier y col., 2002). Estos factores incluyen el potencial genético, la biodisponibilidad, la estructura del contaminante, la toxicidad o el efecto inhibitorio del contaminante sobre el metabolismo celular, entre otros.

Es por eso que la utilización de organismos como las bacterias, que constituyen la base de muchos procesos biotecnológicos para el tratamiento de residuos, a veces ven limitadas sus capacidades para la biotransformación de compuestos de elevado peso molecular, de estructura compleja o xenobióticos porque: (i) la mayoría actúan en fase líquida por lo que se ven imposibilitados a accionar sobre compuestos hidrófobos o en sustratos con baja actividad de agua, (ii) existen dificultades para su incorporación al interior celular y no se disponen de enzimas extracelulares apropiadas que lo degraden a intermediarios más pequeños y (iii) la dificultad en degradar enlaces diversos y complejos.

Las dificultades se tornan complejas cuando se trata de un residual industrial si se incluye en las consideraciones que su composición de contaminantes puede ser variable en una misma industria. Así, la decoloración y descontaminación de un efluente real requiere de una apropiada selección del organismo degradador a emplear. Muchas veces se prefiere la combinación de grupos microbianos (cultivos mixtos), pero se impone la búsqueda de microorganismos versátiles en este aspecto.

En la década del 80 del pasado siglo, se propuso el empleo de hongos de pudrición blanca 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 (Sodergren, 1989). 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 (Feijoo y Lema, 1999; Pointing, 2001; Wesenberg y col., 2003).

Estos hongos constituyen un diverso grupo ecofisiológico comprendido mayoritariamente por basidiomicetos, capaces de producir una extensa depolimerización y mineralización aerobia de la lignina. La denominación de estos organismos como de **pudrición blanca** se debe a que al degradar la lignina de las plantas, provoca la formación de un residuo de color blanco, por la acumulación de celulosa y hemicelulosa (González y col., 1986).

Estos organismos se caracterizan por poseer un sistema enzimático ligninolítico extracelular de baja especificidad, 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. Además, como característica adicional, los compuestos intermediarios generados por la degradación son por lo general biodegradables, pudiendo ser mineralizados en algunos casos hasta dióxido de carbono y agua (Higson, 1991; Eggen, 2000).

La característica exclusiva de este grupo de hongos, de ser capaces en determinadas condiciones de mineralizar la lignina (Leonowicz y col., 1999), despertó el interés por conocer los mecanismos biológicos que intervenían en este proceso con vistas a sus posibles aplicaciones prácticas.

Muchos basidiomicetos han sido utilizados en procesos de decoloración mediados por microorganismos tanto de colorantes sintéticos, como de efluentes industriales coloreados; obteniéndose diferentes eficiencias en la descontaminación o biodegradación (Tabla 1). *Phanerochaete chrysosporium* es el organismo más extensamente estudiado, siendo empleado en la biorremediación de efluentes de diferentes industrias (Pérez y col. 1997; Fahy y col., 1997; Garg y Modi, 1999; Kissi y col., 2000). Aunque otros han acaparado también la atención como *Trametes* sp. (Knapp y Newby, 1999; González, 2001), *Bjerkandera* sp. (Moreira y col., 1997), *Coriolopsis* sp. (Yagüe y col., 2000) y *Pleurotus* sp. (Kissi y col., 2001; Novotny y col. 2001; Fountoulajkis y col., 2002); por ser hongos que presentan menor sensibilidad a las concentraciones de nitrógeno para la producción de sus enzimas extracelulares.

El residual de la pasteurización de la pulpa de café ha sido biodegradado principalmente utilizando las bacterias metanogénicas a través de la digestión anaerobia (Bello y Sánchez, 1997; Pérez y Bermúdez, 1998; Bello, 1999), pero poco se ha estudiado la capacidad de los organismos ligninolíticos en la decoloración y biodegradación de los componentes del mismo (Rodríguez y col. 2003).

La vinaza de destilería siempre ha llamado la atención por el costo ambiental que conlleva su liberación al medio ambiente. Se conoce de la incapacidad de ser decolorada extensivamente por los organismos empleados en los métodos biológicos tradicionales de tratamientos, además de ser

aceptada por la comunidad científica la necesidad de emplear cultivos mixtos para reducir su contaminación. Por lo que no es de extrañar que este residual constituya un candidato a ser estudiado para su biorremediación por los hongos de pudrición blanca. En la Tabla 2 se muestran los trabajos realizados con hongos basidiomicetos, con este residual o similares.

I.2.1- *Pleurotus* sp. como biodegradador.

Entre los basidiomicetos reconocidos como comestibles, se encuentran los del género *Pleurotus*. Este es un hongo saprofítico, que en su ambiente natural crece sobre árboles y plantas leñosas en descomposición y pobres en nutrientes. La producción de hongos de este género para consumo humano ha experimentado un crecimiento extraordinario a nivel mundial fundamentalmente en países como Japón, Corea, Taiwán, Filipinas, Estados Unidos y Alemania; lo cual se debe a las ventajas de su cultivo en comparación con el cultivo del champiñón, como presentar una tecnología sencilla, la utilización de una mayor gama de sustratos y además, poder ser cultivado en climas de temperaturas tropicales (Martínez-Carrera, 2000; Sánchez y Royse, 2002).

En Cuba, es el hongo que se ha cultivado con fines de comercialización para consumo humano; cultivos desarrollados sobre sustratos que son residuos agroindustriales de gran impacto, como el follaje, el cogollo y el bagazo de caña de azúcar, la pulpa de café, la cáscara de coco y cáscara de cacao (Ortega, 1999; García, 1999; Bermúdez y col., 2001).

Se sabe que *Pleurotus* es capaz de degradar preferentemente la lignina, a diferencia de otros hongos de pudrición blanca como *Phanerochaete chrysosporium*, por eso se ha seleccionado como un organismo muy útil en procesos biotecnológicos de deslignificación relacionados con la industria papelera y de transformación de residuos lignínicos para la alimentación animal (Hatakka, 1994; Akhtar y col., 1997; Cohen y col., 2002). A esto se une el hecho que es, junto a *Phanerochaete* sp. y *Trametes* sp., uno de los hongos de pudrición blanca de los que más extensamente se ha estudiado su sistema enzimático ligninolítico (Thurston, 1994; Martínez y col., 1996; Marques de Souza y col., 2003).

Por presentar un sistema enzimático ligninolítico versátil, *Pleurotus* es empleado en la biodegradación de compuestos con la finalidad de transformarlos a formas compatibles con los ecosistemas y que puedan ser asimilados en los ciclos naturales. Es descrita en la literatura la utilización de este hongo o sus enzimas para la degradación de compuestos tóxicos y/o recalcitrantes, tales como: pesticidas organoclorados como el DDT o la atrazina (Pointing, 2001), hidrocarburos policíclicos aromáticos o creosota (Bezalel y col., 1996; Eggen, 2000), colorantes

sintéticos (Novotny y col., 2001; Eichlerová y col., 2002), bifenilos policlorinados y polímeros sintéticos (Aust y Benson, 1993).

En el biotratamiento de residuales se ha empleado fundamentalmente en estudios para degradar colorantes de industrias textiles o para la desfenolización y reducción de la contaminación del residual de la industria de aceite de oliva (Fountoulajkis y col., 2002; Cohen y col., 2002; Wesenberg y col., 2003; Ikehata y col. 2004).

El crecimiento sobre pulpa de café demuestra que *Pleurotus* es un reductor del contenido de cafeína en ese sustrato (Martínez-Carrera, 1989; García, 1999), lo que mejora sus características para ser aprovechado como alimento animal.

I.3. Enzimas ligninolíticas de los hongos de pudrición blanca.

Los hongos de pudrición blanca son reguladores claves en el ciclo del carbono. Sus enzimas ligninolíticas están directamente involucradas no sólo en la degradación de la lignina y sus sustratos lignocelulósicos naturales, sino también en la degradación de varios compuestos xenobióticos y en la decoloración de efluentes (Conesa y col., 2002; Mayer y Staples, 2002; Rodríguez y col., 2004)

Las principales enzimas ligninolíticas son oxidorreductasas: dos peroxidasas (lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa) y una fenoloxidasa (lacasa) (Fig. 2 y 3).

La más común de las peroxidasas, producida por muchos de los basidiomicetos de pudrición blanca y por varios hongos pobres descomponedores de la madera, es la manganeso peroxidasa (MnP). La MnP (manganeso:H₂O₂ oxidorreductasa, EC 1.11.1.13) es una proteína glicosidada con un grupo prostético hemo, conteniendo un hierro protoporfirínico IX. Su peso molecular descrito es de 32 - 62,5 kDa y son secretadas en múltiples isoformas (Martínez, 2002). Esta enzima oxida preferentemente Mn²⁺ a Mn³⁺, el cual es estabilizado por ácidos quelantes (ej. ácido oxálico) que es producido también por el hongo. El ión Mn³⁺ quelado actúa como un mediador redox difusible, altamente reactivo y de bajo peso molecular (Hofrichter, 2002). Así, la MnP puede oxidar y depolimerizar sustratos como la lignina.

Además, se ha demostrado que la MnP puede promover la peroxidación de ácidos grasos insaturados y que este sistema de peroxidación de lípidos, puede provocar la ruptura oxidativa de diferentes compuestos de naturaleza no fenólica. Su mecanismo catalítico es similar al resto de las peroxidasas y se ejemplifica en la Fig. 2.

La lignina peroxidasa (LiP, EC 1.1.1.14) cataliza la oxidación de enlaces no aromáticos de la lignina y compuestos similares, entre ellos rupturas C-C en la cadena lateral de las subunidades

de lignina, la oxidación del alcohol veratrílico y sustancias relacionadas a aldehídos y cetonas, rupturas de fenilglicoles e hidroxilación de grupos metil-bencílico (Kirk, 1987). Su mecanismo es la oxidación en las cadenas laterales de la lignina y compuestos relacionados estructuralmente, por la extracción de un electrón para formar radicales reactivos. También ha sido referida la depolimerización de la lignina, la cual contiene anillos aromáticos, en presencia de alcohol veratrílico rindiendo benzaldehído. (Kersten y col., 1990). Es una proteína extracelular N-glicosidada con masa molecular entre 38 y 47 kDa conteniendo un grupo hemo en su sitio activo y muestra un clásico mecanismo de peroxidasa en su reacción (Conesa y col., 2002) (Fig.2).

El papel de la LiP en la ligninólisis puede ser la transformación de fragmentos de lignina los cuales fueron inicialmente liberados por la MnP. Algunos autores consideran que la LiP no es esencial para el ataque de la lignina, pues algunos hongos de pudrición blanca muy activos no excretan esta enzima, como es el caso de los del género *Pleurotus* (Hatakka, 1994). Aunque no se descarta la posibilidad de que estos organismos la produzcan sólo en condiciones específicas de cultivos, las que no han sido aún estudiadas.

Un tercer grupo de peroxidasas, la peroxidasa versátil o peroxidasa independiente de manganeso (VP o MIP), fue descrito a inicios de esta última década. Esta se describe como un híbrido entre la MnP y la LiP; donde ellas pueden oxidar no sólo Mn^{2+} , sino también compuestos fenólicos y no fenólicos aromáticos, incluyendo el alcohol veratrílico y algunos colorantes, sin mediar el Mn^{2+} . La MIP ha sido descrita y purificadas en especies del género *Pleurotus* (Martínez y col., 1996; Cohen y col., 2001) y *Bjerkandera* (Mester y Field, 1998; Heinfling y col., 1998).

Vyas y Molitoris reportaron en 1995 que el hongo de pudrición blanca *Pleurotus ostreatus* producía, en fermentación en estado sólido, una actividad enzimática dependiente de peróxido afin a decolorar el RBBR (colorante sintético); de conjunto con las ya conocidas MnP, MIP y lacasa. Ellos sugirieron que esta actividad enzimática era el resultado de la presencia de una actividad ligninolítica no descrita y que podía tener un importante papel en la degradación de la lignina y de compuestos xenobióticos. Kim y col. (1996) detectaron esta actividad enzimática en los filtrados de cultivos de *P. ostreatus* en medios químicamente definidos y al siguiente año, fue purificada y caracterizada por Shin y col. (1997).

De la “dye peroxidase” (DyP) como también se le nombra, se conoce que se produce en condiciones de limitación de carbono, que es reprimida por el alcohol veratrílico a diferencia de la LiP y que la enzima tiene alta afinidad por varios compuestos fenólicos y colorantes artificiales, no actuando sobre compuestos no fenólicos (Kasinath y col., 2003). Ha sido detectada también en *Irpex lacteus* y *Lentinus edode*, ambos produciendo decoloración del RBBR en medio

sólido y líquido (Boer y col., 2004). La peroxidasa decoloradora de colorantes (DyP) al igual que el resto de las peroxidases, cataliza la oxidación dependiente de H_2O_2 de compuestos modelos de la lignina por extracción de un electrón para generar intermediarios reactivos que se fragmentan espontáneamente (Conesa y col., 2002) (Fig. 2).

La lacasa (Lac, p-difenol: O_2 oxidoreductasa, EC 1.10.3.2) es una oxidasa azul extracelular, N-glicosidada y con masa molecular de 60–390 kDa. Esta enzima contiene cuatro átomos de cobre en su sitio activo (como Cu^{2+} en la enzima en “reposo”) que están distribuidos en sitios de enlaces diferentes y son clasificados por esto en tres tipos, con propiedades espectroscópicas y ferromagnéticas diferentes (Thurston, 1994; McGuire y Dooley, 1999). Son producidas múltiples isoformas de la lacasa, en dependencia de las condiciones del cultivo y la presencia de inductores, las cuales difieren en sus características bioquímicas. Por ejemplo, la isoforma POXC es la más abundante producida por el hongo *Pleurotus ostreatus* bajo todas las condiciones de cultivo que han sido examinadas (Palmieri y col., 2000).

La Lac es una enzima de baja especificidad de sustrato que cataliza la oxidación de una variedad de donantes aromáticos de hidrógeno como monofenoles, difenoles, polifenoles, aminofenoles y diaminas; con la concomitante reducción del oxígeno a agua (Fig. 3). Por otro lado, la Lac no sólo oxida ácidos fenólicos o metoxi-fenólicos, sino que también los descarboxila y ataca sus grupos metoxi (demetilación) (Mayer y Staples, 2002). Se creía que los sustratos de la lacasa estaban restringidos a compuestos de tipo fenólico, pero recientemente se ha probado que ésta es capaz de oxidar compuestos no fenólicos, tales como el antraceno o benzopireno, en presencia de mediadores redox como el ABTS (el 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)) y el HBT (hidroxi-benzotriazol) (Johannes y Majchercyk, 2000; Fabbrini y col., 2002).

La lacasa reacciona con polifenoles y otros compuestos aromáticos derivados de lignina, los cuales pueden ser polimerizados y despolimerizados, por la propia enzima. Está implicada en varios procesos fisiológicos, donde exhibe ambos tipos de reacciones: el desarrollo de cuerpos fructíferos, la pigmentación de las esporas fúngicas, patogenicidad de algunos hongos, la diferenciación sexual y la formación de estructuras rizomorfas (Leonowicz y col., 2001; Mayer y Staples, 2002)

Según Hatakka (1994) y luego retomado por los autores Kerem y Hadar (1998), los hongos de pudrición blanca se pueden clasificar en tres grandes grupos, según la producción de enzimas extracelulares de su sistema ligninolítico.

- **Grupo productor de LiP–MnP:** En este grupo se ubica el hongo de pudrición blanca más estudiado, *Phanerochaete chrysosporium*, el que resulta un eficiente degradador de la lignina.

Se encuentran otros hongos como son *Trametes versicolor*, *Phlebia radiata* y *Bjerkandera adusta*, entre otros.

- **Grupo productor de LiP–Lac:** Sólo dos hongos han sido descritos en este grupo: *Phlebia ochraceofulva* y *Junghuhia separabilinia*, los cuales degradan pobremente la lignina a CO₂ por la ausencia de la enzima MnP, aún a altas concentraciones de Mn²⁺.
- **Grupo productor de Lac–MnP:** Muchos de los hongos de pudrición blanca no producen aparentemente LiP, siendo esta la combinación enzimática más encontrada usualmente. Como ejemplos de este grupo tenemos el *Panus tigrinus*, *Lentinus tigrinus* y *Rigidosporus lignosus*, entre otros. Dentro de ellos se encuentran hongos comestibles como *Pleurotus ostreatus* y *Lentinus edodes*, que poseen además un sistema enzimático ligninolítico que involucra a enzimas proveedoras de peróxido como la aril-alcohol oxidasa (AAO), llegando a conformar un grupo especial Lac-AAO.

La aril-alcohol oxidasa (AAO, EC 1.1.3.7) es una enzima extracelular FAD-dependiente, la cual ha sido detectada en *P. chrysosporium* y especies de los géneros *Pleurotus* y *Bjerkandera* (Gutiérrez y col., 1994; Hatakka, 1994; Asada y col., 1995). Esta enzima oxida α -alcoholes aromáticos primarios como el veratrílico, a sus correspondientes aldehídos; reduciendo paralelamente el O₂ a H₂O₂. La AAO también reduce radicales fenoxilos producidos por la lacasa, evitando que se polimericen (Marzullo y col., 1995). Es una proteína monomérica, con un peso molecular entre 71-78 kDa y un pI entre 3,8 y 4,3; pudiendo encontrarse una o más isoenzimas, dependiendo del hongo y de las condiciones de cultivo (Martínez y col., 1994).

Casi todas estas enzimas descritas anteriormente, son excretadas en más de una isoforma por diferentes taxa y condiciones de cultivo. Por lo que se requiere la selección de organismos adecuados para los propósitos que se desean y el estudio, tanto del patrón enzimático excretado por el microorganismo seleccionado como de las condiciones para su cultivo, para lograr aprovechar la maquinaria metabólica para una biodegradación eficiente de los componentes indeseables de un efluente industrial; logrando hacer ecoeficiente el proceso de descontaminación.

Por otro lado, algunas de ellas como las peroxidasas se producen en pequeñas cantidades durante el crecimiento del hongo, por lo que se ve limitada su utilización en procesos biotecnológicos. Es por eso que se ensayan y buscan compuestos que pueden incrementar las cantidades extracelulares de las enzimas ligninolíticas, reconociéndose algunos inductores específicos como el cobre, ácido ferúlico y vainillínico, para la lacasa (Palmieri y col., 2000; Marques de Souza y

col., 2004); el Mn^{2+} , para la MnP (Scheel y col., 2000; Cohen y col, 2001) y el alcohol veratrílico, para la LiP (Conesa y col., 2002).

1.3.1- Mediadores de pequeño tamaño molecular y cooperación de enzimas ligninolíticas.

Debido a la estructura aleatoria del polímero de lignina y al tamaño de las enzimas ligninolíticas de los hongos de pudrición blanca, las interacciones directas y específicas entre la lignina (o análogos estructurales recalcitrantes) y estas enzimas, son altamente improbables. Por lo que la existencia de mediadores redox de pequeño tamaño molecular y difusibles, serían factibles para migrar al interior de la compleja matriz de la lignocelulosa; proveyendo a estos hongos de moléculas con altos potenciales redox (> 900 mV) para atacar la lignina.

Estos mediadores pueden estar involucrados, con la participación de las enzimas ligninolíticas, en la generación de especies radicales reactivas de enlaces carbonos para la ruptura de estructuras aromáticas de una gran variedad de sustratos relacionados con la lignina. Además, participan en los mecanismos de formación de especies reactivas del oxígeno, las cuales directa o indirectamente pueden atacar la lignina o moléculas estructuralmente relacionadas (Hammel, 1996; Wesenberg, 2003).

Algunos ácidos orgánicos (α -cetoácidos), excretados por numerosos organismos fúngicos, constituyen agentes quelantes que forman compuestos de coordinación estabilizando el Mn^{3+} . La MnP es capaz de descomponer ácidos orgánicos (como el malonato) por vía oxidativa, a la vez que cataliza la conversión de M^{2+} a Mn^{3+} . Así se ha postulado que los ácidos orgánicos constituyen el origen, en estos mecanismos ligninolíticos, de los siguientes radicales: radicales ácido acético ($COOH-C\dot{H}_2$), radicales peróxido ($COOH-CH_2OO\dot{O}$), superóxidos ($O_2\dot{O}^-$), radicales formiato ($CO_2\dot{O}^-$). Tales radicales pueden ser una fuente de peróxidos, que pueden ser usados como sustrato por la MnP, en vez del H_2O_2 . Como consecuencia, aún cuando el hongo carezca de oxidasas generadoras de H_2O_2 pueden ser eficientes degradadores de la lignina y por extensión, útiles en la degradación de compuestos relacionados, colorantes o xenobióticos (Hofrichter, 2002).

El alcohol veratrílico (VA, 3,4-dimetoxibenzil alcohol) es un metabolito secundario de numerosos hongos de pudrición blanca. Después de su oxidación al radical catiónico (VA^+) por la LiP, actúa como mediador redox para la degradación de la lignina. Sin embargo, debido a su corta vida, la transferencia de VA^+ a largas distancias de donde es producido no es factible. La

LiP es estimulada por VA, probablemente porque éste protege a la enzima del efecto dañino del H_2O_2 (Aktar y col., 1997).

El ácido 3-hidroxiantranílico (HAA) fue el primer mediador natural descrito para la lacasa; el cual participa en la oxidación, por esta enzima, de dímeros de lignina no fenólicos (Eggert y col., 1996). El descubrimiento del hidroxibenzotriazol (HBT), un efectivo mediador de la lacasa en procesos de biopulpeo, llevó al reconocimiento de un nuevo grupo de mediadores con NOH como grupo funcional el que es oxidado a su radical reactivo ($\text{R}=\text{NO}$). Estos mediadores han mostrado su capacidad de intervenir en reacciones de delignificación por la lacasa (Call y Mucke, 1997).

Las enzimas ligninolíticas son esenciales para la degradación de la lignina; sin embargo, para su mineralización a menudo se combinan con otros procesos enzimáticos, empleando mecanismos catalíticos diversos (Leonowicz y col., 1997). Tales enzimas auxiliares son la glioxal oxidasa (EC 1.2.3.5), aril-alcohol oxidasa (EC 1.1.3.7) y superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1) para la producción intracelular y extracelular de H_2O_2 , un cosustrato de la LiP y la MnP; así como, la glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4) y la celobiosa deshidrogenasa (EC 1.1.99.18) implicadas en los circuitos de retroalimentación y unión de la ligninólisis con la degradación de la celulosa y la hemicelulosa (Leonowicz y col., 1999).

La glioxal oxidasa oxida el ácido glioxílico a ácido oxálico, generando durante esta reacción peróxido de hidrógeno (H_2O_2). De esta forma, esta enzima soporta la actividad de las peroxidasas y provee de agentes quelantes (ácido oxálico) para el ión Mn^{3+} (Kersten y col., 1990).

La superóxido dismutasa es una de las enzimas universales presentes en los microorganismos aerobios y cataliza la dismutación del radical aniónico superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), protegiendo al microorganismo de su efecto tóxico, a oxígeno molecular (O_2) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El radical superóxido, altamente reactivo y tóxico, comúnmente aparece durante el ciclo redox de las quinonas en los organismos productores de lacasa ej. *Pleurotus* sp.. Por lo que, además de proteger las células, esta enzima también puede favorecer la acción de las peroxidasas por la producción de su principal cofactor: el H_2O_2 (Leonowicz y col., 2001).

La glucosa oxidasa es una enzima FAD-dependiente que puede encontrarse dentro y fuera de las células fúngicas. Durante la catálisis de esta enzima la glucosa, por ejemplo derivada de la degradación de la celulosa, es oxidada a su correspondiente gluconolactona con la simultánea reducción del FAD a FADH_2 . Durante la reoxidación a FAD por el oxígeno (O_2), se forma peróxido de hidrógeno. De acuerdo con este mecanismo, la glucosa oxidasa coopera con la LiP y

la MnP y opera como un sistema de retroalimentación, donde las peroxidasas actúan como los primeros agentes descomponedores de la lignina (Leonowicz y col., 1997 y 1999a)

La celobiosa deshidrogenasa o anteriormente llamada celobiosa oxidasa, es otra flavoproteína que oxida la celobiosa u oligosacáridos relacionados, reduciendo un amplio rango de compuestos del tipo quinonas. De igual forma, durante la regeneración del FAD se produce H_2O_2 . Recientemente se ha demostrado que esta enzima reduce quinonas y radicales catiónicos fenoxi y arilos, producidos a partir de la acción de lacasa y peroxidasas sobre sustratos aromáticos (Ander y Marzullo, 1997).

Aunque estas enzimas auxiliares tienen funciones catalíticas independientes, la cooperación entre ellas se favorece por la cercanía y el microambiente que se establece alrededor de las hifas del hongo que colonizan la madera; propiciando el acercamiento y cooperación de las mismas, así como de mediadores y otras biomoléculas componentes de membranas.

II.

MATERIALES Y MÉTODOS

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. Caracterización de los residuales.

II.1.1- Residuales industriales utilizados.

La vinaza es el residuo final de la destilación de etanol producido por la fermentación de melazas de caña de azúcar y fue proporcionado por la destilería “Hatuey” de Santiago de Cuba. El residual de la pasteurización de la pulpa de café fue obtenido de la preparación de este sustrato para el cultivo de setas comestibles (*Pleurotus sp.*) en la planta de producción del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Santiago de Cuba. Para su conservación se prepararon alícuotas, que se almacenaron a 4 °C en recipientes plásticos hasta el momento de ser utilizadas. La caracterización consistió en la determinación de los parámetros físico-químicos que a continuación se detallan.

II.1.2- Determinación del pH.

Los valores de pH se determinaron utilizando un pH-metro digital Metrohm 704, según lo establecido en el Standard Method (APHA, 1998).

II.1.3- Determinación de color (luminancia).

La valoración espectrofotométrica del color de los efluentes se llevó a cabo mediante la determinación de la luminancia (%) según refiere el Standard Methods (APHA, 1998). Este método consiste en la medición del porcentaje de transmitancia de la muestra para un conjunto de longitudes de onda específicas de 400-700 nm, utilizando agua destilada como blanco. La suma de los porcentajes de transmitancia multiplicada por un factor (0,1) nos da la luminancia (%), que es una medida de cuán clara es percibida la muestra por el ojo humano.

Las muestras se centrifugaron previamente a 5000 min⁻¹ por una hora, para la eliminación de los sólidos en suspensión y luego se diluyeron 1/10 de modo que su transmitancia para las 10 longitudes de onda para las cuales se mide, no sea menor al 10 %. Las λ fueron (nm): 489,5; 515,2; 529,8; 541,4; 551,8; 561,9; 572,5; 584,8; 600,8; 627,3.

La remoción de color (Rcolor) se calculó mediante la expresión:

$$A = 2 - \log L \quad (\text{ec. 1})$$

$$\% R \text{ color} = (A_i - A_f) / A_i \quad (\text{ec. 2})$$

donde:

L: valor de luminancia (%)

$A_{i,f}$: Absorbancia obtenida a partir de los valores de luminancia inicial o final según (ec. 1)

R: Remoción de color (%)

Para determinar si es absorbido el color por el micelio del hongo se procedió a coleccionar los pellets crecidos en cada residual en 50 mL de metanol y se llevó a cabo una extracción a 220 min^{-1} a 37°C por una hora. Seguidamente se determinó la luminancia de esta solución.

II.1.4- Demanda química de oxígeno (DQO).

La determinación de la demanda química de oxígeno (DQO) se realizó según el procedimiento descrito en el Standard Methods (APHA, 1998). Las soluciones se preparan de la siguiente manera:

Solución de digestión (1 litro):

$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 10,216 g (desechado 12 h a 105°C)
 HgSO_4 17,000 g
 H_2SO_4 250 mL
 H_2O 750 mL

Solución de catálisis (1 litro):

Ag_2SO_4 10,7 g
 H_2SO_4 1000 mL

Se disuelven el $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y el HgSO_4 en agua destilada, y al final se añade el H_2SO_4 en un baño de hielo.

Se disuelve el Ag_2SO_4 en 1 litro de H_2SO_4 concentrado.

Se mezclaron en tubos HACH con tapa de rosca, 2mL de solución patrón o muestra, 1mL de solución digestora y lentamente, dos mililitros de solución de catálisis. Se taparon, se agitaron bien las mezclas preparadas y se colocaron durante dos horas, en un termorreactor a 150°C . Transcurrido ese tiempo, se dejaron enfriar las muestras hasta que alcanzaron la temperatura ambiente (30°C), se mezclaron nuevamente y se midió la absorbancia a 620 nm.

Se utilizó como patrón una solución de ftalato ácido de potasio (KH-ftalato) en un rango de concentraciones desde 0 a 0,8 g/L.

II.1.5- Demanda bioquímica de oxígeno (APHA, 1998).

Se siguieron las recomendaciones del Standard Methods. La medida de este parámetro se realiza incubando un volumen determinado del agua residual, en presencia de microorganismos, a 20°C y con oxígeno en exceso, de modo que durante la duración del ensayo no se produzca limitación del mismo. Se determinó la DBO para cinco días (DBO_5)

II.1.6- Sólidos totales y en suspensión (APHA, 1998).

Para su determinación se tomaron muestras completas y muestras de efluente centrifugadas a 12 000 min⁻¹ durante 15 minutos. Ambas fracciones se secaron en estufa a 105 °C, hasta peso constante.

II.1.7- Determinación de fenoles.

Se determinó por el método de Folin-Denis (APHA, 1998). Se utilizó como patrón una solución de ácido caféico.

II.1.8- Determinación de fósforo.

Se empleó el método del molibdato-vanadato, previa mineralización de las muestras según el Standard Methods (APHA, 1998).

II.1.9- Determinación de nitrógeno.

Se determinó nitrógeno orgánico total digiriendo las muestras según el método de Kjeldhal modificado (A.O.A.C, 1980), determinándose posteriormente el contenido de amonio mediante el método colorimétrico del indofenol, descrito en el Standard Methods (APHA, 1998).

II.1.10- Carbohidratos totales solubles.

El método seguido fue el del fenol sulfúrico (Dubois y col. 1956) utilizando la glucosa como patrón.

II.1.11- Determinación de metales e iones.

Se determinaron en los residuales el SO₄²⁻, Cu, Mg, Ca mediante un Espectrómetro de Emisión Atómica con Fuente de Plasma Inductivamente Acoplado (ICP – AES). Se pesó 0,2 g de muestra liofilizada, para fundir con una mezcla de carbonato de sodio en el equipo de fusión Fluxi 30 entre 900 °C y 1000 °C. El botón fundido se disolvió con ácido clorhídrico y unas gotas de agua oxigenada al 30 %, calentando en plancha y con agitación magnética. Se enrasó y homogenizó en un volumétrico de 100 mL. Los metales se expresaron como sus óxidos.

II.1.12- Determinación de ácidos grasos volátiles (AGV).

Se realizó por destilación de las muestras y luego valoración con NaOH (0,1 mol/L), según se reporta en el Standard Methods (APHA, 1998).

II.2. Microorganismos y su conservación.

Se evaluaron ocho cepas de basidiomicetos del género *Pleurotus* pertenecientes a la Colección de Cultivos del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, capaces de crecer sobre sustratos lignocelulósicos y residuos agrícolas (Ortega, 1999; García, 1999; Bermúdez y col., 2001; Ortega y Otero, 2001). A continuación se refieren:

CCEBI 3021-	<i>Pleurotus ostreatus</i>
CCEBI 3022-	<i>Pleurotus sp.</i>
CCEBI 3023-	<i>Pleurotus ostreatus</i>
CCEBI 3024-	<i>Pleurotus sp. (Híbrido P. ostreatus x P. ostreatus)</i>
CCEBI 3025-	<i>Pleurotus ostreatus</i>
CCEBI 3026-	<i>Pleurotus ostreatus</i>
CCEBI 3027-	<i>Pleurotus sajor-caju</i>
CCEBI 3028-	<i>Pleurotus florida (Fr.)</i>

- ***Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kummer (var. Florida):** Fue donada por el Laboratorio de Biología Molecular y Ambiental de la Universidad “Federico II” (Nápoles, Italia).
- ***Phanerochaete chrysosporium* Burdsall M1 (DSM 13583):** Perteneciente a la Colección de Cultivos Alemana DSMZ (Braunschweig, Alemania).
- ***Bacillus cereus* 6E/2** (Colección de Cultivos de Holanda), como organismo modelo para el seguimiento de la toxicidad de la vinaza.

Como método de conservación se utilizó la resiembra periódica en tubos y los subcultivos fueron conservados a 4 °C en medios agar extracto de malta (para los basidiomicetos) y agar nutriente (para la bacteria) (Oxoid, Inglaterra).

II.3. Medios de cultivo.

Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 120 °C (0,5 atm) durante 15 minutos.

- **Agar papa dextrosa (APD)** (Oxoid; Oxoid Ltd, Basingstoke, Inglaterra).
- **Medio sintético para hongos (MSH)** consistente en : 20 g/L de glucosa, 5 g/L de peptona, 2 g/L de extracto de levadura, 2 g/L de hidrógeno fosfato de potasio (KH₂PO₄) y 0,5 g/L de sulfato de magnesio (MgSO₄), a pH 6,5 (Martínez y col., 1996).

- **Medio basal para hongos (MBH):** se empleó una modificación del medio basal para hongos (BSM) reportado por Schützendübel y col. (1999), constituido por glucosa 20 g/L, extracto de levadura 0,5 g/L, L– asparagina 0,65 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, KCl 0,5 g/L, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/L, a pH 6,5. Se le añade 1mL de solución de microelementos (1000x) que contiene en (mg/L): ácido bórico 500 mg/L, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 40 mg/L, KI 100 mg/L, $\text{FeCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ 50, $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$ 30 mg/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 200 mg/L, Zn SO_4 400 mg/L, disuelto a pH 2.
- **Medio papa dextrosa-extracto de levadura (PDY):** contiene 24 g/L de caldo papa dextrosa y 5 g/L de extracto de levadura (Difco, Detroit MI, USA).
- **Medio triptona-extracto de levadura (TY):** su composición es de 16 g/L de triptona, 10 g/L de extracto de levadura y 5 g/L de cloruro de sodio (Difco, Detroit MI, USA).

Los medios sólidos se prepararon añadiendo 2 % (p:v) de agar bacteriológico (BIOCEN, Cuba) a los correspondientes medios líquidos.

II.4. Selección del microorganismo.

II.4.1- Criterios de selección.

Para seleccionar el microorganismo del género *Pleurotus* con el que se estudiará la decoloración de ambos residuales bajo estudio, se tomaron como criterios en orden de prioridad:

- 1) Crecimiento a temperatura ambiente en medio control (30 °C – 35 °C).
- 2) Crecimiento en presencia de los residuales.
- 3) Potencialidades para excreción de enzimas ligninolíticas.
- 4) Decoloración de medios con colorantes sintéticos.

Para la comparación y selección se determinó la velocidad de crecimiento específico (μ) a partir de la medición diaria del crecimiento radial del micelio, de cada cepa en el medio empleado. Además se siguió la aparición de un halo de decoloración en el caso del *criterio 4* o la aparición de un halo color rojo, para el *criterio 3*. El *criterio 1* se consideró como excluyente.

II.4.2- Medios y condiciones de cultivo.

Como medio control se empleó el APD. Para evaluar los criterios del (2) al (4) se utilizó el MSH agarizado.

A este MSH se le añadieron los residuales V o ELP en concentraciones del 25, 50, 100 % (v:v) (*criterio 2*) o 10 mmol/L de guayacol (*criterio 3*), según sea el caso. Para la adición de los colorantes (*criterio 4*) se añadieron al medio control APD, a través de un filtro bacteriológico (Nalgene), soluciones de concentraciones de 0,1 % (p:v) de rojo fenol, azul de metileno, azul de

anilina y azul remazol brillante R (RBBR) (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Alemania) cuyas estructuras se muestran en la Fig. 4. Se tamponó el medio con buffer McIlvaine a pH 6,5.

Para la inoculación del microorganismo se emplearon fragmentos de agar con micelio (0,8 cm de diámetro), tomados de cultivos crecidos en medio control (APD), los que fueron colocados al centro de la placa Petri. En todos los casos se incubaron en la oscuridad a temperatura controlada (30 °C y 35 °C), durante siete días.

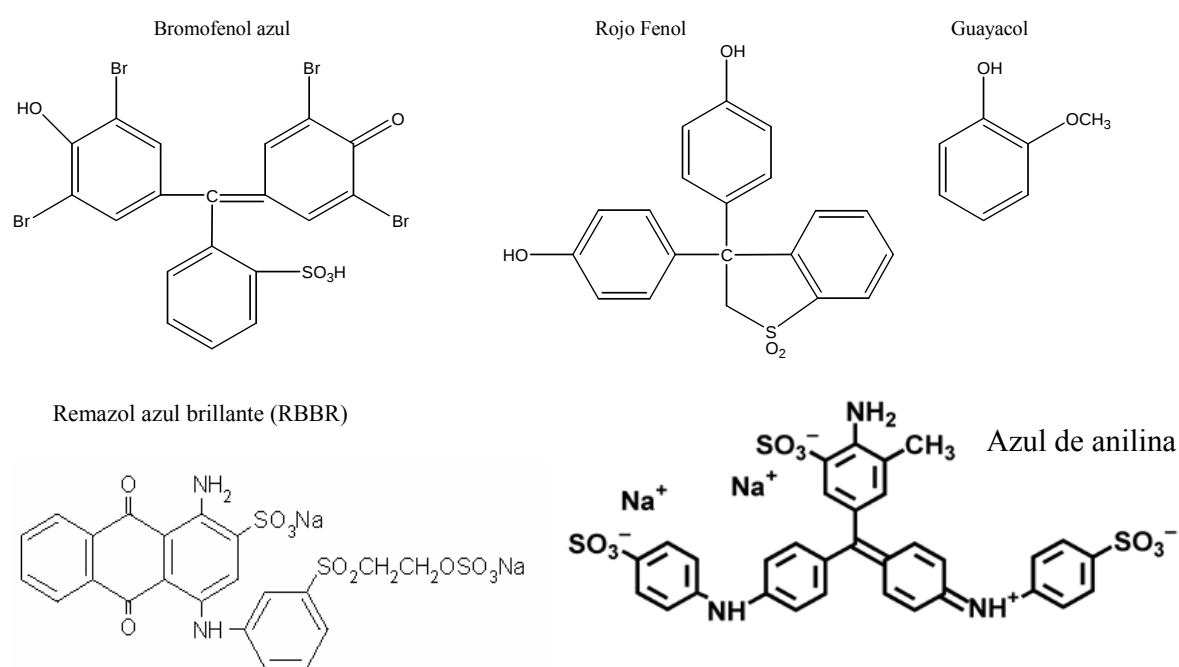


Figura 4. Estructura química de los colorantes empleados en los ensayos en medio sólido, para determinar la capacidad decolorante de *Pleurotus sp* (tomado del Catalogo SIGMA-Aldrich, 2005).

II.5 Cultivos en medio líquido.

II.5.1- Preparación del inóculo.

Previamente la cepa del organismo seleccionado se transfirió en placas con APD. Se emplearon dos variantes para la preparación del inóculo a añadir en los medios líquidos:

- Se raspó el micelio, crecido hasta cubrimiento total, en una placa (Ø 25 cm) con una espátula estéril y se adicionó en 50 mL de NaCl al 1%. Se agitó vigorosamente y se inoculó en el MSH líquido agitado a razón de 1:10 (v:v).

b) Se transfirieron de forma aséptica, 3 fragmentos de micelio crecido en agar de 1cm de diámetro a 60 mL de caldo PDY y se incubó durante 6 días en la oscuridad, en agitación. Posteriormente se homogenizó este cultivo en una batidora (Blender, Osterizer, Suecia) mediante dos golpes de batido de 10 segundos cada uno, en la menor velocidad y se inocularon porciones del homogenizado de micelio a razón de 1:10 (v:v) en los cultivos conteniendo PDY.

II.5.2- Condiciones generales para los cultivos líquidos.

Todos los cultivos en medio líquido se prepararon en erlenmeyer con 200 mL del medio, manteniendo la relación entre volumen del medio: volumen del recipiente de 1:5. La incubación se realizó a 30 °C, en la oscuridad y bajo agitación (excepto para los cultivos estáticos) en zaranda orbital (New Brunswick, EUA) a 120 min⁻¹. El pH se ajustó a 6,5.

Antes de añadir los efluentes industriales en los medios de cultivo, se centrifugan para eliminar los sólidos suspendidos en una centrífuga Beckman R-500 (Alemania) a 5000g x 15 minutos

II.5.3- Cultivos con los residuales.

Se estudió la decoloración, la disminución de la DQO y la actividad lacasa en los tratamientos con *Pleurotus sp.*, de los residuales a concentraciones del 50 % (v:v) en MSH. Para ello se utilizaron diferentes condiciones de cultivo y de los componentes del MSH o del residual, cuyas variantes experimentales aparecen referidas en la Tabla 3. Se usó un diseño experimental de evaluación de una variable cada vez. El residual fue añadido al medio y luego autoclaveado, pues en estudios previos se había demostrado la estabilidad de los mismos a las condiciones de esterilización.

La inoculación se realizó según el procedimiento II.5.1(a). En el *experimento 1* las diferentes fuentes carbonadas se añadieron a una concentración de 20 g/L y el cobre (*experimento 4*) se suplementó con 150 µmol/L de CuSO₄ (anhidro), al tiempo de inoculación. Para el cultivo desarrollado a pH 4,5 éste fue ajustado, en caso necesario, con HCl (1N).

Se monitoreó la disminución del color y la DQO según se describe en el epígrafe II.1.3 y II.1.4, respectivamente; además de cuantificar la actividad lacasa usando el guayacol como sustrato, cuyo método de determinación se describe más adelante (II.6.1). La biomasa, para evaluar el crecimiento, se determinó por peso seco (II.11.1).

Se prepararon cinco réplicas por cada condición en estudio y controles abióticos, consistentes en los mismos medios sin inocular. El tiempo de experimentación fue de diez días para todos los casos.

Tabla 3. Variantes experimentales utilizadas para la evaluación de la influencia de las condiciones de cultivo y la composición del medio, en la decoloración y producción de lacasa.

Experimento (No. de orden)	Variable (Unidad de medida)	Niveles			Residual Ensayado
1	Fuente carbonada	glu	sac	gli	Ambos
2	Conc. de la fuente carbonada (g/L).	5	10	20	Ambos
3	Adición de fuente de nitrógeno y minerales	Sí		No	Ambos
4	Suplementación del medio con Cu ²⁺	Sí		No	Ambos
5	Condiciones de aireación del cultivo	estático		agitado	Ambos
6	Concentración del residual (%)	50		100	ELP
7	pH inicial del cultivo	4,5		6,5	Vinaza

glu: glucosa. sac: sacarosa, gli: glicerol

A partir de las mejores condiciones mostradas, se ensayó el biotratamiento de ambos residuales siguiendo los parámetros de respuestas comentados anteriormente (color y DQO), además de la remoción de fenoles. Para el caso de la vinaza se determinó también la reducción de la toxicidad de este efluente. El tiempo de experimentación fue de 15 días.

II.5.4- Cultivos para estudiar el patrón enzimático en presencia de los residuales bajo estudio.

Se estudiaron comparativamente las actividades enzimáticas, descritas en el acápite II.6, que se detectan durante la decoloración de la V y el ELP con el híbrido *Pleurotus sp.* CCEBI 3024 (*P. ostreatus* x *P. ostreatus*), con respecto a las evidenciadas durante el crecimiento en los medios controles. El ELP se utilizó sin diluir (100 %) y la vinaza se adicionó al 50 % (v:v) y como medio control se utilizaron el MSH para el ELP y PDY, para la vinaza. Además se estudió la producción de enzimas durante la decoloración de vinaza con *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kummer (var. Florida), bajo las mismas condiciones descritas para este residual. Se tomaron muestras, cada dos días, de los cultivos de ambos organismos en vinaza y se desarrollaron zimogramas (según procedimiento II.11.3).

Se desarrolló un experimento consistente en un medio de cultivo con vinaza, bajo las mismas condiciones anteriores, al que se le adicionó diariamente desde el segundo día el inhibidor de

proteasas fluoruro de bencil sulfonilo (PMSF) en concentración de 0,1 mmol/L. Se determinó la remoción de color, la actividad lacasa y corridas electroforéticas (zimogramas, ver acápite II.11.3), a los 15 días del tratamiento.

Se prepararon inóculos de ambas cepas mediante el procedimiento descrito en II.5.1.(b) los cuales fueron adicionados a erlenmeyer que contienen 200 mL del medio a ensayar. Los cultivos se realizaron en las condiciones de incubación ya descritas como condiciones generales para los cultivos líquidos (II.5.2).

Cada dos días se tomaron de forma aséptica, alícuotas de un mililitro de los cultivos, se centrifugaron a 4 °C y el sobrenadante se empleó para la realización de las determinaciones de las actividades enzimáticas.

II.6. Medición de las actividades enzimáticas ligninolíticas.

Todas las actividades enzimáticas se midieron a 30 °C. Se emplearon 100 µL de sobrenadantes del cultivo o solución enzimática, para un volumen final de ensayo de un mililitro. La unidad de actividad (UA) se definió como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 µmol de producto en un minuto. Para el cálculo de UA se tuvo en cuenta las diluciones realizadas a las muestras.

II.6.1- Actividad lacasa.

La actividad lacasa (Lac) se determinó mediante dos métodos que emplean sustratos diferentes:

- **ABTS:** El ensayo de actividad lacasa con ABTS se realizó según modificación realizada por Palmieri y col. (1997) al método descrito por Wolfenden y Willson (1982). La mezcla de ensayo contiene 2 mmol/L de ABTS en 0,1 mol/L de tampón citrato de sodio, pH 3,0. La oxidación del ABTS fue seguido a través del incremento de la absorbancia a 420 nm ($\epsilon=36\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).
- **Guayacol (orto-metoxifenol):** El método utilizado se basa en el seguimiento de la oxidación del guayacol a 470 nm ($\epsilon_0=6\,740\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) en una mezcla de reacción que contiene 10 mmol/L de guayacol en 0,1 mol/L de tampón fosfato a pH 6, para un volumen final de reacción de 1mL (Marques de Souza y Peralta, 2003).

II.6.2- Actividad lignina peroxidasa.

La actividad lignina peroxidasa (LiP) se determinó según el método descrito por Tien y Kirk (1984), que se basa en la oxidación del alcohol veratrílico a veratraldehído en presencia de H_2O_2 . El coeficiente de extinción molar del veratraldehído en estas condiciones es $\epsilon_0 = 9\,300\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. La mezcla de reacción contiene una concentración final de tampón tartrato (pH 3.0) de 0,1 mol/L; alcohol veratrílico 2 mmol/L y H_2O_2 0,4 mmol/L. El incremento de absorbancia se mide a una longitud de onda de 310 nm durante un minuto.

II.6.3- Actividad manganeso peroxidasa.

Para medir la actividad manganeso peroxidasa (MnP) se siguió el método de Pick y Keisare (1980) con algunas modificaciones. Se utilizó como sustrato el dimetoxifenol (DMP) donde los componentes de la mezcla de reacción fueron 0,2 mmol/L de DMP, 0,5 mmol/L de MnSO_4 , 0,05 mmol/L de H_2O_2 y el tampón malonato de sodio a un valor de pH de 4,5. El incremento de absorbancia se midió a 477 nm ($\epsilon = 14\,800\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

II.6.4- Actividad peroxidasa versátil o peroxidasa independiente de manganeso.

La actividad peroxidasa independiente de manganeso (MIP), también llamada peroxidasa versátil, fue ensayada usando las mismas condiciones que para determinar la actividad MnP, pero en ausencia de MnSO_4 .

II.6.5- Actividad peroxidasa decoloradora de colorantes.

Esta actividad enzimática (DyP) fue determinada usando el colorante RBBR como sustrato, cuya transformación es seguida por el decremento de la absorbancia a 592 nm ($\epsilon = 9\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Además de las alícuotas del sobrenadante del medio de cultivo, se pusieron a reaccionar 50 $\mu\text{mol/L}$ del sustrato, 0,1 mmol/L de H_2O_2 en 20 mmol/L de tampón acetato de sodio, pH 4.0 (Vyas y Molitoris, 1995).

II.6.6- Actividad aril-alcohol oxidasa.

Para la determinación de la actividad enzimática aril-alcohol oxidasa (AAO) se utilizó como sustrato el alcohol veratrílico. La mezcla de reacción contenía 2 mmol/L de este compuesto en 20 mmol/L de tampón acetato de sodio a pH 4. Se midió el incremento de absorbancia a 310 nm ($\epsilon = 11\,400\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Tien y Kirk, 1984)

II.7. Decoloración de la vinaza con extractos enzimáticos crudos.

Se estudió la decoloración del efluente vinaza con extracto enzimático obtenido a partir del cultivo de *Pleurotus sp.* en medio con vinaza al 50 % (apartado II.3.1 de Materiales y Métodos).

Para obtener los extractos se eliminaron los restos de micelio, filtrando los sobrenadantes de los cultivos. Luego se precipitó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta el 80 % de saturación y se realizó la diálisis, frente a agua destilada durante 24 horas en refrigeración, a través de membranas de 10 kDa. Luego se concentró el crudo cinco veces con respecto al volumen inicial, en membrana Amicon-PM 10.

Para realizar los estudios de decoloración del efluente se tomó la medición de la actividad lacasa como referencia en la solución dializada, y se prepararon mezclas de 10 mL de volumen final, con la cantidad de extracto necesaria para tener 10 U de actividad y el efluente a concentración del 50 %. Las mezclas se colocaron en tubos Falcon de 50 mL que se incubaron a 30 °C en baño termostático con agitación (120 min^{-1}). Además se prepararon controles con composición idéntica a la de las mezclas en estudio, que se hirvieron 10 minutos para inactivar las enzimas y se incubaron en las mismas condiciones.

Se monitoreó el cambio de color asociado a la degradación enzimática del efluente, a través de la medición de las unidades de color, como se describe en el apartado II.1.3 de este capítulo. También se midieron los cambios en el espectro de absorción de las muestras, previa dilución de las mismas, en el rango de longitudes de onda comprendido entre 300 y 800 nm.

Se realizó el experimento tres veces y se hicieron mediciones por triplicado de cada parámetro (color y actividad lacasa).

II.8. Decoloración de la vinaza con enzimas lacasas purificadas.

Se evaluó la capacidad de enzimas purificadas de lacasa, de decolorar la vinaza al 50 % (v:v). Para ello se utilizaron las isoenzimas POXC y POXA3, purificadas a partir del caldo PDY donde previamente se había crecido el organismo *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kummer (var. Florida), según procedimiento descrito por Giardina y col. (1999). Estas isoenzimas purificadas fueron donadas por el laboratorio de Biología Molecular y Ambiental de la Universidad “Federico II” (Nápoles, Italia).

Se pusieron a reaccionar en tubos Falcon 2,5 mL de este residual con cantidades apropiadas de enzimas POXC (1, 10 U/mL) hasta completar un volumen de 5 mL. Se ensayó la vinaza al 50 %, sin control de pH. De igual forma se realizó un experimento para evaluar la decoloración producida por POXA3 y mezclas de ambas (POXC, POXA3) en diferentes proporciones a valores totales de actividad de 1 U/mL, 10 U/mL, respectivamente. Además de evaluar la

decoloración en los ensayos se determinó la estabilidad de la enzima por medición de su actividad en el tiempo, usando ABTS como sustrato.

Los experimentos fueron realizados a 30 °C, en un baño termostático y por 24 horas, a menos que se especifique otra cosa. Para cada condición se realizaron los ensayos duplicados y la medición de color y de actividad enzimática, se hicieron con cinco réplicas.

II.9. Fraccionamiento cromatográfico de lacasas.

Se utilizaron caldos de 12 días de cultivo de *Pleurotus sp.* CCEBI 3024 en medio PDY y PDY-vinaza 50 %. Las proteínas extracelulares fueron separadas del cultivo líquido mediante precipitación del medio filtrado, empleando (NH₄)₂SO₄ hasta el 80 % de saturación y posterior centrifugado a 10 000 g por 30 minutos. El precipitado fue resuspendido en tampón fosfato de sodio 50 mmol/L a pH 6 y dializado contra el mismo buffer, al menos tres veces por espacio de 24 horas. La muestra fue nuevamente centrifugada y el sobrenadante cargado a una columna cromatográfica (2,5 x 40 cm) de DEAE-Sepharose Fast Flow (Pharmacia, Uppsala, Suecia) previamente equilibrada con el mismo buffer. La columna fue lavada a un flujo de 0,8 mL/min con 200 mL del buffer fosfato y la proteína retenida en la matriz, se eluyó con la aplicación de un gradiente lineal de NaCl de 0-0,5 mol/L (500 mL). El eluato se colectó automáticamente (colector Pharmacia Biotech) en fracciones de un mililitro y las fracciones activas fueron identificadas por valores de actividad lacasa, usando ABTS como sustrato. Finalmente se agruparon las fracciones que contienen mayor actividad Lac y se concentraron con una membrana Amicon PM-10. Se le determinó la concentración de proteínas a las fracciones colectadas, según procedimiento II.11.4.

II.10. Ensayo de toxicidad.

Este ensayo fue desarrollado usando a *Bacillus cereus* 6E/2 como organismo indicador, según reporta Martirani y col. (1996) y Palmieri y col. (2005). El cultivo bacteriano fue crecido en TY hasta obtener un crecimiento de 0,5 de absorbancia medido en un espectrofotómetro a una λ = 600 nm. Cada ensayo fue llevado a cabo en tubos de vidrio para un volumen final de 5mL, conteniendo 0,5 mL de TY (10x), 0,1 mL de la suspensión bacteriana y 4,4 mL de las muestras a analizar. Como muestra se tomaron: un cultivo en PDY con vinaza al 50 %, el mismo sin inocular (usado como control) y un cultivo luego de crecido el hongo y decolorado la vinaza. Como control positivo (sin inhibición) se consideró la sustitución en el ensayo de agua destilada, en vez

de las muestras. Todas las muestras fueron llevadas a pH 6 antes de tomar las alícuotas para el ensayo.

Los tubos con el ensayo de toxicidad fueron incubados a 28 °C y cada media hora se midió la absorbancia a 600 nm, hasta que los cultivos bacterianos estuviesen en fase de mantenimiento celular (alrededor de 4 horas); que no hubiese variaciones apreciables de los valores de absorbancia.

La reducción de la toxicidad fue calculada según la siguiente expresión:

$$\text{Red. de la toxicidad} = (A_{vt} - A_v) / A \quad (\text{ec. 3})$$

Donde: A_{vt} es la absorbancia a 600 nm para la vinaza decolorada con el hongo

A_v es la absorbancia a 600 nm para la vinaza sin decolorar

A es la absorbancia a 600 nm para el medio TY sin vinaza

Se realizaron tres réplicas para cada muestra, a cada tiempo y se promediaron los valores obtenidos para dos experimentos independientes.

II. 11. Otras técnicas empleadas.

II.11.1- Determinación del peso seco.

La biomasa fue estimada a través de la determinación gravimétrica del peso seco. Para desarrollar este método, en los medios líquidos se filtró el micelio de las tres réplicas de los cultivos en los que se realizó la medición de este parámetro, se lavó el filtro con agua destilada, se secó en estufa a 105 °C hasta que el peso de la muestra se mantenga constante (APHA, 1998).

II.11.2- Determinación de glucosa.

Se utilizó el método Fluitest^R Glu (Biocon, Alemania), el cual consiste en un ensayo enzimático colorimétrico sobre la base del acoplamiento de la glucosa-oxidasa y una peroxidasa.

II.11.3- Zimogramas de lacasas.

La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes y a pH alcalino, en cubetas Mini-Protean (Bio-Rad), mediante el método de Laemmli (1970). La concentración de poliacrilamida fue del 4 % en el gel concentrador, y del 9,5 % en el separador. La solución tampón para el gel concentrador fue Tris-HCl 50 mmol/L a pH 7,5. La solución

depositada en la cámara electroforética fue Tris 25 mmol/L, glicina 190 mmol/L, pH 8,4. Se cargaron 12 µl de las muestras (sobrenadante de cultivos en medios líquidos) y se aplicó un voltaje constante de 80 V, aproximadamente una hora. Los geles fueron teñidos usando ABTS como sustrato o dimetoxifenol

Para el revelado con ABTS se usó el mismo tampón que el usado para la actividad lacasa y el color de las bandas con actividad lacasa es verde.

Para realizar el revelado con dimetoxifenol, el gel se equilibró previamente en tampón acetato 0,1 M (pH 5,2) durante 20 minutos, tras lo cual se añadió 2,6-dimetoxifenol 10 mmol/L en el mismo tampón acetato. Se agitó el gel, hasta la aparición de las bandas anaranjadas características de la actividad lacasa en presencia de este sustrato y se detuvo la reacción lavando el gel con el tampón acetato.

II.11.4- Determinación de proteínas.

La concentración de proteínas fue determinada mediante el método de Bradford, usando el kit de ensayo BioRad (BioRad, Hércules, California), con albúmina de suero bovino como patrón.

II.12. Análisis estadístico de los resultados.

Para el procesamiento de los parámetros muestrales se utilizaron los estadígrafos media aritmética y desviación estándar. Con la finalidad de determinar si los datos cumplían una distribución normal se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov y a continuación, la prueba de Bartlett o la F máxima para determinar la homogeneidad de varianza. Se realizaron análisis de varianzas (ANOVA), de clasificación simple para comparar los promedios de los grupos de tratamiento. Para las comparaciones de las medias de los tratamientos *a posteriori* se empleó la prueba de rangos múltiples de Duncan. Para probar la igualdad entre las medias de grupos no pareados se utilizó la prueba t de “Student”. Cuando los datos no cumplían con la homogeneidad de varianza, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney (Sigarroa, 1985). Para analizar la relación entre las actividades enzimáticas y la decoloración se realizó un análisis de correlación producto-momento y de regresión, empleando el coeficiente de correlación de Pearson. Se utilizó el paquete informático *Statistica for Windows* versión 5.0/1995 (StatSoft, Inc.). Todas las pruebas se realizaron con $p < 0,05$.

III.

RESULTADOS

III. RESULTADOS

III.1. Caracterización de los residuales de la pasteurización de la pulpa de café (ELP) y la vinaza de destilería (V).

La caracterización de un residual es el punto de partida para la comparación de tratamientos, establecimiento de estrategias basadas en procedimientos ya conocidos o nuevas propuestas; así como, la comparación con normas existentes, que permiten evaluar el daño que pueden provocar. Por lo que constituye una tarea básica cuando se quiere emprender cualquier investigación, que tenga como finalidad, reducir el impacto que ocasionan éstos sobre el medio ambiente.

En la Tabla 4 se muestra la caracterización físico-química de ambos residuales bajo estudio, principalmente enfocada hacia parámetros de impacto ambiental y para el crecimiento de microorganismos.

El residual de la pasteurización de la pulpa de café es de color negro, olor a pulpa de café seca y con materias en suspensión. Sus valores de pH son ligeramente ácidos y muestra una elevada contaminación orgánica, pues la DQO y DBO son superiores a los 5 g/L. Presenta $7,9 \pm 0,9$ g/L de sólidos totales y la presencia de magnesio y calcio en pequeñas cantidades. Es significativo hacer notar la presencia de compuestos fenólicos (polifenoles) en su composición (Tabla 4).

Como resultado de la determinación de la luminancia, como método referido en el Standard Methods (APHA, 1998) para la evaluación del color, el ELP se caracteriza por ser muy coloreado pues presenta un valor de $50,9 \pm 3,1$ % para una dilución 1:10 (v:v), el color que más lo caracteriza es el **amarillo verdoso** y la longitud de onda predominante es 570 nm.

En cuanto a la presencia de elementos necesarios para el crecimiento de microorganismos, resalta la escasez de nutrimentos del ELP, pues resultan bajos sus valores de carbohidratos.

Las variaciones encontradas entre las diferentes caracterizaciones de las vinazas demuestran que su composición depende de parámetros tan disímiles como la materia prima, la tecnología de destilado y aún dentro de ellos, varían en dependencia de las especificaciones de calidad y eficiencia de cada proceso (Brossard y Cortéz, 1996; Bermúdez y col., 2000). Por lo que a pesar de la información que existe al respecto, se deben estudiar las características específicas de la vinaza objeto de estudio, con vistas a reducir su potencial contaminante (Tabla 4).

En este estudio la vinaza utilizada se caracteriza por ser un líquido brillante con partículas en suspensión, olor característico a miel de caña y sabor a malta. Este residual presenta valores de pH muy bajos, sólidos en concentración apreciable y la materia orgánica por encima de 5 g/L de DQO, considerada como alta. En apariencia, de color pardo (marrón) muy oscuro y su valor de

luminancia es bastante bajo (30 %, dil. 1/10). El color y longitud de onda predominante determinados es el amarillo-naranja y 510 nm, respectivamente.

Como se observa en la Tabla 4, la vinaza es rica en minerales y entre ellos metales componentes de algunas metaloenzimas, como el cobre y el magnesio. En comparación con el ELP, la vinaza es más rica en nutrimentos, pues su valor de carbohidratos es siete veces mayor que el encontrado en el residual de café ($8,24 \pm 0,60$ g/L vs $1,15 \pm 0,19$ g/L) e igualmente sucede con el contenido de nitrógeno. Los valores de fenoles de ambos residuales también son apreciables ($50,5 \pm 2,5$ mg/L para V y $25,8 \pm 1,7$ mg/L para ELP).

III.2. Selección de la cepa de *Pleurotus* sp. para el trabajo con los residuales.

Ensayos cualitativos.

En este estudio se emplearon ocho cepas pertenecientes al género *Pleurotus*. Todas ellas han sido referidas en la Colección de Cultivos del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, como microorganismos empleados en el cultivo de setas comestibles sobre residuales agroindustriales y capaces de crecer sobre sustratos ligninocelulósicos.

En primer lugar, se evaluó la capacidad de crecer a temperaturas tropicales. De las ocho cepas (ver acápite II.2 de Materiales y métodos) la CCEBI 3021 y la CCEBI 3025 no crecieron a las temperaturas ensayadas ($30 - 35^{\circ}\text{C}$) y la CCEBI 3026, tuvo un crecimiento escaso a 30°C y ninguno a 35°C ; pero aún así, se siguió trabajando con ella (datos no mostrados). Este parámetro fue considerado como excluyente para continuar el proceso de selección.

En segundo lugar, se ensayaron las seis cepas que crecieron a temperaturas iguales y superiores a 30°C , en medios sólidos en placas con ambos residuales al 25 % (v:v), evaluando el crecimiento micelial y determinando la velocidad de crecimiento radial (μ). Para poder tratar un residual es necesario que el organismo seleccionado crezca en el mismo y pueda desencadenar los procesos bioquímicos de que dispone para la degradación de los componentes contaminantes.

La Fig. 5 muestra que en todas las cepas de *Pleurotus* sp. (CCEBI 3022, CCEBI 3023, CCEBI 3024, CCEBI 3026, CCEBI 3027, CCEBI 3028) se observó crecimiento y las características del micelio son similares a las que se observan cuando se crece en el medio control agar papa dextrosa y el medio sintético para hongos. El crecimiento fue mayor o igual en ELP, con respecto a la vinaza, en todos los organismos evaluados y tres cepas mostraron las mayores velocidades para este residual: la CCEBI 3022, CCEBI 3024 y CCEBI 3027. En el ensayo en los medios con vinaza (25 %) la de mejor comportamiento fue el *Pleurotus* sp. CCEBI 3024, cuya velocidad de crecimiento es significativamente superior al resto (Fig. 5). Tanto para el ELP como la V, la cepa

de peor comportamiento resultó ser la CCEBI 3026, la cual no presentó crecimiento a temperaturas de 35 °C; por lo que se decidió no seguir trabajando con ella.

Evaluando el efecto de diferentes concentraciones del residual (25 %, 50 %, 100 % en medios agarizados) para el crecimiento de dos de las cepas de mejor comportamiento (CCEBI 3022 y CCEBI 3024), se observó que en el residual ELP el crecimiento de ambas no se ve afectado por este parámetro y es similar al control (Tabla 5). Sin embargo, la vinaza muestra un efecto inhibitorio creciente a partir de 50 %, según se incrementa la concentración del residual, en ambas cepas de *Pleurotus sp.*. Estas diferencias llegaron a ser significativas cuando se comparan los crecimientos para las concentraciones del 100 %, con las restantes.

Se procedió a corroborar la capacidad de ambas cepas de crecer de forma apropiada en cultivos sumergidos con ELP (50 %), pues el crecimiento y la decoloración en medio sólido puede afectarse por fenómenos difusionales, limitaciones físicas, entre otros parámetros. Se seleccionó el residual de la pasteurización de la pulpa de café, por no encontrarse inhibición del crecimiento en este residual. Se obtuvo que la cepa CCEBI 3024 mostró mayor concentración de biomasa ($7,00 \pm 1,01$ g/L) que la CCEBI 3022 ($5,50 \pm 0,84$ g/L); además de una remoción del color del $53,3 \pm 3,5$ %, superior al $35,3 \pm 2,2$ %, respectivamente. Estos resultados fueron avalados por las diferencias estadísticamente significativas encontradas según prueba *t* de Student ($t = 13,1156^{***}$ para biomasa y $t = 15,88^{***}$ para remoción del color).

El hecho de encontrar crecimientos apropiados de este basidiomiceto en el ELP y V, tanto en cultivo sólido como sumergido, constituye un criterio favorable; pues una vez que el micelio ha colonizado, se conoce de la versatilidad de la maquinaria enzimática ligninolítica de los hongos de pudrición blanca para accionar sobre residuales disímiles (Wesenberg y col., 2003; Ikehata y col., 2004)

III.2.1- Evaluación de la capacidad ligninolítica de cepas de *Pleurotus sp.* en medio sólido.

Además de conocer sobre el crecimiento de estos hongos en los residuales en estudio, resulta interesante indagar sobre las potencialidades de excreción de enzimas ligninolíticas de estas cepas de *Pleurotus* y su relación con la decoloración de algunos compuestos modelos; pues son estas enzimas extracelulares las que resultan de interés, por las posibilidades de su aplicación en procesos ambientales, debido a la baja especificidad de sustratos que presentan.

Para ello se evaluó la excreción de enzimas fenoloxidasas en un medio conteniendo guayacol. El guayacol (orto-metoxifenol) es un sustrato muy usado en las determinaciones de las actividades

lacasa y algunas peroxidasas, como la MnP (Mansur, 1996; Giardina y col., 2000); pero además, estructuras del tipo guayacilo pueden encontrarse de forma natural como resultado de la degradación de polímeros como la lignina o el ácido húmico (Kirk, 1987; Blondeau, 1989).

Como se observa en la Fig. 6 todas las cepas probadas (CCEBI 3022, CCEBI 3023, CCEBI 3024, CCEBI 3027, CCEBI 3028) mostraron patrones de excreción de fenol-oxidasas, evidenciados por la formación de un halo de color rojo producto de la oxidación del guayacol. En estas cinco cepas la aparición del color comienza al cuarto día. Si se tiene en cuenta el tamaño e intensidad del halo coloreado como indicativo de la potencialidad ligninolítica, sólo la cepa CCEBI 3023 muestra escasa coloración y constituye por tanto, la de menor excreción. La cepa de mayor crecimiento resultó ser la CCEBI 3024 (Fig. 7), lo que refleja su capacidad de tolerar la presencia de compuestos fenólicos y la hace más accesible a degradar compuestos tipo lignina o análogos.

El empleo de colorantes sintéticos a menudo sirve de referencia para conocer si un microorganismo posee capacidad para degradar determinadas estructuras químicas que constituyen la base de sus grupos cromóforos. Es de interés el estudio de su decoloración, si estos grupos guardan semejanza estructural con estructuras químicas presentes en compuestos a degradar.

La evaluación de los cambios que se producen en dichos medios coloreados, también aporta indicios para el conocimiento de la producción extracelular de determinadas enzimas, pues los tintes o colorantes constituyen compuestos sintéticos de alto peso molecular o estructuras aromáticas cuya biodisponibilidad para su entrada y para ser degradados por enzimas intracelulares, se encuentra muy limitada por factores estéricos y biológicos (Maier y col., 2002; González y col., 2003; Wesenberg y col., 2003).

Es por eso, que en esta investigación se monitoreó el crecimiento y la decoloración en medios con los colorantes bromofenol azul, azul de remazol brillante (RBBR), rojo fenol y azul de anilina. Los dos primeros colorantes se seleccionaron por la frecuencia de su uso en experimentos de decoloración y los dos últimos, por poseer estructuras que constituyen grupos químicos “blanco” para la acción de las enzimas ligninolíticas, específicamente la lacasa (Fig. 4, ver Materiales y métodos). Como antecedente se conoce de la excreción temprana de estas enzimas por las cepas en estudio (ver experimento con guayacol).

Se escogieron los *Pleurotus* CCEBI 3022 y CCEBI 3024 por ser con los que se obtuvieron mejores resultados en el crecimiento en los residuales. Además se compararon los patrones de los cultivos de dichas cepas, con los de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kummer (var. Florida) que ha sido utilizado como referencia en tratamientos de residuales (Martinari y col., 1996; Kissi y col.,

2001), en estudio de las enzimas ligninolíticas (Giardina y col., 2000; Palmieri y col., 2003) y con *Phanerochaete chrysosporium* Burdsall M1 (DSM 13583), especie del basidiomiceto más utilizado como referencia para los estudios con hongos de pudrición blanca (Ollikka y col., 1993; Pinzón y col., 2004).

En ambos microorganismos se evidenció una estimulación del crecimiento por adición al medio del compuesto bromofenol azul, discrepando con los resultados obtenidos por Novotny y col. (2001). No se observó decoloración en las placas para los colorantes RBBR y bromofenol azul (datos no mostrados).

En los medios con anilina se detectó decoloración, en diferentes proporciones, para todas las cepas de *Pleurotus sp.* ensayadas (Fig. 8); aún cuando cada uno de los microorganismos cubrió la placa con su crecimiento micelial. La cepa CCEBI 3024 fue la que desarrolló un mayor halo de decoloración, incluso superior al organismo usado como referencia *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kummer (var. Florida). Se alcanzó casi la totalidad de desaparición del color, en el cultivo de *Ph. chrysosporium*. Es significativo que este hongo decolore tan extensamente la anilina, cuando no se ha detectado actividad lacasa en *Phanerochaete sp.*.

En el medio con rojo fenol se mostró cierta toxicidad de este colorante para las cepas de *P. ostreatus*, aún a concentración del 0,1 % (p:v), pues se redujo la velocidad de crecimiento micelial para todas, obteniéndose un crecimiento mínimo para la CCEBI 3022 (Fig. 9). En las placas donde hubo crecimiento se detectó un cambio de color del medio, tornándose de naranja-amarillo a rojo, resultado de la oxidación; cambio que comenzó a producirse a partir de las 18 horas de inoculación para *Phanerochaete sp.*, pero en *Pleurotus sp.* se detecta luego de transcurrido 48 horas. Sólo para *Pleurotus sp.* CCEBI 3024 se aprecia la formación de un área transparente en el centro de la placa como indicio de decoloración para el sexto día (Fig. 9).

Como era de esperar, la cepa CCEBI 3024 mostró un patrón de color en la placa similar al del *Pleurotus sp.* de referencia, manteniendo una zona cercana al punto de inoculación incolora y a continuación un color rojizo hasta el borde de la placa. *P. chrysosporium* produjo cambio de color a rojo desde el mismo inicio del crecimiento y en toda la placa (Fig. 9).

Resumiendo los resultados de estos ensayos cualitativos con guayacol y colorantes sintéticos, puede concluirse que todas las cepas ensayadas mostraron presencia de actividad oxidasa, usando guayacol como sustrato; lo que evidencia la presencia de fenoloxidasas del tipo lacasa. Y comparando los dos microorganismos de mejor comportamiento, CCEBI 3022 y CCEBI 3024, es ésta última la que demuestra resultados cualitativos superiores en los patrones de decoloración;

los que fueron caracterizados por un mayor halo de decoloración (azul de anilina) o aparición de una zona decolorada (rojo fenol).

III.3. Estudio de las condiciones y medios de cultivo para favorecer la decoloración de los residuales industriales ELP y V.

Para evaluar las condiciones más apropiadas para llevar a cabo el crecimiento y la biodecoloración mediada por la cepa *Pleurotus sp.* CCEBI 3024 seleccionada, se realizaron los estudios empleando el medio MSH con los residuales. Dentro de las enzimas ligninolíticas propias de *Pleurotus* se seleccionó la actividad lacasa, para monitorear la influencia de los parámetros estudiados sobre su producción extracelular; porque se conoce que este género de hongo de pudrición blanca es buen productor de esta enzima, en cualquiera de las condiciones ensayadas hasta el momento. Además se ha correlacionado la misma con la habilidad de varios hongos de decolorar efluentes industriales (Rodríguez y col., 1999; Dahiya y col., 2001; Ikehata y col., 2004). Para la evaluación de la actividad lacasa se utilizó el guayacol como sustrato en estos estudios. Se ensayó la concentración de residual al 50 % (v:v) a menos que se especifique otra cosa.

III.3.1- Influencia de la fuente de carbono y su concentración.

Se conoce que la fuente de carbono, nitrógeno y la adición de inductores, inciden en los perfiles enzimáticos y por tanto, en el crecimiento del hongo y la eficiencias de degradación de determinados compuestos presentes en los medios de cultivo (Mansur, 1996; Stajic y col., 2004). En *Pleurotus sajor-caju* se ha demostrado que las actividades de la lacasa son afectadas por los niveles de nitrógeno, carbono, manganeso y cobre; incluso, reguladas a nivel génico (Soden y Dobson, 2001).

A partir del conocimiento de estos antecedentes se decidió evaluar diferentes condiciones de cultivo (apartado II.5.3 de Materiales y métodos) con vistas a mejorar la decoloración del residual de pasteurización de la pulpa de café y la vinaza.

En la Tabla 6 se muestra que el tipo de fuente de carbono (glucosa, sacarosa y glicerol) no influye en la decoloración ($F = 0,4512$ n.s del ANOVA), lo que apunta al uso de éstas indistintamente, alcanzándose una reducción de más de la mitad del color en diez días de tratamiento. No obstante, los mayores valores de biomasa y eficiencia de conversión (rendimiento biomasa-sustrato, Y_x/s) fueron obtenidos en los casos donde la glucosa se utilizó como fuente de carbono; a diferencia de los resultados del crecimiento en medio ELP con sacarosa, donde se describieron

los más bajos valores de rendimiento con una reducción del crecimiento micelial a $6,16 \pm 0,67$ g/L. El crecimiento en sacarosa fue más lento, ya que el incremento de la biomasa se inició después del cuarto día.

Como era de esperar, la biomasa se incrementa con el aumento de la concentración de glucosa (Tabla 7) en ambos residuales, alcanzando valores superiores a 8 g/L para el valor máximo ensayado de ésta. Resultados similares fueron obtenidos por Guillén y col. (1998) en medio sintético, pero para un tiempo de 16 días de fermentación. Los mejores rendimientos de biomasa/sustrato ($Y_{X/S}$) para el ELP fueron para 10 g/L de glucosa donde su valor fue de 0,68 comparado con 0,28 y 0,41 para 5 g/L y 20 g/L, respectivamente. En el caso de la vinaza, la concentración donde se produjo la mayor eficiencia de conversión a biomasa fue 5 g/L de glucosa obteniendo 0,84 seguido de 0,78 para 10 g/L y 0,48 para 20 g/L. Los altos valores de $Y_{X/S}$ observados en este residual sugieren que *Pleurotus sp.* CCEBI 3024 es capaz de utilizar componentes de la vinaza empleándolos en su crecimiento, cuando las concentraciones de la glucosa se encuentran por debajo de 20 g/L, pues por lo general estos rendimientos en hongos se encuentran alrededor de 0,5 (Leatham, 1992).

La remoción de color mostró el mismo comportamiento que la biomasa, por lo que los valores más bajos se obtuvieron a concentraciones de 5 g/L. La mayor decoloración se obtuvo cuando se añaden 20 g/L de glucosa al cultivo, removiéndose más del 50 % del color del residual de la pasteurización del café y el $26 \pm 2,8$ %, para la vinaza. Por lo que la mayor concentración de glucosa es necesaria para lograr los mejores valores de remoción del color, fijándose el valor de 20 g/L para el resto de los estudios (Tabla 7).

A diferencia de los parámetros analizados, la actividad lacasa detectada no se afectó con las variaciones de glucosa en los experimentos desarrollados ($F=0,6396$ n.s del ANOVA).

Como se observa en las Tablas 6 y 7, se obtiene mayor cantidad de biomasa empleando la vinaza en comparación con el ELP.

III.3.2- Utilización de diferentes nutrientes de los medios de cultivo y del cobre como inductor.

En la vinaza sin diluir no se logró crecimiento de *Pleurotus sp.* CCEBI 3024 y por tanto, no hubo decoloración del residual. En el ELP diluido al 50 %, sin adicionar nutriente, se observó un pobre crecimiento; aunque se detecta actividad lacasa y a su vez, se logró una remoción del color del $15 \pm 1,2$ % (Tabla 8). Lo que confirma resultados anteriores, en medio sólido, donde se reflejó que algunos componentes de la vinaza resultan inhibitorios para el crecimiento y la

necesidad de la suplementación con glucosa para lograr valores significativos de reducción del color.

Para suplir de nutrimentos al ELP se utilizaron los medios sintéticos MBH y MSH, a los que se añadió el residual al 50 % (v:v) (Tabla 8). El MBH es un medio más restrictivo en cuanto a nutrimentos que el MSH (ver epígrafe II.3 de Materiales y métodos). Este contiene menores concentraciones de extracto de levadura y de la sal KH_2PO_4 , además de adicionarse asparagina, la cual ha sido reconocida como beneficiosa en el crecimiento micelial del hongo (Martínez-Carrera, 1989). Es un medio suplementado con una solución de microelementos que contiene metales como cobre y manganeso, cofactores de alguna de las enzimas ligninolíticas.

En el MSH se tiene peptona como otra fuente de nitrógeno, en vez de asparagina. La vinaza presenta más riqueza nutricional que el ELP, por lo que en los estudios con vinaza se comparan los resultados obtenidos con MSH y un medio comercial, PDY (Tabla 9).

La sola adición de glucosa (20 g/L) a los residuales bajo estudio provoca un incremento de los valores de remoción de la DQO y del color por el microorganismo CCEBI 3024, pero no así de la actividad enzimática en el ELP (Tabla 8). En la vinaza se logró una significativa decoloración ($61,2 \pm 5,1$ %), valor este que no difiere a los que se obtuvieron con las restantes variantes probadas (Tabla 9).

Por otro lado, la complementación con los microelementos del MBH al ELP diluido, favorece la producción de lacasa, de biomasa y la reducción de la DQO; pero la remoción del color es similar a lo obtenido, sin adición de éstos (Tabla 8).

La utilización del MSH favorece en mayor grado la biodegradación de compuestos coloreados y contaminantes que el MBH; pues, como se muestra en la Tabla 8, se lograron mayores remociones de color y materia orgánica (DQO), aparejados al incremento de actividad lacasa. Es con esta variante (MSH:ELP 50 %) que se obtuvo los mejores resultados, superando el 70 % de la remoción de color. Por otro lado, con la suplementación del residual sin diluir con los componentes del medio sintético se lograron valores estadísticamente similares de decoloración, biomasa y actividad lacasa, sólo afectándose la remoción de la DQO. Lo que hace suponer que aún cuando se continúen degradando compuestos coloreados del ELP por intermedio del sistema enzimático ligninolítico de *Pleurotus sp.* con igual eficiencia, existen compuestos que resultan recalcitrantes al tratamiento con este microorganismo o que requieren mayor tiempo para su oxidación completa. Esto confirma lo observado en los ensayos en medio sólido (en placa Petri), donde no se evidencia inhibición para este valor de concentración del residual (Tabla 5).

La adición del residual de la pasteurización de la pulpa de café incrementó los valores de actividad lacasa al menos cinco veces si se compara con los resultados obtenidos en los medios sintéticos (Tabla 8).

Como puede apreciarse para la decoloración de la vinaza con este basidiomiceto puede emplearse cualquiera de los medios propuestos, pues la suplementación con fuente nitrogenada (V-MSH vs V-glu) no afecta este parámetro de modo significativo (Tabla 9). Con el medio PDY se cuantificaron mayores valores de biomasa y de actividad lacasa.

Se han probado varios inductores de la lacasa como el ácido ferúlico, ácido vainillínico, el cobre, entre otros; reconociendo éste último como uno de los más efectivos (Palmieri y col., 2000). Por tal motivo, se seleccionó el cobre para evaluar el efecto de su adición en los cultivos.

Al añadir sulfato de cobre (150 $\mu\text{mol/L}$) al ELP se obtuvo un aumento de casi el doble en la actividad enzimática y se incrementó, también de modo significativo, la remoción del color ($t = -13,3951^{***}$ para actividad Lac y $t = -13,0855^{***}$ para remoción del color). Se alcanzaron valores de Lac de $4,7 \pm 0,9$ U/mL y de remoción del color de $57,1 \pm 2,3$ % para el control MSH:ELP (1:1); comparado con $8,51 \pm 0,32$ U/mL y $71,0 \pm 1,4$ %, para el medio suplementado con cobre.

En los tratamientos de la vinaza suplementado con cobre no hay incrementos importantes de la actividad enzimática (Lac)

III.3.3- Influencia de la agitación y el pH en la decoloración de la vinaza y el residual de la pasteurización de la pulpa de café por *Pleurotus sp.* CCEBI 3024.

La influencia de la agitación en la biodegradación por *Pleurotus sp.* CCEBI 3024 fue estudiada (Tabla 10). La biomasa, decoloración y la remoción de la DQO se incrementaron en los cultivos agitados en comparación con los cultivos estáticos, en ambos residuales.

Teniendo en cuenta que la vinaza es un residual líquido con un valor de pH muy bajo (Tabla 4), sería interesante conocer como ocurre la decoloración sin ajustar el medio de cultivo a pH 6,5. Los valores iniciales de pH detectados, una vez se adiciona el residual al 50 %, fueron de $4,45 \pm 0,11$. La reducción del pH inicial del medio de cultivo implicó deterioro de la capacidad de decolorar del hongo y de igual forma, afectó marcadamente la actividad lacasa para 15 días de tratamiento (Fig. 10). Los valores finales de pH aunque aumentan, no llegan a alcanzar los valores iniciales de los medios ajustados ($5,9 \pm 0,3$ vs 6,5). La remoción de la DQO resultó afectada de igual modo.

Por lo que se evaluó el tratamiento con *Pleurotus sp.* CCEBI 3024 en medios agitados y a pH 6,5.

III.4. Ensayo de decoloración del ELP y cinética del biotratamiento.

Como se demostró en los resultados descritos anteriormente, es posible crecer el basidiomiceto CCEBI 3024 en ELP al 100 % adicionando los componentes del MSH. Por lo que se tomaron estas condiciones para evaluar el biotratamiento de esta agua residual con este hongo, en virtud de que se reduce el volumen a tratar por no tener que realizar diluciones. Por otro lado, la remoción de la DQO presentó dificultades cuando se incrementó la concentración del residual, pero esto puede ser mejorado si se aumenta el tiempo. El tratamiento se prolongó a 15 días.

En la Fig. 11 se muestran los resultados de este tratamiento biológico del ELP. El cultivo de *Pleurotus sp.* CCEBI 3024 reduce la contaminación generada por la liberación del residual de la pasteurización de la pulpa de café, removiendo la materia orgánica ($78,9 \pm 5,1$ %) y el color ($74,5 \pm 3,5$ %) en este efluente, por encima del 70 %. Además se obtuvo la degradación de la mayoría de los compuestos fenólicos ($92,0 \pm 4,4$ %).

Durante el desarrollo de la experiencia se evidenció un abundante crecimiento micelial y no se observó adsorción significativa del color a la biomasa, pues ésta no superó el 1 % de luminancia después de extraído con metanol. El resultado refuerza la idea de que los mecanismos que participan en la decoloración del ELP son biológicos, fundamentalmente enzimáticos.

Aún cuando los medios controles (MSH, MBH y PDY) y el resto (medios con V y ELP) contienen 20 g/L de glucosa, se lograron mayores crecimientos del micelio para los que contienen el residual; sugiriendo la utilización de sus componentes orgánicos por el hongo, para su crecimiento (Tabla 8, Fig. 12A).

El valor de pH se incrementó como consecuencia de la actividad metabólica del microorganismo de 6,5 al inicio a $7,3 \pm 0,2$ al final de la experiencia, aportando al mejoramiento de las características físico-químicas del efluente.

Se conoce que existen diferencias en cuanto al perfil enzimático en el tiempo y los valores de decoloración obtenidos, atendiendo al organismo, al residual tratado y a las condiciones del cultivo empleado. Por lo que se procedió a estudiar la cinética de la biodecoloración, tratando de elucidar la participación de las enzimas ligninolíticas en el biotratamiento de los efluentes industriales bajo estudio.

En la Fig. 12A se observa un incremento de la biomasa (hasta 19,1 g/L) y las enzimas detectadas durante la decoloración del ELP fueron la lacasa (Lac) y la peroxidasa independiente de

manganeso (MIP); a diferencia del medio sintético donde sólo se encontró actividad lacasa. Ambas enzimas son liberadas durante la trofofase.

La enzima Lac está relacionada con el crecimiento alcanzando su máximo ($8,53 \pm 0,73$ U/mL) a los nueve días, en la fase tardía del crecimiento lineal, donde la cantidad de glucosa es de alrededor de 5 g/L (Fig.12A). El máximo de actividad MIP se observa a los seis días con valores de $1,78 \pm 0,12$ U/mL y luego hay una reducción de ésta hasta desaparecer a los 15 días.

La Fig. 12B muestra el comportamiento de la DQO y el color, relacionado con el crecimiento del hongo y las actividades extracelulares de las enzimas ligninolíticas detectadas. Se alcanzó una remoción del color de $77,8 \pm 5,1$ % y de la DQO, hasta un $80,8 \pm 3,9$ % a los 15 días de incubación. Se verificó la disminución de ambas enzimas al final del proceso.

Se aprecia en la fase lineal del crecimiento las mayores reducciones de color y de la materia orgánica contaminante (DQO), calculándose velocidades promedios de $2,04$ % luminancia $\cdot$ d $^{-1}$ y $1,76$ g $\cdot$ L $^{-1}\cdot$ d $^{-1}$, respectivamente (Fig. 12B). La reducción de estos dos parámetros de contaminación ambiental estuvo asociada al crecimiento del basidiomiceto, aspecto importante para la ingenierización del proceso, pues podría ser aplicado un cultivo continuo o un discontinuo incrementado. Además, estos procesos biodegradativos son concomitantes con el consumo de glucosa, soportando el análisis de los experimentos anteriores en los que se plantea que se requiere de glucosa para la decoloración efectiva del residual.

La reducción de la materia orgánica (DQO) tuvo dos etapas, al igual que la actividad lacasa. Es posible que primero se biodegraden con una mayor velocidad compuestos más simples como la glucosa suplementada al medio, carbohidratos, pectinas y luego, los polifenoles y otros compuestos recalcitrantes con una menor velocidad; pero propiciando la mayor actividad lacasa, para quien estos compuestos resultan excelentes sustratos e inductores, además del mantenimiento de la actividad MIP.

Continuando con la cinética descrita en la Fig. 12B, la decoloración del ELP estuvo correlacionada con la producción de lacasa por *Pleurotus sp.* CCEBI 3024 (coeficiente de correlación de Pearson $r = 0,97$, $p = 0,0308$), aportando a la importancia de esta enzima en la remoción del color.

Muchas isoformas de lacasa son expresadas por diferentes taxas y condiciones de cultivo y difieren en sus eficiencias catalíticas (Giardina y col., 1999; Ferraro, 2004). Por lo que resulta interesante indagar sobre las posibles isoenzimas de Lac presentes para estas condiciones, teniendo en cuenta que al final del ensayo de decoloración esta es la única enzima para la cual se

detecta actividad ($Lac = 3,48 \pm 0,07$ U/mL; $MIP = 0$ U/ml). y se demostró que la misma está correlacionada con la decoloración del ELP. La variación del tipo de lacasa sintetizada podría constituir un mecanismo de regulación de los organismos ligninolíticos, dirigido a garantizar una mayor accesibilidad o efectividad frente a nuevos sustrato.

Se procedió a determinar los parámetros cinéticos de la actividad del crudo enzimático frente al sustrato tipo guayacol, para diferentes concentraciones del mismo, a pH 6 y temperatura de 30 °C. Antes de desarrollar el experimento, se añadió al crudo cianuro de potasio (10 μ mol/L) que es un inhibidor de peroxidasas. Como resultado, se obtuvo una K_m aparente de $4,85 \pm 0,08$ mmol/L y una V_{max} aparente de $13,20 \pm 0,71$ U/min (Fig. 13).

III.5. Ensayo de decoloración de la vinaza y cinética del biotratamiento.

Conociendo que es posible utilizar tanto PDY como el MSH en la decoloración de la vinaza (Tabla 9), se decidió trabajar con el medio PDY para la caracterización de la cinética de este proceso. Se continuó trabajando con la vinaza diluida al 50 %. El tratamiento con *Pleurotus sp.* CCEBI 3024 fue igualmente de 15 días de duración.

Se comparó la capacidad biodegradadora de *Pleurotus sp.* CCEBI 3024 con *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kummer (var. Florida) y *Phanerochaete chrysosporium* Burdsall M1 (DSM 13583). La cepa de *P. ostreatus* usada como referencia para la comparación, ha sido utilizada en trabajos de determinación de enzimas ligninolíticas y en el biotratamiento de efluentes industriales (Martinari y col., 1996; Palmieri y col., 2000 y 2003). La de *P. chrysosporium* se ha usado como microorganismo en la decoloración y detoxificación de otros residuales industriales (Kissi y col., 2000 y 2001).

Se evaluaron los parámetros de impacto ambiental DQO, color, fenoles, pH y toxicidad. Este último teniendo en cuenta que ha sido descrito en la literatura el efecto tóxico de la vinaza sobre organismos acuáticos (Verma, 1976), el suelo (Agarwal and Pandey, 1994) y de su principal compuesto coloreado, sobre mamíferos (Kitts y col., 1993).

Como se aprecia en la Tabla 11, se alcanzan valores de remoción del color y los fenoles por encima del 75 % y de la DQO, del 60 %. Estos valores son similares a los que se alcanzan con los otros dos microorganismos estudiados. Se eliminó la toxicidad de la vinaza sobre *Bacillus cereus* 6E/2 y el pH alcanza valores cercanos al neutro ($7,5 \pm 0,2$).

III.5.1- Cinética del biotratamiento de la vinaza.

En la Fig. 14 se muestra la variación de los parámetros de contaminación monitoreados (color y DQO) respecto al crecimiento del hongo.

Como puede observarse, durante el crecimiento de *Pleurotus sp.* CCEBI 3024 en vinaza se alcanzó la fase estacionaria más rápidamente que cuando se creció en ELP y ésta comienza cuando se ha consumido el 75 % de la glucosa, quedando alrededor de 5g/L por consumir. No se manifestó fase de latencia y la decoloración se inició de conjunto con el crecimiento. Lo que significa que el hongo no requiere de adaptación para esta concentración del residual (50 %) y que los mecanismos decolorativos se activan desde el mismo inicio del crecimiento, sin necesidad de condiciones restrictivas de nutrimentos.

La decoloración mostró una correspondencia con el crecimiento en la trofofase, de ahí que en los experimentos anteriores (ver acápite III.3) se observó una relación estrecha entre la cantidad de biomasa y los valores de remoción del color (Fig. 14). Es en esta fase donde existe una mayor velocidad de consumo de glucosa, aspecto importante si se insiste en la relación que han descrito algunos autores entre la oxidación de la glucosa y los mecanismos ligninolíticos. Sin embargo, se hace notar que hasta el cuarto día la remoción de color no sobrepasa el 10 %. Este proceso continuó en la idiofase (Fig. 14), pero la capacidad decolorativa se deteriora cuando la glucosa es agotada (a partir de 1 g/L). La mayor remoción del color se verificó en la fase última del crecimiento lineal e inicios de la idiofase.

En la misma Fig. 14 se muestra que la reducción de la DQO fue en constante aumento, aún cuando la del color no se incrementa de forma significativa a partir del décimo día. Se alcanzaron valores de remoción del $62,5 \pm 3,1$ % para la DQO, lo que puede continuar incrementándose con el tiempo y del color, del $79,4 \pm 2,9$ %. Valores similares se han obtenido utilizando *P. chrysosporium*, *Trametes sp.* y *Bjerkandera sp.* (Fahy y col., 1997; González, 2001; Moreira y col., 1997).

El valor de pH se incrementa de 6,5 a $7,5 \pm 0,2$ al final del experimento, aunque a partir del sexto día hasta el décimo, se evidenció una reducción de este parámetro alcanzando el valor mínimo de $5,8 \pm 0,3$ (Fig. 14).

Durante el experimento no se evidenció adsorción significativa del color por el micelio.

III.5.2- Determinación de las enzimas ligninolíticas involucradas en la decoloración de la vinaza.

Evaluando la presencia de diferentes enzimas ligninolíticas, a través de sus actividades enzimáticas, se muestra el comportamiento de las mismas durante la decoloración de la vinaza por la cepa de *Pleurotus sp.* CCEBI 3024 en la Fig. 15B.

La determinación de la actividad Lac se realizó con ABTS como sustrato (epígrafe II.6.1) y el resto, según procedimientos descritos en Materiales y métodos (II.6).

No se detectó LiP durante todo el curso del tratamiento de la vinaza con *Pleurotus sp.* CCEBI 3024.

Se mostró una mayor diversidad de actividades enzimáticas que las que se presentan en el cultivo con ELP, e incluso difieren si el crecimiento es en presencia de vinaza o no; reafirmando la versatilidad de este hongo durante la decoloración de diferentes efluentes coloreados (Fig. 15 vs Fig. 12).

Tanto en ausencia (medio PDY) como en presencia del residual se detectó la actividad de la enzima DyP o decoloradora del colorante RBBR (ya que este es el sustrato empleado para su determinación), lo que su perfil difiere en cada uno; presentándose durante todo el crecimiento en medio con vinaza y sólo en la fase estacionaria, en medio PDY. Los valores de actividad final en ambos cultivos son similares, obteniéndose para PDY $1,87 \pm 0,21$ U/mL y para PDY+V es de $2,20 \pm 0,09$ U/mL (Fig. 15).

En tanto la actividad de las otras dos peroxidasas monitoreadas, la MIP y MnP, fueron ligeramente incrementadas por la presencia de la vinaza y restringidas a la fase del metabolismo secundario (Fig. 15 A y B); a diferencia de la MIP en el residual ELP que está presente en la trofofase. La MIP alcanzó valores similares en vinaza que los detectados en ELP (Fig. 12B) y su influencia en la remoción del color de este residuo líquido se hace notar en esta etapa, relacionada con el resto de las peroxidasas. Por otro lado, la MnP alcanzó su valor máximo de actividad al octavo día y luego decreció, inmediatamente después de alcanzarse el máximo de la actividad AAO, siendo efímera su presencia.

Se observa en la Fig. 15 B que los máximos de las enzimas peroxidasas fueron detectadas luego de la presencia de la AAO. Esta oxidasa, como se conoce, es productora de H_2O_2 durante la oxidación de alcoholes aromáticos a sus respectivos aldehídos; cofactor importante para la actividad de las MnP, MIP y DyP. La AAO sólo es detectada en cantidades apreciables en el medio con vinaza comparada con el medio PDY; por lo que este residual, o metabolitos

derivados de la biodegradación de sus componentes, son los que inducen la producción de esta enzima.

En este estudio, la actividad lacasa siempre se detectó en ambos medios, con y sin vinaza; obteniéndose valores mayores con el residual ($57,89 \pm 1,12$ U/mL vs $5,85 \pm 0,19$ U/mL en medio control). Esta enzima se aprecia desde el mismo inicio del crecimiento, aunque sus valores se incrementan notablemente a partir del tercer día.

Evaluando la relación existente entre las enzimas detectadas y la reducción del color, se observó la mayor correlación para la lacasa (Fig. 15B), en mayor proporción en la fase lineal del crecimiento (coeficiente de correlación de Pearson $r = 0,94$; $p = 0,006$). En la fase secundaria del crecimiento (estacionaria) se mantuvo el incremento de la actividad de la lacasa, pero se redujo su influencia en la decoloración.

Hay que destacar que la mayor velocidad de decoloración se logró a los tiempos donde se hacen detectables las actividades de todas las enzimas monitoreadas (a partir del cuarto día).

Al ser la cepa seleccionada para llevar a cabo la decoloración *Pleurotus sp* CCEBI 3024 un híbrido intraespecie de *Pleurotus ostreatus*, sería bueno comparar el comportamiento de ésta con una referencia del género; seleccionando a *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kummer (var. Florida) por haber sido utilizado en trabajos de tratamiento de residuales industriales y purificación y caracterización molecular de isoenzimas de lacasas, como se había expuesto anteriormente (Martinari y col., 1996; Giardina y col., 1999; Palmieri y col., 2000 y 2003).

Como se muestra en la Fig. 16 la decoloración con este organismo de referencia, aunque alcanzó valores similares ($77,6 \pm 3,5$ %) a los obtenidos con CCEBI 3024 ($79,4 \pm 2,9$ %), ocurre en dos etapas bien delimitadas y no de modo secuencial como se observa con la cepa híbrida (Fig. 15B). Además *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kummer (var. Florida) requirió el doble del tiempo que empleó *Pleurotus sp*. CCEBI 3024, para superar el 10 % de la remoción del color. La decoloración de la vinaza por este hongo de *Pleurotus ostreatus* alcanzó sus mayores valores durante el metabolismo secundario y estuvo muy correlacionada con la actividad lacasa, pues es la única enzima presente en los tiempos donde se alcanzó la mayor remoción del color (a partir del décimo día).

Se detectaron también actividad AAO, MIP y DyP, pero para esta última enzima se circunscribe su aparición a la trofófase; mostrando un comportamiento diferente al que se presenta en los cultivos con el híbrido CCEBI 3024 y en trabajos con otras cepas de *P. ostreatus* (Shin y col., 1997). La enzima AAO, en cultivos con *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kummer (var. Florida)

(referencia), mostró un valor más de nueve veces menor que el detectado con *Pleurotus sp.* CCEBI 3024 ($0,36 \pm 0,05$ U/mL vs $4,38 \pm 0,08$ U/mL, respectivamente), pero en ambos casos se obtuvieron los máximos al sexto día. Para la MIP, fue el doble la actividad con *Pleurotus sp.* CCEBI 3024 que la cuantificada con *P. ostreatus* de referencia. No hay presencia de actividad MnP, ni LiP (Fig. 16).

III.5.2.1- Estudio de las isoenzimas de lacasa presentes en la decoloración de la vinaza.

Partiendo de la variabilidad isoenzimática de lacasas que presenta el género *Pleurotus*, resulta interesante conocer las isoenzimas involucradas en el proceso de decoloración de la vinaza por este hongo.

En la Fig. 17 se muestran los zimogramas de lacasas, desarrollados en condiciones alcalinas, para muestras tomadas de los cultivos del híbrido de *Pleurotus sp.* CCEBI 3024 en medio PDY (sintético) y PDY-V (con residual).

En todos los casos se observaron la presencia de dos bandas fundamentales: una más ácida (Lac1) que la otra (Lac2), las cuales mostraron similitud de corrida electroforética con la POXC y POXA3, que se usan como patrones (Palmieri y col., 2000). En medio PDY la banda de Lac2 mantuvo su intensidad de modo similar durante todo el tiempo de experimentación. Con la adición de vinaza aumentó la intensidad de la banda de Lac2 en el decursar del tiempo, siendo máxima en el duodécimo día, coincidiendo con el máximo de actividad lacasa en los cultivos (Fig. 15B).

Es notable también que coincida la detección tardía de esta isoenzima en el zimograma del cultivo a pH 4,5, a partir del décimo día, con los mayores valores de la capacidad decoloradora de este microorganismo en los medios con vinaza (Fig. 18). Este comportamiento se corresponde con el aumento de la actividad lacasa y del pH del medio, por lo que el incremento de la actividad de esta isoenzima podría jugar un papel fundamental en la decoloración de la vinaza por este basidiomiceto.

Se observó en ambos zimogramas una banda más ácida que Lac1, la cual aparece y desaparece a partir del cuarto día, encontrándose con mayor frecuencia en el cultivo con vinaza, la que denominamos Lac1a (Fig. 17 A y B). Es significativo que esta banda apareció tanto en las muestras de los cultivos con *Pleurotus sp.* CCEBI 3024 como con *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kummer (var. Florida), donde nunca antes se había mostrado (Sannia G., 24 de Noviembre del 2004, comunicación personal); en ambos casos, sólo en medios con presencia de la vinaza (Fig.

16 y 17). Esta observación sugiere que esta isoenzima es inducida en presencia de los componentes de la vinaza.

En muestras filtradas de cultivos de *Pleurotus sp.* CCEBI 3024 en vinaza al 50 % se detectó la presencia al segundo día de una banda con menor corrida electroforética que Lac2, similar a la isoenzima POX1b usada como patrón (Palmieri y col., 2003), la que se identificó como Lac3 (Fig. 17C). De igual forma apareció en los medios sintéticos con PDY, con este organismo y la cepa de *Pleurotus ostreatus* usada como referencia, pero con diferencias en las intensidades. Otra banda fue visualizada en los zimogramas de los cultivos con este residual, intermedia entre Lac1 y Lac 2, de menor intensidad que éstas y presente desde el mismo segundo día; la que denominamos como Lac2a. Esta isoenzima cobra mayor intensidad en cultivos a pH 4,5 (Fig. 18).

En cultivos crecidos en presencia del inhibidor de serín-proteasas, fluoruro de bencil sulfonilo (PMSF), la decoloración no supera el $14,9 \pm 1,3$ % de remoción del color y $21,22 \pm 1,78$ U/mL de actividad lacasa. En el zimograma existe similitud entre las bandas que aparecieron para estos cultivos y las que se muestran a pH 4,5, estando afectada la banda de Lac2 y apareciendo más intensa la Lac2a, si se comparan con los cultivos a pH 6,5 (Fig. 19).

Como se aprecia en el fraccionamiento cromatográfico de caldos de cultivo de *Pleurotus sp.* CCEBI 3024 en presencia de vinaza y en PDY (Fig. 20a y b), durante el biotratamiento del residual se mantiene la presencia mayoritaria de Lac1, pero Lac2 se incrementa para el tiempo de 12 días (máxima decoloración). Los datos presentados en la Fig.20b confirman que el incremento de la actividad Lac es el resultado del aumento de la cantidad de enzimas producidas y no sólo, de su actividad. La Lac1 y Lac1a eluyen en la fracción II a un gradiente de 0,3 mol/L de NaCl, en igualdad de condiciones cromatográficas y de elución que la isoenzima POXC (Giardina y col., 1999). La Lac2 eluye para 0,2 mol/L de NaCl, similar al pico de elución de POXA3 (Palmieri y col., 2003).

Resumiendo se puede decir que la cepa de *Pleurotus sp.* CCEBI 3024 fue capaz de exhibir cinco isoenzimas, en dependencia de las condiciones y tiempo de cultivo; demostrando la variabilidad isoenzimática de lacasas que pueden detectarse durante la decoloración de la vinaza por este microorganismo.

Estableciendo una comparación en cuanto a las isoenzimas de Lac involucradas en la decoloración de la vinaza por *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kummer (var. Florida), con respecto a la cepa CCEBI 3024, se detectaron la POXC, la POXA3 y nuevamente apareció la banda más ácida que POXC lo que no de forma mantenida, sino sólo al cuarto y duodécimo día (Fig 16). Las

bandas de POXA3 se muestran con menor intensidad, aunque de igual forma se observa que a medida que avanza el tiempo esta se intensifica.

Tanto *Pleurotus sp.* CCEBI 3024 como *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kummer (var. Florida) muestran similares valores de remoción del color, aunque se observan diferentes perfiles de ocurrencia del proceso y de actividades enzimáticas.

III.5.3- Estudio de la decoloración de la vinaza con isoenzimas de lacasa y extracto enzimático crudo.

Para la decoloración de la vinaza se utilizaron dos isoenzimas purificadas de lacasa: POXC y POXA3. Estas fueron seleccionadas por ser mayoritarias en cultivos de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kummer (var. Florida) y por su similitud con las Lac1 y Lac2 de la cepa CCEBI 3024. Cuando se analizó la remoción de color con la isoenzima POXC purificada se observa que se alcanzó mayor valor con ésta, comparada con lo obtenido con POXA3 (Fig. 21). De igual forma la POXC resulta más estable en medios con vinaza, donde POXA3 solo retiene el $60 \pm 3,2$ % de su actividad inicial a las 24 horas. Sin embargo, la adición en conjunto de ambas isoenzimas (1 U/mL de actividad) incrementa los valores de remoción del color de modo significativo hasta $49,6 \pm 1,9$ % ($F = 49,6$ ** del ANOVA).

Conociendo que el fraccionamiento cromatográfico del medio con vinaza decolorada (Fig. 20a) y los zimogramas (Fig. 16, 17B) evidenciaron un incremento de Lac2 y asumiendo además, que esa isoenzima puede relacionarse con POXA3 de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kummer (var. Florida) (Fig. 18); se evaluaron diferentes proporciones de ambas lacasas (POXC y POXA3) para conocer el efecto del incremento de POXA3 en la remoción del color, como muestra la Fig. 22. Se redujo el tiempo de ensayo a cuatro horas para disminuir el efecto por la inactivación de las enzimas y se aumentó la actividad a 10 U/mL.

Como se muestra en la figura mencionada (Fig. 22), existe una relación lineal entre el aumento de la proporción de POXA3 y la remoción del color (coeficiente de correlación de Pearson $r = 0,96$ $r^2 = 0,93$, $p = 0,003$). Por lo que es conveniente la acción combinada de ambas enzimas para que el mecanismo de decoloración sea eficiente.

Los valores de decoloración obtenidos con las enzimas purificadas son inferiores de aquellos obtenidos con los microorganismos de *Pleurotus* CCEBI 3024 y *P. ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kummer (var. Florida) (para la mezcla POXA3/POXC $60,0 \pm 2,3$ % vs $79,4 \pm 1,8$ % y $77,6 \pm 3,5$ %, respectivamente); por lo que se evaluó la posibilidad de usar crudos enzimáticos filtrados y

dializados, partiendo de que en este se encuentran otras enzimas extracelulares, además de la lacasa.

Con el extracto enzimático así obtenido se logró un valor de remoción del color de la vinaza de $68,6 \pm 1,5$ para 24 horas, siendo estadísticamente superiores a los valores alcanzados con la lacasa purificada (ver Fig. 21 y 22), pero no a los obtenidos con el empleo del microorganismo (ver Fig. 15, Tabla 11) ($F=149,18^{**}$ del ANOVA).

La decoloración con el empleo del hongo resultó más significativa que la alcanzada con el extracto enzimático o la lacasa purificada; lo cual también se ve reflejado en la reducción de las absorbancias en el espectro de la vinaza, para todas las longitudes de onda de 200 nm - 800 nm (Fig 23).

IV.
DISCUSIÓN DE LOS
RESULTADOS

IV. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En el presente trabajo se abordó el estudio de la capacidad de *Pleurotus sp.* para el tratamiento de dos residuales de gran impacto ambiental, por la contaminación que provoca su liberación en recursos hídricos: el residual de la pasteurización de la pulpa de café y la vinaza de destilería. Además de estudiar las enzimas del sistema ligninolítico que se detectan durante el proceso de biodecoloración, aspectos de interés biológico y para una futura aplicación práctica.

IV.1. Caracterización de los residuales coloreados de la pasteurización de la pulpa de café y la vinaza de destilería.

El ELP es el efluente que se obtiene luego de la pasteurización de la pulpa de café, en plantas de setas comestibles que utilizan este sustrato. Por su parte, la vinaza de destilería es el residual líquido de las plantas de producción de alcohol.

La caracterización físico-química realizada (Tabla 4) confirma que ambos residuales (ELP y V) requieren de un tratamiento previo a su liberación en los sistemas hídricos. Ellos poseen elevados valores de carga orgánica (DQO) y la relación DBO/DQO superior a 0,5 (0,53 para el ELP; 0,65 para la V) reflejan su biodegradabilidad y apunta al empleo de métodos biológicos para su tratamiento.

El efecto contaminante del ELP se produce al pasar elementos de la fracción soluble de la pulpa de café al agua de pasteurización. Esta agua residual alcanza un color oscuro debido a la presencia de compuestos polifenólicos como el ácido clorogénico y los taninos, descritos en trabajos previos de otros autores como Field y Lettinga (1987) y Bello (1999) (Fig. 1). Los componentes causantes del color de este residual son derivados de estructuras fenólicas, de tamaño menor de 10 kDa y hay que tener en cuenta la presencia de compuestos que resultan antifisiológicos, como los propios taninos y la cafeína (Scalbert, 1991; Ramírez y Clifford, 2000), pues ellos pueden dar al traste con la implementación de algún sistema biológico para el tratamiento o biorremediación del ELP. El tratamiento de este residual para reducir sus impactos ambientales aseguraría, además, la ecosostenibilidad de la tecnología de setas comestibles.

En la vinaza los compuestos responsables del color son las melanoidinas y los caramelos (Blondeau, 1989). Las melanoidinas pueden representar el 70-80 % del peso de las sustancias

coloreadas de la miel (ICIDCA, 1986). Son polímeros de alto peso molecular (mayores de 10 kDa) formados al reaccionar, en condiciones alcalinas, azúcares y aminoácidos (reacción de Maillard), o de manera más general, por la reacción entre los grupos amino y carboxilo de las sustancias orgánicas (Reynolds, 1968). Las melanoidinas tienen propiedades antioxidantes y frecuentemente son tóxicas para los microorganismos utilizados en el biotratamiento de efluentes (Kitts y col., 1993). No existe una estructura química que las identifique, pero se les asocia con el humus por sus características espectroscópicas y composición (Blondeau, 1989) (Fig. 1). En cuanto a los caramelos, estos se producen debido a la descomposición térmica y condensación de azúcares (Kort, 1979).

Aunque en la propia estructura de las melanoidinas hay presencia de estructuras fenólicas, en la vinaza también se presentan fenoles más sencillos como el ácido gálico, vanilínico (FitzGibbon y col., 1995); de ahí que su concentración de este tipo de compuestos superen los del ELP (Tabla 4).

Si se comparan las características de ambos residuales con las Normas Cubanas (NC-27, 1999; NC-372, 2004), se observa que superan los límites permisibles de materias orgánicas para su vertimiento en ríos, embalses ($DQO < 120 \text{ mg/L}$) y en aguas marinas ($DQO < 50 \text{ mg/L}$); sistemas acuáticos que por lo general constituyen sus cuerpos receptores. También se superan los límites de concentración vertida, para sólidos totales y fenoles. En este último parámetro el valor permisible es 5 mg/L para nuestro país, pero existen normativas más estrictas para la presencia de este compuesto en aguas residuales como la europea ($0,5 \text{ mg/L}$ en aguas superficiales, 1 mg/L en residual urbano, $0,1 \text{ mg/L}$ en suelo).

Para el ELP se ha detectado inhibición en el crecimiento de microorganismos por su composición fenólica y por la presencia de cafeína (Scalbert, 1991), pero esta no llega a ser marcadamente tóxica como resulta con la vinaza, donde se ha detectado inhibición para plantas, peces, organismos asociado al suelo, entre otros (Agarwal and Pandey, 1994; Kitts y col., 1993; Yesilada, 1999).

En cuanto a la presencia de elementos necesarios para el crecimiento de microorganismos, resalta la escasez de nutrientes del ELP con respecto a la vinaza, pues resultan bajos sus valores de carbohidratos y nitrógeno (Tabla 4). Sánchez y Royse (2002) plantean que *Pleurotus sp.* puede utilizar el carbono a partir de diferentes fuentes como polímeros, carbohidratos, lípidos, etc.; siendo los carbohidratos las fuentes de carbono preferidas por este género de hongo.

La diferencia de estos residuos también se refleja en el contenido de minerales, que pueden influir en el biotratamiento, estando favorecidos la vinaza por la presencia de cobre y en mayor cuantía, de magnesio y calcio (Tabla 4).

Por lo que muestra la caracterización realizada, es probable que se requiera de la adición de nutrimentos a estos residuales líquidos, para el mejor crecimiento del microorganismo que se empleará como protagonista en el tratamiento. Esto no constituye un problema, pues se conoce que dentro de los hongos de pudrición blanca que han sido utilizados en la decoloración de residuales, los del género *Pleurotus* pertenecen al grupo de los que no requieren condiciones limitantes de nitrógeno o carbono para expresar su sistema ligninolítico extracelular y son capaces de decolorar bajo condiciones nutritivas amplias (Kirk, 1987; Cohen y col., 2002).

IV.2. Selección de la cepa de *Pleurotus* sp. para el trabajo con los residuales. Ensayos cualitativos.

Se han realizado trabajos donde se evalúan las potencialidades de los hongos de pudrición blanca para la decoloración de algunos residuales industriales (Zhang y col., 1999; Kissi y col., 2001, Wesenberg y col., 2003); por lo que se conoce que la capacidad de decolorar depende del microorganismo seleccionado, las condiciones de cultivo, las características del compuesto coloreado, entre muchos otros parámetros.

Se seleccionó el género *Pleurotus* sp. en esta investigación, partiendo de la experiencia que se tiene en nuestro país en el cultivo de este basidiomiceto como seta comestible, sobre residuales agroindustriales de naturaleza lignocelulósica o polimérica como los residuales cañeros y del café (Ortega, 1999; García, 1999; Bermúdez y col., 2001; Ortega y Otero, 2001; Hechavarría, 2005).

Para escoger la cepa de mejores características para el tratamiento biológico del residual con el fin fundamental de decolorarlos, se emplearon ensayos en medios sólidos. Las pruebas en placas Petri con medios sólidos suplementados con sustratos naturales o sintéticos, con compuestos modelos u otros, son ensayos simples, rápidos y de gran utilidad para valorar, de manera cualitativa, la capacidad de los microorganismos de crecer y degradar una amplia gama de compuestos (González y col., 2003).

A partir de los resultados de la estrategia de selección desarrollada, se escogió la cepa de *Pleurotus* sp. CCEBI 3024 (híbrido *P. ostreatus* x *P. ostreatus*) para la decoloración de la vinaza de destilería (V) y el residual de la pasteurización de la pulpa de café (ELP). Se tuvo en cuenta su capacidad de crecer a temperaturas de 30 °C y 35 °C, su rápido y mayor crecimiento en medio sólido con los residuales a diferentes concentraciones, la presencia de enzimas extracelulares

fenoloxidasas, detectadas cualitativamente con la oxidación del guayacol y su mayor crecimiento en presencia de este compuesto fenólico; así como, el crecimiento en medios con colorantes sintéticos (rojo fenol y azul de anilina) y su decoloración.

Para la selección de la cepa se tuvo en cuenta como parámetro excluyente el crecimiento a temperaturas de 30 °C y 35 °C, por ser las temperaturas máximas promedios que se alcanzan en nuestro país y por lo general, en países tropicales. Otros basidiomicetos con capacidad para decolorar residuales coloreados han presentado dificultad para crecer a temperaturas superiores a 30 °C (González, 2001).

Pleurotus es un género de hongo cuyo micelio puede crecer en un rango amplio de temperaturas (entre 0 °C y 35 °C) con valor óptimo para *P. ostreatus* de 30 °C (Gastón, 1993). Los rangos de temperatura mencionados deben ser considerados sólo como indicativos, ya que dentro de una misma especie pueden existir grandes variaciones entre cepas (Sánchez y Royse, 2002). Por tal razón es que el crecimiento a la temperatura de interés debe ser comprobado antes de proceder a trabajar con un determinado organismo.

Por otro lado, los residuales estudiados constituyen vertidos de procesos industriales o semindustriales donde, previo a su liberación, se realizan tratamientos térmicos como parte del proceso productivo ej. destilaciones, pasteurizaciones. Poseer cepas que crezcan a temperaturas por encima de los 30 °C posibilita reducir el tiempo para el tratamiento o evita establecer sistemas de enfriamientos para los mismos.

El microorganismo *Pleurotus sp.* CCEBI 3024 fue el de mejor comportamiento en su crecimiento frente a diluciones del 25 % de ELP y V (Fig. 5). A esta concentración los componentes de los residuales no resultan tóxicos para este basidiomiceto, porque su crecimiento resultó similar al obtenido en medio control (MSH); aún cuando tanto para ELP como V, se han encontrado componentes antifisiológicos e inhibitorios para el crecimiento de otros organismos (Scalbert, 1991; Kitts y col., 1993; Yesilada, 1999). Pero cuando se ensayaron diferentes concentraciones del residual (25%, 50%, 100%) durante el crecimiento de las cepas de mejor comportamiento (CCEBI 3024 y CCEBI 3022), se observa en los medios con vinaza una reducción de la velocidad de crecimiento específica (μ), la cual muestra una inhibición marcada para el 100 % (Tabla 5). Este comportamiento puede deberse al incremento de la presencia de compuestos recalcitrantes e inhibidores del crecimiento que pueden estar interfiriendo en el crecimiento del micelio y que llegan a este residual procedente de las mieles finales. Entre ellos pueden mencionarse el furfural, derivados premelanoidinos de intensa coloración y fenoles como el ácido

gálico y el vanilínico, los cuales están presentes en vinazas y son potenciales inhibidores de la actividad microbiana (GEPLACEA, 1990; FitzGibbon y col., 1995).

De igual forma, *Pleurotus sp.* CCEBI 3024 mostró mejores cualidades que la CCEBI 3022 para el crecimiento y decoloración del ELP en cultivo sumergido, corroborando el crecimiento obtenido en medio sólido (Tabla 5). Como resultado se obtuvo que esta cepa mostró una concentración de biomasa ($7,00 \pm 1,01$ g/L) y remoción del color ($53,3 \pm 1,5$ %), superior a los $5,50 \pm 0,84$ g/L y el $35,3 \pm 2,2$ %, obtenidos con la CCEBI 3022.

Pleurotus sp. es reconocido como un género de hongo ligninolítico buen productor de fenoloxidasas, del tipo lacasa (Martínez y col., 1994); lo cual quedó demostrado con la aparición de halos rojizos por la oxidación del guayacol, a partir del cuarto día de crecimiento, para todas las cepas probadas: CCEBI 3022, CCEBI 3023, CCEBI 3024, CCEBI 3027, CCEBI 3028 (Fig 6). La producción de cantidades detectables de modo cualitativo para este tiempo, sugiere que esta enzima se produce durante la trofofase del crecimiento, si tenemos en cuenta que para el cuarto día el microorganismo aún se encuentra en la fase lineal (Fig. 7). La *Pleurotus sp.* CCEBI 3024 resultó ser la cepa de mejor crecimiento en presencia de este compuesto fenólico.

Las especies del género *Pleurotus* están dentro de las más eficientes en la degradación de la lignina y ellas pertenecen a la subclase de organismos ligninolíticos que producen las enzimas Lac, MnP, MIP y la AAO como generadora de H_2O_2 , pero no LiP (Hatakka, 1994; Muñoz y col., 1997). En las condiciones que se evaluaron, donde no se suplementa con manganeso ni H_2O_2 en el medio MSH, ni se añaden sustratos naturales que puedan contenerlo; es probable que la oxidación del guayacol se deba, preferencialmente, a la actividad de la lacasa. Por lo que la realización de esta prueba cualitativa es indicativo de la excreción, en mayor o menor cuantía, de esta enzima. Aunque tampoco ha de excluirse la posibilidad de que sea mediada la oxidación del guayacol por la MIP.

Se soporta esta afirmación si se tiene en cuenta que el papel inicial para la accesibilidad a los sustratos dado a la lacasa, en estudios con basidiomicetos del grupo Lac-MnP (Leonowicz y col., 2001), se corroboró con la detección temprana de su actividad en cultivos sumergidos de esta cepa en medios sintéticos MSH (Fig 12A), PDY (Fig. 15A), medio Kirk (Mansur, 2003) y medios con los residuales (Fig 12B y Fig. 15B); donde estuvo presente desde el mismo inicio del crecimiento, en diversas condiciones de cultivo.

Se tienen antecedentes de la biodegradación por parte de basidiomicetos en cultivos líquidos, mediado por lacasas, de compuestos similares a los que se enfrenta en los residuales vinaza y el

residual de la pasteurización de la pulpa de café; como han sido las melanoidinas o polifenoles (Martirani y col., 1996; Dahiya y col., 2001).

Otros trabajos describen ensayos cualitativos usando guayacol, para la clasificación de distintos géneros de hongos como de *pudrición blanca* (Pinzón y Ruiz, 2004); por lo que los resultados obtenidos potencian la utilización de éstos para evaluar la capacidad ligninolítica de hongos de pudrición blanca que pertenecen al grupo Lac-MnP.

En 1983, Glenn y Gold sugirieron por primera vez, que los colorantes sintéticos o tintes podían aplicarse a la selección de cepas o especies con actividad ligninolítica particularmente fuerte y Fields y col. (1993), los utilizaron para evaluar la capacidad degradativa de hongos de pudrición blanca. Estos ensayos tienen la ventaja de que los sustratos empleados son fácilmente solubilizados, de bajo costo, escasa toxicidad y estables en ausencia del microorganismo. Pero no existe un consenso sobre qué colorantes podrían emplearse, pues difiere el comportamiento de los hongos ligninolíticos en dependencia de su género e incluso entre especies y cepas. No obstante, la aplicación de ensayos cualitativos con colorantes puede constituir una herramienta para la selección en poco pasos de organismos con potencialidades para la biodecoloración. Para ello se sugiere, la combinación de varios tipos de compuestos coloreados y no convertirlo en un criterio único, sobre todo cuando se extrapola a la posibilidad de decolorar efluentes industriales complejos en su composición o cuyo componente causante del color no sea el propio colorante ensayado.

La decoloración o no de determinados colorantes puede brindar indicios también sobre las posibles enzimas ligninolíticas extracelulares presentes durante el crecimiento del microorganismo, aunque de ningún modo este constituye un criterio conclusivo.

El microorganismo de mejor desempeño durante estos ensayos cualitativos, *Pleurotus sp.* CCEBI 3024, creció y decoloró el rojo fenol y el azul de anilina; sugiriendo que la enzima lacasa es producida desde estadios tempranos del crecimiento por este hongo y que participa, preferencialmente, en la decoloración de estos colorantes. No decoloró el bromofenol azul, ni el RBBR.

En el medio con rojo fenol se mostró toxicidad para el crecimiento de las cepas de *P. ostreatus* (Fig.9), lo cual puede ser el resultado del incremento de los grupos fenólicos de la estructura (Fig. 4). Similar comportamiento frente al rojo fenol se observó en los trabajos de Eichlerová y col. (2002).

La temprana aparición de cambios de color en el medio con rojo fenol (48 horas), sugieren la relación de estos procesos con la excreción de lacasa, que como se ha reportado no requiere de

condiciones limitantes de nutrientes y se produce en esta especie de hongos de forma constitutiva, aunque sean en pequeñas cantidades (Leonowicz y col., 2001; Rodríguez y col., 2003).

Mansur (1996) utilizó el rojo fenol para la detección de peroxidasas, en presencia de H_2O_2 , en cultivos sumergidos de *Pleurotus sp.* CCEBI 3024 (identificada como V-184) y otras cepas de basidiomiceto; no mostrando coloración rojiza (indicio de oxidación del sustrato) para este microorganismo, tanto en un medio completo, como basal. Se atribuyó en esta prueba la oxidación del rojo fenol a la producción de MnP, en los microorganismos declarados como positivos. En ese trabajo se describió la presencia en los cultivos sólo de las enzimas lacasa y aril alcohol oxidasa, para esta cepa (CCEBI 3024).

Se conoce que en los mecanismos ligninolíticos de *Pleurotus*, la enzima lacasa juega un papel importante en la biodegradación de compuestos fenólicos y aminas aromáticas. Aunque Ferraro (2004) refiere que la oxidación y degradación de un colorante depende del tipo de isoenzima de lacasa y del potencial de oxidación que esta exhibe frente a un sustrato específico y que algunas isoenzimas, no manifiestan capacidad para decolorar el rojo fenol si no es en presencia de un mediador, como es el caso de la POXC, la isoenzima. mayoritaria en cultivos de *P. ostreatus* descritos por Palmieri y col. (2000). Muñoz y col. (1997) trabajando con *P. eryngii* describieron tres formas isoenzimáticas de lacasa (0, I y II) donde Lac I mostró mayor potencial redox, evidenciado por su habilidad de oxidar el rojo fenol.

El rojo fenol (modelo de derivado fenólico de lignina) ha sido reconocido como un sustrato de difícil oxidación por la lacasas, pero muy accesible en presencia de mediadores redox de pequeño tamaño molecular como el HBT (empleado como modelo de mediador en la oxidación de derivados lignínicos no fenólicos) provocando su oxidación y ataque del anillo fenólico (Fabbrini y col., 2002).

Es notable el hecho de que *Pleurotus sp.* propicie la oxidación fundamentalmente en la zona más externa de crecimiento micelial, donde existe micelio fresco y por tanto probablemente producción de lacasa (ver ensayo con guayacol) y al sexto día es que se produjo decoloración en la zona alrededor del punto de inoculación, donde probablemente luego del agotamiento de los nutrientes, se excretan por este hongo metabolitos que sirven como intermediarios naturales para las fenoloxidasas, resultado del metabolismo secundario, como el HBT o ácido antranílico (Eggert y col., 1996). Puede contribuir igualmente a la decoloración del medio con rojo fenol, la excreción para este tiempo de la enzima MnP, la cual requiere de la producción de peróxido de hidrógeno como cofactor para su accionar sobre compuestos fenólicos (Wesenberg y col., 2003).

Otra enzima que podría estar presente en estos ensayos es la MIP, pues para actuar no requiere de Mn^{2+} y puede oxidar compuestos fenólicos y no fenólicos, entre estos últimos aromáticos como el alcohol veratrílico; por lo que se considera un híbrido entre la LiP y la MnP. Esta enzima ha sido descrita en medios con peptona (ver composición de MSH) y sólo ha sido aislada, hasta el momento, en cultivos de *Pleurotus sp.* y de *Bjerkandera sp.* (Mester y Field, 1998; Camarero y col., 1999).

La rápida coloración rojiza que adopta el cultivo de *P. chrysosporium* en medio con rojo fenol quizás se deba a que este organismo mostró una velocidad de crecimiento muy superior a *Pleurotus sp.* (cubrimiento total de la placa en cinco días), propiciando que en la zona de crecimiento se agotaran con mayor prontitud los nutrimentos y se logaran condiciones apropiadas (para siete días) para la excreción de peroxidasas como la LiP; enzima característica y de mayor excreción en este hongo (Kirk, 1987; Hatakka, 1994), la que puede oxidar este sustrato pero es incapaz de degradarlo.

En el caso de la anilina, también su decoloración se relaciona preferentemente con la actividad de la lacasa (Fig. 8), pues esta enzima es la que tiene capacidad para degradar aminas aromáticas. Aunque en la estructura de este colorante, el enlace amino o amida presenta en su proximidad otros grupos funcionales cargados o estructuras aromáticas, (Fig. 4) que reducen la efectividad del ataque por la fenoloxidasa lacasa.

El bromofenol azul es un colorante trifenilmetano (Fig. 4) que resultó refractario al ataque del sistema enzimático ligninolítico característico de este basidiomiceto, constituido básicamente por lacasa-MnP, bajo estas condiciones de estudio. Se puede pensar que para siete días de crecimiento en placa, aún no se excretan al medio las enzimas capaces de degradar esta estructura compleja; probablemente enzimas del tipo peroxidasas que se han reportado como degradadoras de este colorante (Ollikka y col., 1993) y que por lo general, son excretadas en estadios avanzados del crecimiento (idiofase), cuando existe agotamiento de la fuente carbonada (Heifling y col., 1998).

Para el caso de la lacasa, la posibilidad de degradar este colorante está bastante restringida. Se ha descrito por algunos autores (Herrera y col., 1997; Rodríguez y col., 1999) que un número mayor de sustituyentes en el anillo fenólico tiene un efecto negativo en la remoción del color; pero que además, en sustratos pequeños la contribución electrónica de sustituyentes en el anillo aromático, es más importante que el efecto estérico. Los sustituyentes donores de electrones metilo, metoxi, amino e hidroxilo, incrementan la actividad lacasa; mientras que el cloro, el flúor, el bromo y los sustituyentes nitros inhiben la oxidación de los fenoles sustituidos por la lacasa (Xu, 1996).

El RBBR es un colorante del tipo poli-antraquinona, derivado del antraceno el cual se relaciona con la capacidad decoloradora mediada por enzimas ligninolíticas fundamentalmente del tipo peroxidasas (Boer y col., 2004). Incluso, recientemente se logró identificar y purificar en *Pleurotus ostreatus* una peroxidasa con alta afinidad en la decoloración de este compuesto y a trifenilmetano, a la que se ha dado en llamar DyP (Shin y col., 1997). Esta enzima ha sido detectada también en *Irpex lacteus* y *Lentinus edode*, ambos produciendo decoloración del RBBR, en medio agarizado y líquido (Kasinath y col., 2003; Boer y col., 2004).

En trabajos realizados por Novotny y col. (2001) con diferentes especies de *Pleurotus* se ha descrito que la decoloración del RBBR en medio agar requiere de 10 a 20 días, por lo que puede ser la causa del resultado negativo en nuestro experimento. En ese mismo trabajo se relaciona la decoloración de este colorante con la DyP y se plantea que la síntesis de esta enzima peroxidasa fue estimulada por muchos colorantes, donde la mayor estimulación fue observada en presencia de bromofenol azul; observándose coincidencia en la decoloración de este colorante y el RBBR. Palmieri y col. (2005) describieron la decoloración del RBBR en medio sólido, sólo en ocho días, pero en medio con adición de alcohol veratrílico.

De los análisis y experiencias arriba desarrollados, se tiene que *Pleurotus* sp. CCEBI 3024 (híbrido de *P. ostreatus* x *P. ostreatus*) (Mansur, 1999; Verdecia, 2000), constituye un buen candidato para evaluar su capacidad de decolorar los residuales ELP y V, partiendo de su posibilidad de crecer sobre ellos y las potencialidades ligninolíticas mostradas durante los ensayos cualitativos en placas; por lo que se continuó trabajando con esta cepa.

Este microorganismo fue donado gentilmente por la Dra. Isis Gutiérrez (ICIDCA) a nuestra Colección de Cultivo y se ha empleado en nuestro país en la obtención de setas comestibles para el aprovechamiento de residuales cañeros, de café y cacao (Ortega, 1999; García, 1999; Verdecia, 2000; Bermúdez y col., 2001); así como, la decoloración de efluentes industriales relacionados con estas agroindustrias (Fernández, 2001; Rodríguez y col., 2003).

Se conoce que las condiciones sobre las que crecen los hongos ligninolíticos influyen en el patrón de excreción de enzimas y por tanto, en la forma y los niveles de decoloración. Stajic y col. (2004) realizando un estudio sobre la producción de enzimas ligninolíticas en más de 25 cepas de diferentes especies de *Pleurotus*, constató que existían diferencias en la producción de estas enzimas extracelulares entre especies e incluso, entre cepas de una misma especie; además de que las condiciones de cultivo, las cuales están caracterizadas por diferentes parámetros físico-químicos, influyen en los niveles de actividad de Lac, MnP y MIP.

Por todo lo antes expuesto, se hace necesario el estudio de las condiciones particulares que requiere la cepa seleccionada para lograr la reducción del color y otros parámetros de contaminación.

IV.3. Condiciones de cultivo para favorecer la decoloración de ELP y vinaza por *Pleurotus sp.* CCEBI 3024.

Por primera vez se estudia el uso de un hongo de pudrición blanca para el tratamiento de un residual líquido cafetalero, partiendo de la versatilidad de estos organismos de degradar compuestos modelos similares a los que le confieren color al residual de la pasteurización de la pulpa de café (Yague y col., 2000; Carbajo y col., 2002; Fountoulajkis y col., 2002).

Por su parte, la vinaza ha sido objeto de investigación para reducir su impacto en el medio ambiente como consecuencia de su elevado color y DQO, empleando varios géneros de hongos, pero no se encuentran referencias hasta la fecha del empleo de *Pleurotus sp.* con tales fines (Tabla 1 y 2).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se comenzó a evaluar algunas de las condiciones de cultivo requeridas para lograr la decoloración más eficiente del residual de la pasteurización de la pulpa de café (ELP) y la vinaza de destilería (V).

La glucosa es conocida como la mejor fuente de carbono usada en los procesos de fermentación, pero muchas veces puede ser sustituida por otras, que por su accesibilidad y menor costo resultan más económicas. Se describe que *Pleurotus* puede utilizar como fuentes carbonadas sacarosa, manosa, maltosa, fructosa, pectina, lignina, celulosa y almidón para su crecimiento micelial (Gastón, 1993). Además, ha sido descrito en otro trabajo el empleo del glicerol para el crecimiento micelial y para la conservación de éste y otros hongos de pudrición blanca (Leatham, 1992).

No existieron diferencias en la remoción del color alcanzado cuando se utiliza como fuente de carbono la glucosa, la sacarosa o el glicerol; aunque lo mismo no puede decirse para el crecimiento, cuyos mejores valores fueron obtenidos con glucosa (Tabla 6). La decoloración de vinaza por *Phanerochaete chrysosporium* JAG-40 mostró mejores resultados cuando se utilizó glucosa o glicerol, según refieren Dahiya y col. (2001). Para este basidiomiceto y para *P. ostreatus*, igual influencia se observó durante la decoloración del residual del procesamiento del aceite de olivo, rico en polifenoles (Kissi y col., 2001; Fountoulajkis y col., 2002).

Al analizar la Tabla 7 se aprecia que el incremento de la concentración de glucosa favorece la decoloración, aún cuando la actividad enzimática (lacasa) se mantiene en valores muy similares.

Según Pellinen y col. (1988) cuando la glucosa es usada como sustrato para el crecimiento, una concentración mínima de 2 g/L es necesaria para mantener la habilidad del micelio para decolorar, la que se incrementa con el aumento de la concentración de glucosa. Otros autores han reconocido que cantidades críticas de glucosas son necesarias para continuar la decoloración, las que se describen entre 1-5 g/L (Zhang y col., 1999).

Por otro lado, la sola adición de glucosa a los medios favorece la decoloración de ambos residuales (Tablas 8 y 9), lo que sugiere la participación de algún mecanismo dependiente de la presencia de ésta.

Cabe recordar que hasta finales de los años 80, el papel fundamental en la degradación de estructuras coloreadas como las melanoidinas y el ácido húmico, se atribuyó a enzimas intracelulares o extracelulares del tipo azúcar-oxidasa como la sorbosa-oxidasa y la glucosa-oxidasa, respectivamente (Watanabe, 1982; Ohmomo y col., 1985). Se reconoce que éstas participan principalmente en las rutas catabólicas de celulosa y hemicelulosa, pero no pueden atacar directamente la estructura polimérica de la lignina y por tanto, la de compuestos similares estructuralmente (Leonowicz y col., 1999).

Fueron Haider y Martin (1988) y Blondeau (1989) los primeros autores que propusieron la participación del sistema enzimático ligninolítico en la degradación de ácidos húmicos y melanoidinas sintéticas. En 1992, Dehorter y Blondeau, sugirieron por primera vez la participación de la lacasa en la degradación de estos compuestos coloreados, componentes fundamentales que confieren el color a las vinazas o están relacionadas estructuralmente. En cuanto al ELP, no existen referencias de estudios de la decoloración de residuales cafetaleros con hongos ligninolíticos. No obstante, es frecuente la inducción y participación de la lacasa en la decoloración de residuales con alto contenido de taninos y otros polifenoles (Zapico, 1999; Yague y col., 2000) corroborando la participación de enzimas ligninolíticas en su biodegradación. La actividad lacasa ha sido monitoreada en la decoloración de melazas, colorantes sintéticos y residuales químicos y se ha descrito un efecto positivo del incremento de la concentración de la fuente de carbono, en la secreción de estas enzimas; utilizando los hongos *P. chrysosporium* o *Trametes sp.* (Knapp y Newby, 1999; Dahiya y col., 2001). En este trabajo no se encontraron diferencias en la actividad Lac detectada a diferentes concentraciones de glucosa ($F = 0,6396$ del ANOVA) (Tabla 7).

Este comportamiento se justifica si consideramos el hecho de que la provisión de fuente de carbono o energía de estos hongos ligninolíticos en condiciones naturales, está determinada por la degradación de otros polisacáridos como celulosa y hemicelulosa y la accesibilidad, depende del

ataque a barreras naturales como la lignina. La incorporación de la glucosa u otros sacáridos metabolizables a las rutas bioquímicas centrales, resultado de la liberación en otros procesos degradativos, podría tener como función desencadenar la producción extracelular de la enzima ligninolítica (en este caso lacasa) y no así, regular sus cantidades. Por lo que se requeriría solo una concentración mínima de glucosa (señal) para propiciar la excreción de estas enzimas y el ataque de compuestos más recalcitrantes como la lignina. Esto se refleja en la utilización de la glucosa como cometabolito para la degradación ligninolítica y no como fuente de carbono primaria (Kirk, 1987; Aust y Benson, 1993). Incluso, se nota una tendencia al decremento de las actividades enzimáticas lacasa en el ELP (residual más pobre en nutrientes, ver Tabla 4) que no llega a ser significativa, cuando existe un incremento de la glucosa por encima de 5g/L; pero este comportamiento no es general para ambos residuales, empleando la misma cepa.

Quizás en esto radica la diferencia entre algunos hongos ligninolíticos como *P. chrysosporium* reconocido como un degradador eficiente de lignina y *P. ostreatus*, clasificado como un hongo ligninolítico selectivo, pues provoca escasa remoción de la celulosa y la hemicelulosa en su ataque a la madera (Martínez y col., 1994; Kerem y Hadar, 1998).

Lo más probable es que para el ataque de los compuestos coloreados de los residuales que se estudian, exista una acción cooperada entre la lacasa y la glucosa oxidasa, haciendo más efectiva la acción degradadora del hongo. Esta cooperación ha sido postulada para la degradación de la lignina, pues en trabajos realizados por Leonowickz y col. (1999a) comprobaron que muchos de los géneros de hongos basidiomicetos de pudrición blanca ricos en actividad glucosa-1-oxidasa, eran eficientes degradadores de la lignina y buenos productores de lacasa extracelular; mientras que los que presentaban pobre actividad glucosa-1-oxidasa, no manifestaban actividad ligninolítica, ni actividad lacasa.

Se ha planteado que la presencia de la glucosa oxidasa reduce los niveles de polimerización de quinonas intermediarias, producto fundamental de la acción de la lacasa sobre compuestos fenólicos; pues el aceptor de hidrógeno en la oxidación de la glucosa por esta enzima son las propias quinonas u otros radicales catiónicos, no el oxígeno molecular (Leonowicz y col., 2001). Esto favorece la degradación de estructuras fenólicas y la ocurrencia de la ligninólisis. Mecanismo similar puede estar presente durante la remoción del color de los residuales, reflejándose en una reducción de este parámetro.

Por otro lado, en presencia de glucosa hay producción de peróxido por la glucosa-1-oxidasa, favoreciendo el accionar de enzimas dependientes de peróxido durante la fase de crecimiento

donde se verifica el consumo de esta azúcar (Leonowicz y col., 1997, 1999a). De ahí la relación que existe entre la suplementación con glucosa y la decoloración por este tipo de hongo.

La glucosa oxidasa es producida en medios ricos en glucosa, posiblemente junto con la AAO, a diferencia de la enzima oxidante de celobiosa (celobiosa deshidrogenasa) que es principalmente producida en la degradación de sustratos celulósicos o madera; aunque no se han realizado suficientes comparaciones entre diferentes hongos ligninolíticos. Esto refuerza la idea de que los hongos de pudrición blanca utilizan mecanismos enzimáticos diferentes para la reducción de radicales y quinonas, dependiendo de las condiciones de cultivo (Ander y Marzullo, 1997)

Aunque no existe una correlación entre el incremento de la concentración de glucosa y la actividad Lac, como se había descrito anteriormente (Tabla 7), no puede obviarse el hecho que durante toda la cinética de decoloración de los residuales se detectó la presencia de la misma, la cual se incrementa concomitante con el avance de la decoloración de los medios. Además, ésta resultó la enzima más correlacionada con la decoloración en ambos casos ($r = 0,97$ para el ELP y $r = 0,94$ para la V) (Fig. 11 y Fig. 15) y por otro lado, se obtuvo decoloración de la vinaza empleando enzima lacasa purificada (Fig. 21 y 22). Por lo que el efecto del parámetro medido (concentración de glucosa) al parecer regula el accionar de la enzima azúcar oxidasa (probablemente glucosa oxidasa) y ésta a su vez, el consumo de quinonas; lo que reduce la actividad polimerizante de la Lac y favorece la degradativa, incidiendo en que se manifieste una mayor decoloración de los residuales.

La disminución de los parámetros de contaminación del residual, está asociado al incremento de la biomasa por lo que se necesita de un crecimiento apropiado del hongo para la descontaminación.

Este basidiomiceto es capaz de usar algunos componentes del residual ELP para crecer y para activar su mecanismo enzimático para la degradación del mismo, mostrando decoloración (Tabla 8). Además, se obtuvo un mayor crecimiento en el medio con ELP con respecto al sintético (Fig. 12), brindando la posibilidad de obtener una buena cantidad de biomasa durante su crecimiento en el mismo. Se puede, por tanto, utilizar el propio residual para la obtención de inóculos líquidos en el cultivo de setas comestibles; biotécnica que ofrece numerosas ventajas, comparadas con la tradicional obtención de inóculos en medio sólido (sorgo, trigo) (Guillén y col., 1998; Rodríguez y col. 2003).

Comparando los dos medios controles usados (MBH y MSH), en el medio basal en específico las cantidades descritas propiciaron condiciones restrictivas de nitrógeno, lo cual ha sido reportado ser excelente para activar las enzimas del tipo peroxidasa (Shüitzendüel y Majancherczk, 1999)

pero no favorece la producción de enzima lacasa (Tabla 8). Esto redundaría en la afectación marcada de la remoción del color y la carga orgánica (DQO), lo que sugiere que aún cuando puede que ésta no sea la única enzima participante en el proceso de decoloración, es necesaria para que ocurra de manera eficiente; por lo que afectaciones sensibles de esta actividad, se reflejarán en la capacidad decoloradora del micelio del hongo.

Las especies de basidiomicetos que han sido utilizados para el tratamiento de residuales industriales pueden dividirse en dos grandes grupos: los hongos capaces de decolorar bajo condiciones nutritivas amplias (ej. *Irpeux lacteus*, *Bjerkandera adusta*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Pycnoporus pseudopunctatus*) y los que tienen requerimientos específicos (ej. *Phanerochaete chrysosporium*, *C. metamorphosa*, *Dichomitus confragosa*, *Mycelia. nothofagi*, *Stropharia rugosum*) (Kirk, 1987; Coulibaly y col., 2003).

Se recomienda tener en cuenta no sólo las cantidades de nutrimentos, sino también su naturaleza (sales inorgánicas u orgánicas, aminoácidos, hidrolizados de compuestos naturales, etc.); pues la adición de la peptona como nitrógeno orgánico en el MSH, pudo ser la causa del incremento de la actividad extracelular de Lac (Tabla 8). En otros trabajos de decoloración de aguas residuales, el uso de peptona se traduce en una mayor decoloración con respecto a fuentes inorgánicas y aminoácidos (Dahiya y col., 2001), aunque la asparagina como fuente nitrogenada se ha descrito tener un efecto positivo para el crecimiento (Martínez-Carrera, 2000).

La adición del residual de la pasteurización de la pulpa de café incrementó los valores de actividad Lac al menos cinco veces, comparado con el medio sintético, pudiendo actuar como inductor natural; como se ha visto con otros residuales de composición similar (Fountoulakis y col., 2002) (Tabla 8, Fig. 12). Pero los mayores valores de esta actividad enzimática se lograron con la adición de vinaza, donde resultaron alrededor de 10 veces superiores a las detectadas en medio sintético (Fig. 15).

Las lacasas extracelulares pueden ser producidas constitutivamente en pequeñas cantidades; sin embargo, la producción puede ser incrementada considerablemente por una amplia variedad de sustancias, principalmente compuestos aromáticos o fenólicos relacionados con la lignina o derivados de ella, tales como: ácido ferúlico, 2,5-xilidina, *p*-anisidina o alcohol veratrílico (Leonowicz y col., 2001; González, 2001; Marques de Souza y col., 2004). En la caracterización de ambos residuales (Tabla 4) se cuantificaron cantidades apreciables de polifenoles.

Carbajo y col. (2002) describieron que el ácido tánico, considerado el principal y más abundante tanino presente en la naturaleza y en residuales provenientes del procesamiento de materiales agrícolas, induce la actividad lacasa en *Coriolopsis gallica* debido al incremento de la expresión

de los genes de esta enzima, a nivel transcripcional. EL ELP presenta entre sus principales componentes fenólicos los taninos, moléculas poliméricas que contribuyen al color (López y col., 1995).

La explicación de la inducción de la actividad Lac por la vinaza, puede abarcar aspectos genéticos como el efecto sobre la expresión de los genes *lcc 1* y *lcc 2*; aspectos fisiológicos, como la mayor estabilización de las enzimas o la excreción de las enzimas presentes en las hifas; o la relación entre componentes de menor peso molecular liberados en la degradación de las melanoidinas y la enzima (liberación de cobre quelado, interacción con moléculas aromáticas), todos ellos explicados por González (2001).

Esta capacidad del ELP y la V de inducir la lacasa podría ser aprovechada en función de utilizarlos como medios no convencionales y más baratos, pues constituyen residuales, para la obtención de esta enzima con numerosas aplicaciones (Mayer, 2002; Ikehata, 2004).

Como se hizo alusión anteriormente, varios compuestos químicos inducen la lacasa, donde el cobre ha sido descrito como uno de los más efectivos para *P. ostreatus* y más accesible por sus costos (Palmieri y col., 2000 y 2003).

Al añadir sulfato de cobre a 150 $\mu\text{mol/L}$ en los medios con residuales, sólo la actividad lacasa en ELP resultó inducida, pues aumentó casi el doble su valor resultando en un incremento significativo de la remoción del color. Se alcanzaron valores de Lac de $4,7 \pm 0,9$ U/mL y de remoción del color de $57,1 \pm 2,3$ % para el control MSH:ELP (1:1); comparado con $8,51 \pm 0,32$ U/mL y $71,0 \pm 1,4$ %, para el medio suplementado con cobre. Esto evidencia que la lacasa participa en este proceso decolorativo.

La vinaza presenta cantidades apreciables de Cu^{2+} (887 mmol/L) (Tabla 4) que provoca inducción ‘*per se*’ de la Lac en estos medios, como se ha expuesto anteriormente, por lo que no manifiesta ningún incremento en la actividad de esta enzima la adición de mayores cantidades de este ión metálico (Tabla 9). Existe coincidencia entre los resultados obtenidos y los descritos en trabajos realizados por Palmieri y col. (2000), donde la adición de cobre no afecta de modo significativo el crecimiento del hongo, pues la biomasa obtenida fue similar en ambos tratamientos.

Como se aprecia en la Tabla 10, la agitación del cultivo favoreció el biotratamiento de los dos residuales, lo que puede ser atribuido al incremento del oxígeno disuelto y accesibilidad de las enzimas extracelulares y mediadores, a los compuestos coloreados (sustratos); pues se mantiene la misma relación entre los volúmenes de medio y del recipiente. También es válido que con un

incremento de oxígeno, se incrementa la biomasa para este organismo aerobio y como ya se había explicado anteriormente, la decoloración se incrementa con incrementos de biomasa.

Igual comportamiento con respecto a la agitación fue observado por Yesilada y col. (1998, 2003) en la decoloración del residual de aceite de olivo y en la decoloración de colorantes textiles. En esos trabajos los mejores valores se obtuvieron para una agitación de 120-160 min⁻¹, rango que abarca el valor de 120 min⁻¹ que es el que se empleó en los experimentos. Como era de esperar, se obtuvo mayor biomasa en el cultivo agitado pues favorece la disponibilidad de nutrimentos, el intercambio de metabolitos entre las hifas y el medio extracelular y la difusión del oxígeno a todo el cultivo.

Es conocido que son preferidos bajos pH para la producción de enzimas ligninolíticas y para la decoloración de residuales por éstas (Kirk, 1987; Kissi y col., 2001). Sin embargo, en medios con vinaza sin regulación de pH se demostró que un valor bajo de este parámetro (pH 4,5) afectó negativamente la producción de lacasa activa y la remoción del color con *Pleurotus sp.* CCEBI 3024, como se observa en la Fig. 10. Similares resultados obtuvieron Mansur y col. (2003) trabajando con la misma cepa en medio basal líquido, constatando que la actividad Lac estuvo relacionada con los valores de pH del medio de cultivo utilizado; de modo que a pH 4,5 fue baja y se incrementó a pH 6,5. Este comportamiento puede ser el resultado de la susceptibilidad de sus enzimas extracelulares a proteasas acídicas o a otras regulaciones mediadas por proteasas.

La regulación de las actividades de las enzimas ligninolíticas mediada por proteasas ha sido observado en varios hongos de pudrición blanca (Leonowicz y col., 2001). Para LiP de *P. chrysosporium*, las proteasas extracelulares causan una completa desaparición de la actividad debido a la degradación de todas las isoenzimas de lignina peroxidasa (Dass y col., 1995). Recientes reportes sugieren que tanto proteasas extracelulares, como intracelulares, están implicadas en la regulación de la actividad ligninolítica de *Trametes versicolor* bajo limitaciones de nutrimentos (Staszczak y col., 2000). Palmieri y col. (2001) hipotetizaron y demostraron el papel regulador que puede desempeñar una serín-proteasa extracelular sobre la actividad lacasa en *P. ostreatus*.

Por otro lado, el género *Pleurotus* tiene valores óptimos de pH para el crecimiento entre 6-7, por lo que la reducción de este parámetro implicaría afectaciones en sus procesos fisiológicos, incidiendo en su capacidad de transformar las sustancias poliméricas causantes del color. Anteriormente se había expuesto que la decoloración por este hongo CCEBI 3024 está relacionada con la obtención de cantidades apropiadas de micelio, por lo que cualquier afectación en el crecimiento redundaría de modo negativo en este proceso.

IV.4. Decoloración y biotratamiento del residual de la pasteurización de la pulpa de café (ELP).

Como resultado del biotratamiento del ELP con el hongo ligninolítico *Pleurotus sp.* CCEBI 3024 se logran mejorar las características de impacto de este residual, al reducir el color y la DQO en más del 70 % y los polifenoles, en más del 90 %. De igual forma se lograron valores de pH cercanos al neutro, exactamente a $7,3 \pm 0,2$, al final de la experiencia (Fig. 11). La remoción de la DQO alcanzó valores similares a los reportados por otros autores usando otros tratamientos para residuales con alto contenido de polifenoles u otros hongos de pudrición blanca (Maestro y col., 1991; Aust y Benson, 1993; Yesilada y col., 1998). Bello y Sánchez (1997) alcanzaron el 80 % de la remoción de la DQO en la digestión anaerobia de esta agua residual de la planta de setas cultivadas sobre pulpa de café.

Existe escasa información sobre la remoción del color en este residual.

Tratando de elucidar la participación de las enzimas ligninolíticas en estos procesos, es que se analizó la cinética de la biodecoloración del ELP.

Las enzimas ligninolíticas extracelulares que participaron en la degradación de los compuestos coloreados de este residual son la Lac y la MIP, pues fueron las únicas detectadas (Fig. 12). La reducción de sus actividades en la fase tardía del crecimiento lineal, implica una reducción de la capacidad de biotratar el ELP por *Pleurotus sp.* CCEBI en la idiofase.

Ninguna de las dos requiere del agotamiento de los nutrimentos para manifestarse (Fig. 12A); 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 sus enzimas ligninolíticas no es inhibida por altas concentraciones de nitrógeno (Martínez y col., 1994; Rodríguez y col., 2003).

Altos niveles de esta nueva peroxidasa (MIP), no descrita antes en la decoloración de la vinaza por hongos de pudrición blanca, son producidos por especies de *Pleurotus* en medios ricos en nitrógeno conteniendo específicamente peptona (Mester y Field, 1998). Por lo que la utilización del MSH favorece la aparición de esta enzima y probablemente, el incremento de la remoción de color (Tabla 8).

La Lac constituye la enzima fundamental para la biodegradación de este residuo líquido con gran color por su elevada correlación con la decoloración durante todo el crecimiento ($r = 0,97$); pero la presencia de la enzima dependiente de peróxido MIP propicia la degradación de compuestos fenólicos y no fenólicos, resultando más efectivo el ataque de las enzimas ligninolíticas a los

compuestos poliméricos y más recalcitrantes del residual (ácido clorogénico, taninos, pectinas). De ahí la similitud en los valores obtenidos de remoción del color y de la DQO (Fig. 12B).

En otros trabajos realizados sobre decoloración de tintes, se plantea que existe cierta correlación entre la excreción de lacasa por *Pleurotus* y la decoloración de estos residuales (D'Annibale y col., 1998; Dias y col. 2004). Ésta ha sido reconocida como la principal enzima involucrada en la decoloración del agua residual de la producción de aceite oliva con *P. ostreatus* (Kissi y col., 2001).

La enzima Lac está relacionada con el crecimiento, alcanzando su máximo ($8,53 \pm 0,73$ U/mL) en la fase tardía del crecimiento lineal donde la concentración de glucosa es de alrededor de 5 g/L (Fig. 12). La acumulación de subproductos del metabolismo del hongo o la acumulación de proteasas presentes en el medio de cultivo, podrían inhibir las producciones de Lac durante la fase estacionaria causando la reducción de la actividad a menos de la mitad ($3,58 \pm 0,34$). 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 (Guillén y col., 1998; Fernández, 2001).

Se ha identificado una proteasa extracelular en cultivos de *Pleurotus ostreatus* por Palmieri y col. (2001), la cual tiene un papel fundamental en la regulación de la actividad lacasa de este organismo. Esta enzima tiene valores de pH óptimos para su acción de 6-9. El biotratamiento del residual se desarrolla completamente dentro de este rango de pH, por lo que brinda condiciones propicias para establecer un mecanismo de regulación mediado por esta proteasa, entre uno de los posibles mecanismos existentes.

La proteasa PoSI (serín-proteasa de *P. ostreatus*), como se ha dado en llamar, regula la actividad de diferentes isoenzimas, incluso a nivel génico. Se le atribuye la degradación de POX1b, la activación de la POXA3 y la POXC no muestra afectación; por lo que su presencia cambia la proporción isoenzimática de lacasas en el cultivo. Esta variación en la composición de isoenzimas podría afectar de igual modo la afinidad por determinados compuestos (sustratos)..

Retomando el trabajo de Mansur y col. (2003), en medio Kirk a pH 6,5 se observa un incremento de la actividad Lac (detectada con guayacol) hasta alcanzar un máximo de 2,4 U/mL al 14 día. De igual forma en MSH (este trabajo) se alcanzó un máximo de 1 U/mL para igual tiempo, en igualdad de pH. En los zimogramas se detectaron cuatro isoenzimas de lacasa, donde las mayoritarias para sus condiciones LC1 y LC2 mostraban mayor afinidad por el guayacol que LC3 y LC4 (Mansur y col., 2003). Las correspondientes a LC1 y LC2 fueron las bandas más

ácidas y por tanto, de mayor corrida en electroforesis (gel al 12 %, condiciones alcalinas). LC3 y LC4 sólo se detectaron cuando se reveló con ABTS.

Hay que tener en cuenta que el guayacol es un compuesto modelo de derivado lignínico fenólico susceptible al ataque de la lacasa, vía formación de quinonas. Mientras que el ABTS es un sustrato artificial de la Lac, pues no constituye un derivado fenólico, cuyo ataque por esta enzima es vía formación de radicales (Wolfenden y Willson, 1982).

Por otro lado, el guayacol fue el sustrato con el que se evaluó la actividad lacasa en medios con ELP. Resulta interesante el hecho de que la Lac reconocida al final del biotratamiento del ELP, presentó como característica un valor de K_m aparente ($4,85 \pm 0,08$ mmol/L) frente al guayacol similar al de POXA3 de *P. ostreatus* ($3,1 \pm 0,6$ mmol/L) (Fig.13). La isoenzima POXA3 es capaz de oxidar ABTS, dimetoxifenol, siringaldazina, rojo fenol, pero no se detecta actividad significativa frente al guayacol; por ser menos afin a este sustrato que la isoenzima POXC (Palmieri y col., 2003; Ferraro, 2004), identificada como la lacasa más ácida en las corridas electroforéticas en condiciones básicas (probablemente la LC2, en los trabajos de Mansur y col., 2003). Para POXC se han descrito valores de K_m frente al guayacol de 0,65 mmol/L (Palmieri y col., 2003) y Marques de Souza y col. (2003) en cultivos de *P. pulmonarius* en medio sólido conformado por salvado de trigo, determinó la presencia de dos isoformas de lacasa, la Lcc1 y Lcc2; donde la mayoritaria bajo estas condiciones (Lcc2 relacionada con POXC por su elución cromatográfica y características bioquímicas) presenta una K_m para guayacol a pH 6 de 0,55 mmol/L.

La fenol oxidasa C (POXC) es la más abundante isoenzima de *P. ostreatus* y se detecta en todas las condiciones de cultivos evaluadas y a todos los tiempos, siendo muy estable a las variaciones de temperatura y a la presencia de agentes desnaturalizantes (Palmieri y col., 2000). La POXA3 es producida en medio suplementados con cobre a partir del 4to día y es activada por proteasas fúngicas extracelulares como PoS1 (Palmieri y col., 2003).

Podría ser la variación en la proporción de isoenzimas un mecanismo biológico de regulación de *Pleurotus sp.* CCEBI 3024 para continuar biodegradando los compuestos más recalcitrantes del ELP. Esto sugiere que el incremento del protagonismo de una isoenzima diferente a la predominante en medio sin residual o a inicios del cultivo, es lo que determinó la reducción de la actividad (usando guayacol como sustrato) que se observa en la Fig. 12 para los tiempos finales.

Se observa en todo momento mayor actividad lacasa que peroxidasa (MIP), 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

peróxido como cofactor; lo que presupone la participación de otras enzimas auxiliares (Leonowicz y col., 1997). Dentro de estas se reportan las glucosa oxidasas, glioxal oxidasas y superóxido dismutasas para la producción extra e intracelular de H_2O_2 y la aril-alcohol oxidasa (AAO), para la producción extracelular.

Por otro lado, se ha planteado que la producción de peroxidasas por 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 (Wesenberg y col., 2003). Lo que podría explicar el hecho de la reducción significativa de manganeso peroxidasa (MIP) en este trabajo a medida que avanza la fermentación (Fig. 12). Otro posible mecanismo regulador es la disminución del peróxido de hidrógeno producido por la glucosa oxidasa y necesario para la MIP, debido al agotamiento de la glucosa, mecanismo discutido anteriormente.

Rodríguez y col. (2004), trabajando con *Pleurotus pulmonarius* para la degradación de 2,4 diclorofenilos en medio sintético líquido, observó que la MIP desaparece después de 4 días de incubación debido a los altos niveles de la enzima aril alcohol oxidasa (AAO) producido por este hongo. En fermentación en estado sólido por *Pleurotus. eryngii*, *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus sajor- caju*, Bezalel y col. (1996) detectaron las máximas actividades de lacasa y MIP durante la primera semana de incubación y no fue detectada AAO. Se ha probado que la excreción de AAO por *P. pulmonarius* coincide con un incremento de H_2O_2 e inactivación de la MIP (Bockle y col., 1999). En los tratamientos del ELP con *Pleurotus sp.* CCEBI 3024 no se detectó actividad AAO para las condiciones ensayadas, por lo que podría ser la causa de que la actividad MIP se mantenga por más tiempo durante el cultivo (Fig. 12).

La MIP es un nuevo tipo de peroxidasa que oxida compuestos aromáticos fenólicos y no fenólicos, así como el Mn^{2+} a Mn^{3+} el que actúa como un agente oxidante difusible. Ha sido identificada en cultivos con *P. eryngii*, *P. ostreatus*, *P. pulmonarius*, *P. sajor-caju* (Bezalel y col.; 1994; Martínez y col., 2004); además de *Bjerkandera sp.* BOS55 (Mester y Field, 1998). Esta nueva peroxidasa de hongo muestra algunas ventajas tecnológicas, comparadas con las bien conocidas peroxidasas de *P. chrysosporium*, principalmente relacionado con la habilidad para actuar directamente sobre contaminantes aromáticos (Rodríguez y col., 2004), mientras que la LiP y MnP requieren de alcohol veratrílico, Mn^{2+} y lípidos insaturados para ello (Bockle y col., 1999).

Lo que resulta significativo es la presencia de la lacasa durante todo el tratamiento, pues aún cuando los niveles de actividad son mínimos y no se detecta actividad peroxidasa extracelular,

continúa en menor proporción la decoloración. Por lo que se puede plantear que la lacasa es fundamental para la decoloración y que la isoenzima detectada, similar en K_m a POXA3, constituye la forma activa al final del cultivo en ELP.

IV.5. Decoloración y biotratamiento de la vinaza de destilería (V) por *Pleurotus sp.* CCEBI 3024.

Durante la decoloración de este residual se expresaron todas las actividades monitoreadas: Lac, MIP, MnP, AAO, DyP, con diferentes patrones de ocurrencia (Fig.15B).

Las melanoidinas, el polímero más importante en el color y resistencia a la degradación de la vinaza, son moléculas complejas y de elevado peso molecular, de composición similar al ácido húmico (Blondeau, 1989) (Fig. 1). Es por eso que en ocasiones se le ha denominado a este efluente industrial “humus líquido”. La presencia de este componente en la vinaza puede hacer manifestar al hongo todo su potencial ligninolítico para su biodegradación, permitiendo vislumbrar la complejidad de la maquinaria enzimática del hongo para degradar la lignina o compuestos complejos relacionados estructuralmente.

La vinaza es un medio rico en vitaminas y compuestos nitrogenados, similar al medio de cultivo completo utilizado para detectar la actividad DyP en *P. ostreatus* (Vyas y Molitoris, 1995), el que contiene extracto de malta y extracto de levadura; es por esta razón que se detecta la presencia de esta enzima en medios de cultivo con este residual (Fig. 15).

La presencia de vinaza induce la producción temprana de la enzima decoloradora de RBBR o también llamada DyP (Fig. 15 B); pues hasta la fecha se ha descrito que la producción de ésta en *Pleurotus ostreatus* es característica de la idiofase, donde existe un agotamiento de la fuente carbonada (Shin y col., 1997), comportamiento propio de las peroxidasas. En medio control (PDY) el comportamiento de *Pleurotus sp.* CCEBI 3024 es el habitual (Fig. 15A); sin embargo, con este y el otro organismo usado *P. ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kummer (var. Florida) en medio con vinaza, se presentó la DyP en trofofase para tiempos similares (Fig. 16). En otros trabajos con esa cepa de referencia de *P. ostreatus* se había detectado la DyP en medio PDY a partir del sexto día, al inicio de la fase estacionaria (Palmieri y col., 2005).

Se conoce que esta enzima tiene alta afinidad por compuestos fenólicos que contienen grupos dimetoxi o *p*-hidroxilo atacando directamente al anillo bencénico (Kim y col., 1996). Por lo que su presencia en estadios tempranos del crecimiento en el medio con vinaza es favorable para el ataque y biotransformación de las melanoidinas y fenoles presentes, propiciando la decoloración de la vinaza y la acción del resto de las enzimas ligninolíticas.

Es coincidente que en la fase de inicio de la decoloración de ambos residuales, los que presentan compuestos coloreados de diferentes naturaleza, estén presentes en la trofofase la actividad Lac acompañada de una actividad peroxidasa afín a compuestos fenólicos, capaz de atacar directamente el anillo bencénico y con menor dependencia a altas concentraciones de peróxido, como es el caso de la MIP y la DyP. Por lo que al parecer se establece una cooperación entre ambos tipos de enzimas para iniciar el ataque de las estructuras de los polímeros a degradar, comenzando lo más probable por sus estructuras fenólicas. Pero la actividad DyP no es incrementada por la vinaza o derivados de su biodegradación, puesto que los valores máximos obtenidos son similares a los del medio control (Fig. 15).

Las otras dos peroxidasas monitoreadas, la MIP y MnP, son ligeramente incrementadas por la presencia de la vinaza y restringidas a la fase del metabolismo secundario, a diferencia de la MIP en residual ELP que esta presente en la trofofase (Fig. 12 y 15B). Se ha descrito que la medición de la actividad peroxidasa en presencia de ácidos húmicos naturales o sintéticos se dificulta porque estos compuestos ejercen una acción inhibitoria sobre este tipo de enzimas, a través de diferentes interacciones competitivas y no competitivas (Blondeau, 1989). Podría ser la razón por la cual éstas se manifiestan luego de existir cierta degradación de las melanoidinas, en la fase secundaria o idiofase. La MIP alcanza valores similares en vinaza que los detectados en ELP (Fig. 15) y su influencia en la remoción del color de este residuo líquido se hace notar en esta etapa, relacionada con el resto de las peroxidasas. Por otro lado la MnP alcanza su valor máximo de actividad al octavo día y luego decrece, inmediatamente después de alcanzarse el máximo de la actividad AAO, siendo efímera su presencia.

En esta misma Fig. 15 se observa que los máximos de las peroxidasas son detectadas luego de la presencia de la AAO, la cual se conoce es una enzima productora de H_2O_2 , cofactor importante para sus actividades. Especies diferentes de *Pleurotus* tienen capacidad para secretar AAO bajo condiciones de fermentación líquida y sólida. Igual ocurre con *Pleurotus* CCEBI 3024 (Mansur y col., 2003; Ortega y Otero, 2001). La AAO sólo es detectada en cantidades apreciables en el medio con vinaza (Fig. 15 y 16), por lo que es este residual o metabolitos derivados de la biodegradación de sus componentes, los que inducen la producción de la misma. Los valores en este medio con residual superan más de 40 veces los descritos por Mansur y col. (2003), trabajando con la misma cepa de microorganismo en un medio completo aireado (4,4 vs 0,1 U/mL).

Estudios realizados por Bockle y col. (1999) identifican a *P. pulmonarius* y *P. ostreatus* como buenos productores de AAO e incluso los niveles más altos reportados para esta enzima,

corresponden a cultivos de estos organismos. Ella participa en ciclos redox donde oxida alcoholes aromáticos a sus correspondientes aldehídos produciendo H_2O_2 (Gutiérrez y col., 1994). Los aldehídos son entonces reducidos por enzimas intracelulares rindiendo nuevamente el alcohol sustrato para la AAO (Leonowicz y col., 1997). Los alcoholes aromáticos producidos por el metabolismo de diferentes organismos de *Pleurotus* pueden ser sintetizados en ausencia de precursores aromáticos. No obstante, la vinaza contiene compuestos fenólicos como los ácidos gálico y vanilínico (GEPLACEA, 1990) y durante la degradación de los compuestos coloreados (melanoidinas), mediada por un basidiomiceto, es capaz de producir y liberar otros compuestos aromáticos capaces de actuar como precursores de los alcoholes aromáticos e incidiendo en la aparición de la actividad AAO.

Dos papeles fundamentales han sido propuestos para la AAO en la degradación de la lignina. El primero, la producción de H_2O_2 y entonces ser utilizado por las peroxidasas. El H_2O_2 también se ha sugerido participar de modo alternativo en el ataque inicial de la lignina, por ser precursor de radicales hidroxilos (Kirk, 1987). El segundo papel propuesto para la AAO es la reducción de radicales fenoxi, previniendo la polimerización de estos productos intermediarios generados durante la biodegradación de la lignina por las enzimas ligninolíticas, preferentemente la lacasa, como ha sido descrito en *P. ostreatus* (Marzullo y col., 1995). Mecanismo similar puede estar presente en el caso de la biodecoloración de la vinaza, que implica la biodegradación de la melanoidina fundamentalmente, compuesto que guarda semejanza estructural con la lignina.

La decoloración de la vinaza se ha relacionado tanto con lacasas (Miyata y col., 2000; González, 2001) como con las peroxidasas (Dehorter y Blondeau, 1993; Moreira y col., 1997; Dahiya y col., 2001) y ya en el año 1992, Dehorter y Blondeau sugirieron por primera vez que las lacasas podían intervenir en la degradación de los ácidos húmicos y de las melanoidinas sintéticas.

La lacasa ha sido detectada en todas las condiciones en que se ha cultivado a *Pleurotus sp.* CCEBI 3024 (Ortega 1999; Mansur y col., 2003; Rodríguez y col., 2003). En este trabajo con vinaza, dicha actividad enzimática se manifestó desde el mismo inicio del crecimiento. Ésta resultó ser la enzima más correlacionada con la decoloración (Fig. 15B) en la fase primera del crecimiento ($r = 0,94$; $p = 0,006$) por lo que podría ser la que inicie el ataque enzimático de las estructuras de las melanoidinas.

Algunos autores plantean la síntesis constitutiva de esta enzima, aunque sea en pequeñas cantidades (Mansur y col., 2003; Wesenberg y col., 2003; Marques de Souza y col., 2004). Por su lado, Scheel y col. (2000) postularon que en el proceso *in vivo* la degradación de polímeros

aromáticos como la lignina o los ácidos húmicos se puede iniciar con la acción de la lacasa constitutiva.

Se mantiene el incremento de la actividad de la Lac en la fase secundaria del crecimiento (estacionaria), pero se reduce su influencia en la decoloración.

La actividad de esta enzima es fuertemente incrementada por la presencia de la vinaza, aumentando sus valores al menos 10 veces ($57,89 \pm 1,12$ U/mL en medio con V) (Fig. 15B). Estos son los valores más altos encontrados en el cultivo de un basidiomiceto en medios naturales o sintéticos, sólo superados en los cultivos de *P. ostreatus* inducido por la adición de cobre y ácido ferúlico (90 U/mL) (Sannia G., 23 de Enero del 2005, comunicación personal*). La inducción de la actividad Lac por la vinaza ha sido descrita previamente (Dahiya y col., 2001; González y col., 2001) y numerosas explicaciones se han dado a ésta.

Igual inducción se ha visto en otros trabajos con residuales conteniendo polifenoles (Zapico, 1999; Yagüe y col., 2000), por lo que existen componentes de naturaleza fenólica en la vinaza que la estimulan, o también la liberación del cobre como resultado de la biodegradación de las melanoidinas. Las melanoidinas son identificadas como compuestos naturales quelantes de iones cobre.

La cooperación de AAO y Lac para la producción de radicales hidroxilos ha sido probado recientemente (Varela y col., 2001) asociado a la idiofase. Por lo que quizás en la fase estacionaria temprana (donde se hace máxima la actividad AAO) éste sea el mecanismo para el ataque de la fracción más recalcitrante a la decoloración y en la tardía del crecimiento (con la desaparición de la actividad AAO), su papel sea el de promover la polimerización de especies altamente reactivas y por tanto tóxicas, producidas durante la degradación de las melanoidina por las peroxidasas, impidiendo el ingreso a las hifas y por tanto, ejerciendo una acción protectora; por lo que en la fase estacionaria, se manifiesta escasa remoción del color (Fig. 15B). Esta acción ha sido sugerida por Yagüe y col. (2000) en el tratamiento de efluentes cerveceros.

No obstante, el incremento constante durante todo el proceso de decoloración permite confirmar la importancia de la lacasa en el mecanismo biodegradativo ligninolítico de *Pleurotus ostreatus*. A esto se une el hecho de que la decoloración con *P. ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kummer (var. Florida) ocurre en la misma proporción y la mayor remoción de color se verifica en la fase donde sólo se detecta actividad Lac (Fig.16).

En los hongos de pudrición blanca, las lacasas son típicamente producidas en múltiples isoformas dependiendo de la especie de hongos y las condiciones ambientales. Se conocen en *Pleurotus ostreatus* la POXA1w, POXAb1, POXA3, POXC, las cuales han sido identificadas, purificadas y

caracterizadas (Palmieri y col., 1997; 2000; 2003). Por su parte Marques de Souza y col. (2004) detectaron al menos tres isoformas en *P. pulmonarius*, al igual que Muñoz y col. (1997) en *P. eryngii*.

Trabajando con la misma cepa identificada como *Pleurotus sp.* CCEBI 3024, Mansur y col. (2003) describieron la producción de cuatro isoenzimas de lacasa en medio Kirk, empleando guayacol o ABTS como sustrato para su revelado. Por otro lado, las isoenzimas manifestaron diferencias en sus eficiencias catalíticas y especificidad de sustratos, lo que puede resultar en un amplio rango de actividad *in vivo* por la lacasa. Lo que aún queda sin esclarecer es si esta multiplicidad se corresponde con una diferenciación real de funciones.

Por lo que resulta interesante conocer las isoenzimas involucradas en el proceso de decoloración de la vinaza por este hongo, partiendo de que se ha reconocido que esta constituye la enzima con mayor relación en la reducción del color y es producida durante todo el crecimiento.

En la Fig. 17 se muestran los zimogramas de lacasas para cultivos del *Pleurotus sp.* CCEBI 3024 en medio PDY y PDY-V. Se detectaron cinco isoenzimas: Lac1, Lac1a, Lac2, Lac2a y Lac3. Las que se identifican en todas las condiciones analizadas fueron la Lac1 y Lac2.

El comportamiento de la isoenzima Lac2 resulta llamativo, pues en medio control (PDY) se mantiene igual de intensa su banda zimográfica; sin embargo, en medio con vinaza a medida que avanza la decoloración, se incrementa su intensidad coincidiendo con el máximo de remoción de color (Fig.17).

De igual forma su aparición en el medio a pH 4,5 estuvo aparejada al incremento de la actividad lacasa total y al incremento significativo de la capacidad de decoloración (Fig. 18). Al tiempo de mayor remoción de color (12 días) se obtiene una mayor proporción de Lac2 en el fraccionamiento cromatográfico (Fig.20 a y b), coincidiendo con los resultados con lacasa purificada, donde se observa un incremento del porcentaje de decoloración con el aumento de la proporción de POXA3 en la actividad lacasa total (10 U/mL), como se muestra en la Fig. 21 y 22. Por lo que se puede plantear que esta isoenzima juega un papel fundamental en el mecanismo de biodegradación de los compuestos coloreados de la vinaza por CCEBI 3024.

Ya anteriormente se había hecho referencia a la posible existencia de un mecanismo de regulación de la decoloración de la vinaza, mediado por el pH y su influencia en la actividad lacasa. Esta hipótesis se basa en el efecto activador que sobre POXA3 presenta la proteasa PoS1 (Palmieri y col., 2001).

La Lac2 tiene similar corrida electroforética que POXA3, esta isoenzima se activa durante la decoloración (Fig. 16, 17B, 18) y coincide su incremento en intensidad de la banda, con el

incremento del pH en el medio de cultivo (Fig.14, 17, 18). De igual modo se afecta la banda de Lac2, la actividad enzimática y los valores de remoción de color a pH 4,5 (Fig.10, 18, 19). Por lo que se puede sugerir que la regulación de la lacasa y con ello la decoloración de la vinaza, en el medio con valores de pH (de 6 a 9) en el rango de actividad descrita para la serín-proteasa extracelular encontrada en *Pleurotus*, puede realizarse también mediada por el efecto de ésta o similar peptidasa sobre Lac2. No se descarta su efecto sobre otras isoenzimas (Fig.17 y Fig. 18), porque igualmente varían. Nos concentramos en Lac2 porque es la que se incrementa aparejada a la decoloración.

Partiendo de lo expresado anteriormente, el pH ácido puede afectar la actividad de remoción de color por dos causas: la disminución de la actividad de la serín-proteasa y/o la activación de proteasas ácidas que inhiban la Lac2 o actúen en cascada como reguladores negativos sobre esta isoenzima. Como se aprecia en la Fig. 19, el cultivo a pH 4,5 reduce la intensidad de aparición de Lac2, aún cuando para el tiempo al que se realizó el zimograma el valor de pH detectado fue de $5,9 \pm 0,3$. La adición de PMSF afecta de forma marcada la aparición de Lac2 y de remoción del color ($14,9 \pm 1,3$ %), reforzando el criterio de la importancia de esta isoenzima y la regulación pH-dependiente mediada por una serín-proteasa.

Ya Mansur y col. (2003) habían descrito el efecto negativo que ejercía la reducción del pH sobre la actividad Lac, en medio basal. De igual modo es llamativo que en con esta cepa se detecte, en el crudo decolorado de ELP al final del biotratamiento, una actividad con parámetros cinéticos similares a la POXA3, como se expuso en el acápite III.2.2.

Posible sea el cambio en la proporción relativa de isoenzimas de lacasa, otro mecanismo regulador para el ataque de estructuras más recalcitrantes durante la biodecoloración. Debe resaltarse que el incremento de la relación POXA3/POXC, resultó en un mejoramiento significativo de la capacidad de reducir el color de la vinaza empleando enzimas purificadas (Fig. 22), incrementándose la capacidad de decoloración con el incremento en específico de la cantidad relativa de POXA3 (coeficiente de regresión $r^2 = 0,93$; $p = 0,003$).

Moldes y col. (2004) observaron que la proporción de isoformas de Lac variaba en dependencia de la edad del cultivo y del inductor que utilizaban (materiales lignocelulósicos), aún cuando LacII (banda más ácida) continuaba siendo la mayoritaria en todos los medios ensayados.

La observación realizada modifica la estrategia de búsqueda de eficaces inductores de la actividad lacasa; pues no sólo basta que se incremente la actividad de esta enzima, sino que exista una relación efectiva de isoenzimas para que se lleve a cabo el proceso de decoloración mediado por éstas.

Se observa en ambos zimogramas (Fig. 17 y 18) una banda más ácida que POXC (patrón), la nombrada Lac1a; la cual aparece y desaparece, encontrándose con mayor frecuencia en el cultivo con vinaza. En igualdad de condiciones para la corrida, similar banda ácida se había observado en cultivos de *P. pulmonarius* inducidos por ácido vanilínico y ferúlico (Marques de Souza y col., 2004). Dicha observación avala el planteamiento de que el incremento notable de la actividad Lac por la vinaza (debido a la producción de una nueva isoenzima) se debe a la presencia de compuestos fenólicos o aromáticos presentes en el residual o liberados durante la biodegradación de las melanoidinas.

En muestras filtradas de cultivos de *Pleurotus sp.* CCEBI 3024 en vinaza (Fig. 17 C) se detectó la presencia de la isoenzima Lac3 al segundo día, relacionada su corrida electroforética en condiciones nativas y a pH alcalinos con la POX1b. De igual forma se observó en los medios sintéticos con PDY, con este organismo y la cepa de *Pleurotus ostreatus* usada como referencia.

La POX1b es específicamente degradada en la fase temprana del crecimiento por proteasas presentes en el caldo de cultivo de *P. ostreatus*, donde la desaparición de esta isoenzima está correlacionada con la aparición de actividad proteolítica extracelular; reconociéndose a PoS1 como una de las posibles a participar en esta regulación (Palmieri y col., 2001). Por eso su presencia sólo se detecta para los primeros días y en el medio con vinaza la banda se muestra más clara.

De todo lo expuesto con anterioridad se concluye que *Pleurotus sp.*, empleando las mismas enzimas, es capaz de establecer diferentes estrategias y mecanismos de regulación para la eliminación del color de este residual.

IV.5.1- Decoloración de la vinaza con isoenzimas de lacasa y extractos enzimáticos crudos.

En acápite anteriores se ha sugerido la posibilidad de trabajar en régimen continuo para la decoloración de la vinaza con este hongo, pero existen sus limitaciones. Los patrones de crecimiento de los hongos de pudrición blanca y en específico de *Pleurotus* en cultivo sumergido, por lo general resulta en un crecimiento excesivo del micelio. Por lo que el crecimiento fúngico usualmente termina en problemas operacionales, lo cual limita el trabajo en continuo de un reactor. No obstante, continúan las investigaciones sobre esta temática (Moreira y col., 1998; Moreira y col., 2003) Por otro lado, se ha incrementado la atención del empleo de enzimas inmovilizadas como catalizadores en numerosos procesos industriales. Por eso resulta oportuno evaluar el uso de la lacasa purificada para la decoloración de la vinaza.

A partir de los resultados obtenidos se puede decir que puede utilizarse lacasa purificada, o sus mezclas, para la decoloración de la vinaza (Fig. 21 y 22). Esto constituye un aspecto novedoso en esta investigación, pues anteriormente no se tenían referencias del empleo de enzimas purificadas para el tratamiento de dicho residual; lo que permite abrir las posibilidades de aplicación industrial de la lacasa y el diseño de sistemas de tratamiento de este efluente industrial, superando las limitaciones que implica el empleo de basidiomicetos con estos fines. No obstante, la eficiencia en la decoloración podría ser mejorada si se continúa investigando en la búsqueda de mediadores redox, de enzimas más estables, la inmovilización en soportes adecuados, entre otros tópicos a desarrollar.

Sin embargo, el empleo de enzimas purificadas resultó en una menor reducción del color de la vinaza comparado con el empleo del organismo ($60,0 \pm 2,3$ % vs $79,4 \pm 2,9$ %, respectivamente.). De igual forma la utilización del crudo enzimático, donde están presentes otras enzimas, no significó la obtención de mejores resultados que el cultivo del hongo ($68,6 \pm 1,5$ %, $p < 0,01$). Pero hay que tener en cuenta que la obtención del crudo enzimático concentrado se realizó por filtración y diálisis, por lo que mediadores redox y agentes estabilizantes de pequeño tamaño molecular, pueden haber escapado e incidir en la eficiencia de la biodecoloración. Estos compuestos contribuyen a la realización de los ciclos catalíticos de algunas enzimas, actúan como agentes redox difusibles o amplían la posibilidades de ataque a estructuras no fenólicas (Leonowicz y col., 2001; Wesenberg y col., 2003).

En el tratamiento de la vinaza con caldos enzimáticos se detectó la formación de un precipitado de color marrón oscuro, al final de la experiencia. Este puede ser el resultado de la polimerización de compuestos intermediarios como los radicales fenoxi o quinonas. Se ha demostrado que las enzimas tanto lacasa como algunas peroxidasas, actúan por la extracción de electrones formando fenoxi radicales altamente reactivos que tienden a polimerizarse (Leonowicz y col., 2001). Esto se corresponde con el posible papel atribuido a la lacasa en la detoxificación de compuestos fenólicos vía oxidativa por acoplamiento mediante la polimerización (Thurston, 1994; Mansur y col., 1997; González, 2001; Marquez de Souza y col., 2004)

Si se escapan durante la diálisis compuestos estabilizadores o sustratos de enzimas estabilizadoras, como ácidos orgánicos (oxálico) y el alcohol veratrílico para la AAO, puede ocurrir más fácilmente la polimerización mediada por la lacasa. La ocurrencia de polimerizaciones espontáneas, puede reducir de igual forma los valores de luminancia y por tanto, aumentar el color, visualizando un menor grado de decoloración. No obstante, la

polimerización de los compuestos que resultan de la biodecoloración, permite la sedimentación y eliminación física de compuestos coloreados.

Concluyendo con la realización del tratamiento de la vinaza al 50 % con el hongo *Pleurotus sp.* CCEBI 3024, se observa que se logran reducir los valores a los parámetros de contaminación medidos, influyendo positivamente en el mejoramiento de las características para su liberación o incorporación a otro sistema de tratamiento tradicional (Tabla 11). El color es reducido en un amplio margen del espectro, asegurando la biotransformación y biodegradación de compuestos que absorben en el visible (Fig.23). También se logra eliminar el efecto tóxico que sobre *Bacillus cereus* provoca (95,5 % inhibición para vinaza al 50 %; no inhibición para la vinaza tratada), pudiendo ser aprovechado para otros usos, o asegurando su disposición de modo confiable en ecosistemas terrestres. Es bueno significar que también se logra la neutralización del pH del residual.

Se alcanzan valores similares a los encontrados en el tratamiento con *Phanerochaete chrysosporium* Burdsall M1 (DSM 13583), el cual se ha usado como microorganismo en la decoloración y detoxificación de otros residuales industriales fuertemente coloreados y con presencia de polifenoles (Kissi y col., 2000 y 2001). *P. chrysosporium* es por demás el organismo más empleado para la biorremediación de efluentes industriales, por lo que estos resultados amplían las expectativas de uso de otros hongos en métodos de tratamiento.

A partir de los datos obtenidos puede plantearse que es factible la utilización de este género de hongo de pudrición blanca en el tratamiento de este residual tan recalcitrante y coloreado; ya que anteriormente no se tenían referencias de la capacidad de *Pleurotus* de decolorar la vinaza, logrando a su vez la reducción de su materia orgánica y fenoles (Tabla 1 y 2), a pesar de ser este género de los basidiomicetos uno de los más cultivados a nivel mundial y ser amplio el conocimiento de su sistema ligninolítico.

No obstante, se considera que los valores obtenidos en la remoción del color con *Pleurotus sp.* CCEBI 3024 pueden ser mejorados con estudios posteriores teniendo en cuenta otros parámetros de cultivo o la optimización de los empleados.

Continuar estudiando los mecanismos que utiliza el género *Pleurotus* para decolorar efluentes coloreados, permitirá profundizar en el conocimiento del sistema enzimático ligninolítico para su comprensión y explotación, en virtud de la utilización de su versatilidad para reducir los impactos negativos ocasionados al medio ambiente por los residuales industriales que actualmente se vierten.

V.
CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

1. Los residuales de la pasteurización de la pulpa de café y la vinaza de destilería son fuertemente coloreados, presentando elevados valores de DQO y cantidades apreciables de compuestos fenólicos.
2. La cepa de *Pleurotus sp.* CCEBI 3024 crece a 35 °C y muestra buena capacidad para remover en más del 70 % el color, reduciendo significativamente la materia orgánica (DQO) y los fenoles, de ambos residuales.
3. La decoloración del residual de la pasteurización de la pulpa de café y de la vinaza de destilería se favorece a pH 6,5, en cultivo agitado y suplementando con una fuente de carbono.
4. El hongo *Pleurotus sp.* CCEBI 3024 muestra mayor diversidad de enzimas ligninolíticas durante la decoloración de la vinaza detectándose la lacasa, peroxidasa independiente de manganeso, manganeso peroxidasa, aril alcohol oxidasa y la peroxidasa decoloradora de colorante; a diferencia del residual de la pasteurización de la pulpa de café, donde sólo se detectaron la lacasa y peroxidasa independiente de manganeso.
5. Para la decoloración de ambos residuales, se requiere la producción de lacasa por este basidiomiceto; estando dicha actividad enzimática asociada al crecimiento.
6. La isoenzima de lacasa Lac2 participa de modo sustancial en la decoloración de los dos residuales.
7. Ambos residuales inducen el incremento de la actividad lacasa, por lo que pueden ser empleados como medios no convencionales para la producción de esta enzima.
8. El biotratamiento con el hongo es más efectivo para la decoloración de la vinaza, que emplear enzimas o extractos enzimáticos crudos, bajo las condiciones ensayadas.

VI.

RECOMENDACIONES

VI. RECOMENDACIONES

1. Emplear la luminancia como método para evaluar la decoloración en residuales complejos.
2. Estudiar la relación de otras isoenzimas de lacasa en la decoloración.
3. Continuar el estudio bioquímico de las nuevas bandas que aparecen en los zimogramas.
4. Optimizar las condiciones de cultivo para lograr mayores valores de decoloración.

VII.
REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

- A.O.A.C. Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemist, 13th Ed. Washington D.C. **1980**.
- Agrawal C.S., Pandey GS. Soil pollution by spent wash discharge: depletion of manganese (II) and impairment of its oxidation. J. Environ. Biol., 15: 49-53. **1994**.
- Akhtar M., Blanchette R., Kirk T. Fungal delignification and biomechanical pulping of wood. In: Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology. Berlin-Springer Eds. **1997**.
- Ander P., Marzullo L. Sugar oxidoreductases and veratryl alcohol oxidase as related to lignin degradation. J. of Biotechnology, 53: 115-131. **1997**.
- Aoshima I., Tozawa Y., Ohmomo S., Ueda K. Production of decolorization activity for molasses pigment by *Coriolus versicolor* Ps4a. Agric. Biol. Chem., 49: 2041-2045. **1985**.
- APHA. Standard Methods for the examination of water and wastewater. 20th Edition, Washington D.C, USA: 1124. **1998**.
- Asada Y., Watanabe A., Ohtsu Y., Kuwahara. Purification and characterization of an aryl-alcohol oxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Biosci. Biotech., 59: 1339-1341. **1995**.
- Aust SD., Benson JT. The fungus among us - use of white rot fungi to biodegrade environmental pollutants. Environmental Health Perspectives, 101: 232-237. **1993**.
- Bello R., Sánchez JE. Anaerobic filter treatment of wastewater from mushroom cultivation on coffee pulp. World Journal of Microbiol. & Biotechnol., 13: 51-55. **1997**.
- Bello, R. Anaerobic digestion of wastewater from pasteurization of coffee pulp. W. J. Microbial. Biotechnology., 33: 357-359. **1999**.
- Benito G., Miranda M., De los Santos D.R. Decolorization of wastewater from an alcoholic fermentation process with *Trametes versicolor*. Bioresource Technol., 61: 33-37. **1997**.
- Bermúdez R.C., Hoyos J., Rodríguez S. Evaluación de la disminución de la carga contaminante de la vinaza de destilería por tratamiento anaerobio. Rev. Int. Contaminación Ambiental, 16 (3):23-27. **2000**.
- Bermúdez R.C., García N., Gross P., Serrano M. Cultivation of *Pleurotus* on agricultural substrates in Cuba. Micología Aplicada Internacional, 13 (1): 25-29. **2001**.
- Bezalel, L., Hadar, Y., Cerniglia, C. Mineralization of PAH by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Appl. Environm. Microbiol., 62: 292-295. **1996**.
- Blondeau R. Biodegradation of natural and synthetic humic acids by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol., 55: 1282-1285. **1989**.
- Bockle B., Martínez M. J., Guillén F., Martínez A. Mechanism of peroxidase inactivation in liquid cultures of the ligninolytic Fungus *Pleurotus pulmonarius*. Appl. Environm. Microbiol., marzo: 923-928. **1999**.
- Boer C.G., Obici L., Marques de Souza C., Peralta R. Decolorization of synthetic dyes by solid state cultures of *Lentinula (Lentinus) edodes* producing manganese peroxidase as the main ligninolytic enzyme. Bioresource Technology, 24: 120-127. **2004**.
- Brossard L., Cortez L. Experiments on vinasse disposal: part I. J. Chem. Engineering., 13: 200-208. **1996**.
- Call H., Mucke I. Minireview: history, overview and application of mediated ligninolytic systems, specially laccase-mediator-system (Lignozym-Process^R). J Biotechnol, 53: 163-202. **1997**.
- Camarero S., Bockle B., Martínez M., Martínez A. Manganese-mediated lignin degradation by *Pleurotus pulmonarius*. Appl. Environm. Microbiol., 62: 1070-1072. **1996**.
- Campbell J., Joyce T. Enzymatic pretreatment of pulp mill effluents prior decolorization by lime precipitation. Water Resources, 22: 1213-1217. **1993**.

- Carbajo J.M., Junca H., Terrón MC., González T., Yague S., Zapico E., González A. Tannic acid induces transcription of laccase gene *cglcc 1* in the white-rot fungus *Coriopsis gallica*. Can. J. Microbiol., 48: 1041-1047. **2002**.
- Cohen R., Hadar Y., Yarden O. Transcript and activity levels of different *Pleurotus ostreatus* peroxidases are differentially affected by Mn²⁺. Environ. Microbiol., 3: 312-322. **2001**.
- Cohen R., Persky L., Hadar Y. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 58: 582-594. **2002**
- Conesa A., Punt P.J., Hondel C. Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. J. Biotechnol., 93: 143-158. **2002**.
- Coulibaly L., Gourene G., Agathos S. Utilization of fungi for biotreatment of raw wastewaters: review. Afr. J. of Biotechnology, 2 (12): 620-630. **2003**.
- Dahiya J., Singh D., Nigam P. Decolourisation of synthetic and spentwash melanoidins using the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* JAG-40. Bioresource Technol., 78: 95-98. **2001**.
- D'Annibale A., Crestini C., Vinciguerra V., Sermanni G.G. The biodegradation of recalcitrant effluents from an olive mill by a white-rot fungus. J Biotechnol., 61: 209-218. **1998**.
- Dass S., Dosoretz C., Reddy C., Grethlein H. Extracellular proteases produced by the wood-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* under ligninolytic and nonligninolytic conditions. Arch. Microbiol., 163: 254-258. **1995**.
- Dehorter B., Blondeau R. Extracellular enzyme activities during humic acids degradation by the white rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*. FEMS Microbiol. Lett., 94: 209-216. **1992**.
- Dehorter B., Blondeau R. Isolation of an extracellular Mn-dependent enzyme mineralizing melanoidins from the white rot fungus *Trametes versicolor*. FEMS Microbiol. Lett., 109: 117-122. **1993**.
- Dias A., Bezerra R., Pereira N. Activity and elution profile of laccase during biological decolorization and dephenolization of olive mill wastewater. Bioresource Technology, 92: 7-13. **2004**.
- Dubois M., Guillén K., Hamilton J., Roberts P., Smith F. Colourimetric determination of sugars and related substances. Analyt. Chem., 28: 350-356. **1956**.
- Eggen T. Bioremediation of recalcitrant aromatic organic pollutants with white rot fungi. Doctor Scientiarum Theses. Agricultural University of Norway, Jordforsk, Norway. **2000**.
- Eggert C., Temp U., Dean J.F., Erikson K. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. FEBS Letter, 391: 144-148. **1996**.
- Eichlerová I., Homolka L., Nerud F. Decolorization of synthetic dyes by *Pleurotus ostreatus* isolates differing in ligninolytic properties. Folia Microbiol (Praha), 47: 691-5. **2002**.
- Fabbrini M., Galli C., Gentili P. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. Journal of Molecular Catalysis Enzymatic, 16:231-240. **2002**.
- Fahy V., Fitzgibbon F., McMullan G., Singh D., Marchant R. Decolourisation of molasses spent wash by *Phanerochaete chrysosporium* Biotechnol. Lett., 19: 97-99. **1997**.
- FAO. <http://apps.fao.org/faostat/serlet/XteServlet3?Areas=862&Items=449&Elements=51&Years=2003>, último acceso 2 de Julio del 2004. **2004**.
- Feijoo G., Moreira R., Sierra-Alvarez R., Field J., Lema J. Blanqueo de pasta kraft con hongos ligninolíticos. Rev. AFINIDAD LII: 321-326. **1997**.
- Feijoo G., Lema J.M. Tratamiento de efluentes de industrias de la madera con compuestos tóxicos y recalcitrantes mediante hongos ligninolíticos. Revista AFINIDAD LIV,; 171-180. **1999**.

- Fernández, M. 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. **2001**.
- Ferraro A. Studio di induzione e di relazione struttura-funzione delle laccase POXA3a e POXA3b de *Pleurotus ostreatus*. Tesi Sperimentali, Corso de Laurea in Chimica. Universita degli studi de Napoli "Federico II", Napoli Italy. **2004**.
- Field J., Lettinga G. The effect of oxidative coloration on the methanogenic toxicity and anaerobic biodegradability of phenols. *Biological Waste*, 29: 161-179. **1987**.
- Field J.A., de Jong E., Feijoo Costa G., de Bont J.A.M. Screening for ligninolytic fungi applicable to the degradation of xenobiotics. *TiBeth.*, 14: 44-49. **1993**.
- Fitzgibbon F.J., Nigam P., Singh D., Marchant R. Biological treatment of distillery waste for pollution-remediation. *J. Basic Microbiol.*, 35: 293-301. **1995**.
- Fountoulakis M., Dokianakis M., Kornaros M., Aggelis G., Lyberatos G. Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Res.*, 36 : 4735-4744. **2002**.
- García N. Producción de setas comestibles *Pleurotus ostreatus* sobre subproductos del café y el cacao. Tesis de Maestría, Universidad de Oriente. **1999**.
- Garg S.K., Modi D.R. Decolorization of pulp-paper mill effluents by white-rot fungi. *Critical Rev. Biotechnol.*, 19: 85-112. **1999**.
- Gastón G. Studies of genus *Pleurotus* (Basidiomycotina) in Mexico and other Latin-American countries: Taxonomic confusion, distribution and semi-industrial culture. *Cryptogamia Botanic*, 64: 220- 321. **1993**.
- GEPLACEA. Manual de los derivados de la caña de azúcar. (2th ed.). Serie Diversificación, GEPLACEA, PNUD. **1990**.
- Giardina P., Palmieri G., Scaloni A., Fontanella B., Faraco V., Cennamo G., Sannia G. Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochem. J.*, 34: 655-663. **1999**.
- Giardina P., Palmieri G., Fontanella B., Riviaccio V., Sannia G. Manganese Peroxidase Isoenzymes Produced by *Pleurotus ostreatus* Grown on Wood Sawdust. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 376 (1): 171-179. **2000**.
- Glenn J.K., Gold M.H. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45: 1741-1747. **1983**.
- González A.E., Griva E. y Grinbergs J. Biologische Umwandlung von Holz in Rinderfutter- "Palo podrido". *Zentralbl. Mikrobiol.*, 141: 181-186. **1986**.
- González T. Aspectos fisiológicos y moleculares de la decoloración enzimática de efluentes de destilería con el hongo basidiomiceto *Trametes sp. I-62*. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad de Alcalá, España. **2001**.
- González T., Terrón M.C., Yague S., García M., Carbajo J.M., González A. Aplicación de pruebas cualitativas al estudio de la capacidad de degradación de un hongo basidiomiceto. *Rev. ICIDCA*, 37: 50-57. **2003**.
- Guillén G., Márquez F, Sánchez J. Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. *Rev. Iberoam. Micol.*, 15: 302-306. **1998**.
- Gutiérrez A., Caramelo L., Prieto A., Martínez M.J., Martínez A. Anisaldehyde production and aryl-alcohol oxidase and deshydrogenase activities in ligninolytic fungi of the genus *Pleurotus*. *Appl. Environm. Microbiol.*: 1783-1788. **1994**.
- Haider KM., Martín JP. Mineralization of ¹⁴C-labelled humic acid and humic-acid bound ¹⁴C xenobiotics by *Phanerochaete chrysosporium*. *Soil Biol. Chem.*, 20: 425-429. **1988**.

- Hammel K.E. Extracellular free radical biochemistry of ligninolytic fungi. *New J. Chem.*, 20: 195-198. **1996.**
- Hatakka A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol. Rev.*, 13: 125-135. **1994.**
- Hechavarría M. Estudio de sustratos y sus mezclas en la fructificación de *Pleurotus sp.* Tesis de Maestría, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba. **2005.**
- Heinfling A., Martínez M.J., Martínez A.T., Bergbauer M., Szewzyk U. Purification and characterization of peroxidases from the dye-decolorizing fungus *Bjerkandera adusta*. *FEMS Microbiology Letters*, 165: 43-50. **1998.**
- Herrera Y., Manolo K., López A., Quintero R., Trejo M. Oxidación enzimática de compuestos tóxicos en medio acuoso. Memorias, VII Congreso de Biotecnología y Bioingeniería y II Simposio Internacional sobre Ingeniería de Procesos, Mazatlán: BP057. **1997.**
- Higson F.K. Degradation of xenobiotics by white rot fungi. In: Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, G. W. Ware eds., Springer Verlag, New York, Berlín. **1991.**
- Hofrichter M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme Microbiol. Technol.*, 30: 454-466. **2002.**
- Howard R., Abotsi E., Jansen E., Howard S. Review. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *Afr. J. of Biotechnology*, 2 (12): 602-619. **2003.**
- ICIDCA. La industria de los derivados de la caña de azúcar. Editorial Científico-Técnica (eds). Ciudad de la Habana, Cuba: 147-158. **1986.**
- Ikehata K., Buchanan I., Smith D. Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. *J. Environm. Engin. Science*, 3: 1-19. **2004**
- Jiménez AM., Borja R. Influence of aerobic pretreatment with *Penicillium decumbens* on the anaerobic digestion of beet molasses alcoholic fermentation wastewater in suspended and immobilized cell bioreactors. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 69: 193-202. **1997.**
- Johannes C., Majcherczyk A. Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediators systems. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 524-528. **2000.**
- Kahraman, S., Yeşilada O. Decolorization and bioremediation of molasses wastewater by white-rot fungi in a semi-solid-state condition. *Folia Microbiol.*, 48: 525-528. **2003.**
- Kasinath A., Novotny C., Svobodova K., Patel K.C., Sasek V. Decolourisation of synthetic dyes by *Irpex lacteus* in liquid cultures and packed-bed bioreactor. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 32: 167-173. **2003.**
- Kerem Z., Hadar Y. Lignin-degrading fungi: Mechanisms and utilization. *Agricultural Biotechnol.*, 27: 351-365. **1998.**
- Kersten P.J., Kalyanaraman B., Hammel K.E., Reinhammar B., Kirk T. Comparison of Lignin Peroxidase, Horseradish Peroxidase and Laccase in the Oxidation of Methoxybenzenes. *Biochem. J.*, 268: 475-480. **1990.**
- Kim B., Ryu S., Shin K. Effects of culture parameters on the decolorization of Remazol brilliant blue R by *Pleurotus ostreatus*. *J. Microbiol.*, 34: 101-104. **1996.**
- Kim S., Shoda M. Decolorization of molasse by a new isolate of *Geotrichum candidum* in a Jar fermentor. *Biotechnol. Letter.*, 12: 497-499. **1998**
- Kim S., Shoda M. Decolorization of molasse and a dye by a new isolate of *Geotrichum candidum* Dec 1. *Biotechnol. Bioeng.*, 62: 114-119. **1999a.**
- Kim S., Shoda M. Batch decolorization of molasse by suspended and immobilized fungus of *Geotrichum candidum* Dec 1. *J. Biosc. and Bioeng.*, 88 586-589. **1999b.**

- Kirk T. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Ann. Rev. Microbiol.*, 41: 465-505. **1987**.
- Kissi M., Mountandar M., Asshobei O., Palmieri G., Giardina P., Sannia G. Metodo di trattamento dei reflui. Ufficio Italiano Brevetti MI2000A001867 Patent. **2000**.
- Kissi M., Mountandar M., Asshobei O., Gargiulo E., Palmieri G., Giardina P., Sannia G. Roles of two white-rot basidiomycete fungi in decolorisation and detoxification of olive mill waste water. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 57: 221-226. **2001**.
- Kitts D., Wu C.H., Stich H., Powrie W. Effects of glucose-glycine Maillard reaction products on bacterial and mamalian cell mutagenesis. *J. Agric. Food Chem.*, 41: 2353-2358. **1993**.
- Knapp J., Newby P. The decolourisation of a chemical industry effluent by white-rot fungi. *Water Res.*, 33: 575-577. **1999**.
- Kort MJ. Colour in the Sugar Industry. Science and Technology. Birch GG y Parker KJ. (eds.) Applied Science, London: 97. **1979**.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685. **1970**.
- Leatham G. Frontiers in Industrial Mycology. Chapman & Hall Eds, Inc. London, U.K. **1992**.
- Leonowicz A., Cho N., Wasilewska M., Rogalski J., Luterek J. Enzymes of white-rot fungi cooperate in biodeterioration of lignin barrier. *J. Kor. Wood Sci. Technol.*, 25: 1-20. **1997**.
- Leonowicz A., Matuszewska A., Luterek J., Ziegenhagen D., Wasilewska M., Cho N., Hofrichter M., Rogalski J. Biodegradation of lignin by white-rot fungi: review. *Fungal Genetics and Biol.*, 27: 175-185. **1999**.
- Leonowicz A., Rogalski J., Jaszek M., Luterek J., Wasilewska M., Malarczyk E., Ginalska G., Fink-Boots M., Cho N. Cooperation of fungal laccase and glucose 1-oxidase in transformation of Bjorkman lignin and some phenolic compounds. *Holzforschung*, 53: 376-380. **1999a**.
- Leonowicz A., Cho N., Luterek J., Wilkolazka A., Wotjas M., Matus A., Hofrichter M., Wesenberg D., Rogalski J. Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J. Basic Microbiol.*, 41: 185-227. **2001**.
- López Z., Sánchez J.E., Bello R. Coffee wastes: quality of effluent water from the pasteurizing of coffee pulp. In: Proceeding of the XVI International Conference on coffee science. Kyoto. **1995**.
- Maestro D., Borja R., Martin A., Fiesta J.A., Mendoza J., Biodegradación de los compuestos fenólicos presentes en el alpechín. *Fasc.*, 42: 271-276. **1991**.
- Maestro D., Borja R., Luque M., Martín A. Compuestos fenólicos en las aguas residuales de destilerías vnicas (vinazas). *Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment.*, 35: 517-528. **1993**.
- Maier R.M., Pepper I., Gerba Ch. Environmental Microbiology. Academic Press Ed., Sidney: 363-400. **2002**.
- Maioresella BL., Blanch HW., Wilke CR. Distillery effluent treatment and by-product recovery. *Process. Biochem.*, 18: 5-8. **1983**.
- Mansur M. Caracterización bioquímica y molecular de las fenoloxidasas de hongos ligninolíticos. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. **1996**.
- Mansur M., Arias M.E., Copa-Patiño J.L., Flardh M., González A. The white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* secretes laccase isoenzymes with different substrate specificities. *Mycologia*, 95 (6): 1013-1020. **2003**.
- Marques de Souza C., Peralta R. Purification and characterization of the main laccase produced by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium. *J. Basic Microbiol.*, 43 (4): 278-286. **2003**.

- Marques de Souza C., Tychanowicz G., Farani D., Peralta R. Production of laccase isoforms by *Pleurotus pulmonarius* in response to presence of phenolic and aromatic compounds. *J. Basic Microbiol.*, 44: 129-136. **2004.**
- Martínez A. T., Camarero S., Guillén F., Gutiérrez A., Muñoz C., Varela M., Martínez E., Barrosa J., Ruel K., Pelayo M. Progress in biopulping of non woody materials: chemical, enzymatic and ultrastructural aspects of wheat –straw delignification with ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*. *FEMS Microbiology Review*, 13: 265-284. **1994.**
- Martínez A.T. Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 30: 425-444. **2002.**
- Martínez M.J., Ruiz-Dueñas F.J., Guillén F., Martínez A.T. Purification and catalytic properties of two manganese–peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *European J. of Biochem.*, 237: 424-432. **1996.**
- Martínez, M.J. MnP Isoenzymes Produced by two *Pleurotus sp.* in liquid culture and during wheat-strow solid-state fermentation. *En: Fronteras en Biotecnología y Bioingeniería. Ed. Galindo, Madrid, España. 1996.*
- Martínez-Carrera D. Simple technology to cultivate *Pleurotus* on coffee pulp in the tropics. *Mushroom Science*, 12: 169-178. **1989.**
- Martínez-Carrera D. Mushroom biotechnology in tropical America. *Int. J. Mushroom Sci.*, 3: 9-20. **2000**
- Martirani L., Giardina P, Marzullo L., Sannia G. Reduction of phenol content and toxicity in olive oil mill waste waters with the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Research*, 30: 1914-1918. **1996.**
- Marzullo L., Cannio R., Giardina P., Santini M., Sannia G. Veratryl alcohol oxidase from *Pleurotus ostreatus* participates in lignin biodegradation and prevents polymerization of laccase-oxidized substrates. *J. Biol. Chem.*, 270: 3823-3827. **1995.**
- Mayer A. M., Staples R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochem.*, 60: 51-565. **2002.**
- McGuird M.A., Dooley D.M. Copper-containing oxidases. *Curr Opin. Chem. Biol.*, 3: 138-144. **1999.**
- Mester T., Field J.A. Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase isoenzyme produced by *Bjerkandera* species strain BOS55 in the absence of manganese. *J. Biol. Chem.*, 273: 15 412- 15 417. **1998.**
- Miranda M., Benito G., San Cristóbal N., Nieto C. Color elimination from molasses wastewater by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technol.*, 57: 229-235. **1996.**
- Miyata N, Iwahori K y Fujita M. Manganese-independent and dependent decolorization of melanoidin by extracellular hydrogen peroxide and peroxidases from *Coriolus hirsutus* pellets. *J. Ferment. Bioeng.* 85: 550-553. **1998.**
- Miyata N, Mori T, Iwahori K y Fujita M. Microbial decolorization of melanoidin-containing waste waters: combined use of activated sludge and the fungus *Coriolus hirsutus*. *J. Biosci. Bioeng.* 89: 145-150. **2000.**
- Moldes D., Lorenzo M., Sanromán M.A. Different proportions of laccase isoenzymes produced by submerged cultures of *Trametes versicolor* grown on lignocellulosic wastes. *Biotechnol. Letters*, 26: 327-330. **2004.**
- Moreira M., Palma C., Feijoo G., Lema J. Strategies for the continuous production of ligninolytic enzymes in fixed and fluidised bed bioreactors. *J. Biotechnol.*, 66: 27-39. **1998.**
- Moreira M., Feijoo G., Lema J. Fungal bioreactors: applications to white-rot fungi. *Reviews in Environm. Sciences and Biotechnol*, 2: 247-259. **2003.**

- Moreira M., Palma C., Feijoo G., Lema J.M. Decolorization of ion-exchange effluent derived from sugar-mill operations by *Bjerkandera* sp. BOS55. *Int. Biodeterioration and Biodegradation*, 40 (2): 125-129. **1997**.
- Muñoz C., Guillén F., Martínez AT., Martínez MJ. Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn²⁺ oxidation. *Appl Environ Microbiol.*, 63: 2166-2174. **1997**.
- Normas Cubanas NC-27. Vertimiento de aguas residuales a las aguas terrestres y al alcantarillado. Especificaciones. Oficina Nacional de Normalización. **1999**.
- Normas Cubanas NC-372. Vertimiento de aguas residuales a las zonas costeras y aguas marinas. Especificaciones. Oficina Nacional de Normalización. **2004**.
- Novotny C, Rawal B., Bhatt M., Patel M., Sasek V., Molitoris H. P. Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes. *J. Biotechnol.*, 89: 113-122. **2001**.
- Ohmomo S., Aoshima I., Tozawa Y., Sakurada N., Ueda K. Purification and some properties of melanoidin decolorizing enzymes, P-III And P-IV, promycelia of *Coriolus versicolor* Ps4a. *Agric. Biol. Chem.*, 49: 2047- 2053. **1985**.
- Ohmomo S., Kaneko Y., Sirianuntapiboon S., Somchai P., Atthasampunna P., Nakamura I. Decolorization of molasses waste water by a thermophilic strain *Aspergillus fumigatus* G-2-6. *Agric. Biol. Chem.*, 51: 3339-3346. **1987**.
- Ollicka P., Alhonmaki K., Leppanen V.M., Glumoff T., Raijola T. Suominen I.. Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Environmental Microbiology*, 59: 4010-4016. **1993**.
- Ortega G. Biodegradación de residuos de la cosecha cañera con hongos del género *Pleurotus*. Tesis de Maestría, Universidad de La Habana, Ciudad de La Habana. **1999**.
- Ortega G., Otero M.A. Cinética de degradación de residuos cañeros por *Pleurotus ostreatus-pulmonarius*. *Rev. ICIDCA*, 2-3: 35-41. **2001**.
- Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Scaloni A., Capasso A., Sannia G. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *J. Biological Chemistry*, 272: 31301-31307. **1997**.
- Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Fontanella B y Sannia G. Copper Induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 920-924. **2000**.
- Palmieri G., Bianco C., Cennamo G., Giradina P., Marino G., Monti M. Purification, characterization and functional role of a novel extracellular protease from *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environm. Microbiol.*, 67 (6):2754 -2759. **2001**.
- Palmieri G. Cennamo G., Faraco V., Amoresano A., Sannia G., Giardina P. Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enzyme and Microbial Technol.*, 33: 220-230. **2003**.
- Palmieri G., Cennamo G., Sannia G. Remazol Brilliant Blue R decolourisation by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system. *Enzyme and Microbial Technology*, 36: 17-24. **2005**.
- Pellinen J., Yin C., Joyce T., Chang H. Treatment of chlorine bleaching effluent using a white-rot fungus. *J. Biotechnology*, 8: 67-76. **1988**.
- Pérez J., Saez L., De la Rubia T., Martínez J. *Phanerochaete chrysosporium* ligninolytic activities and decolorization of partially biodepurated paper mill waste. *Water Res.*, 31 (3): 495-502. **1997**.
- Pérez J. L., Bermúdez R. C. Biogás a partir de los efluentes de la pasteurización de la pulpa de café. En: CUBASOLAR 98, Libro Resumen:13-17. **1998**.
- Perraud-Gaime I., Saucedo G., Augur C., Roussos S. Adding value to coffee solid byproducts through biotechnology. *In: Coffee Biotechnology Quality*, Sera T., Soccol C., Pandey A.,

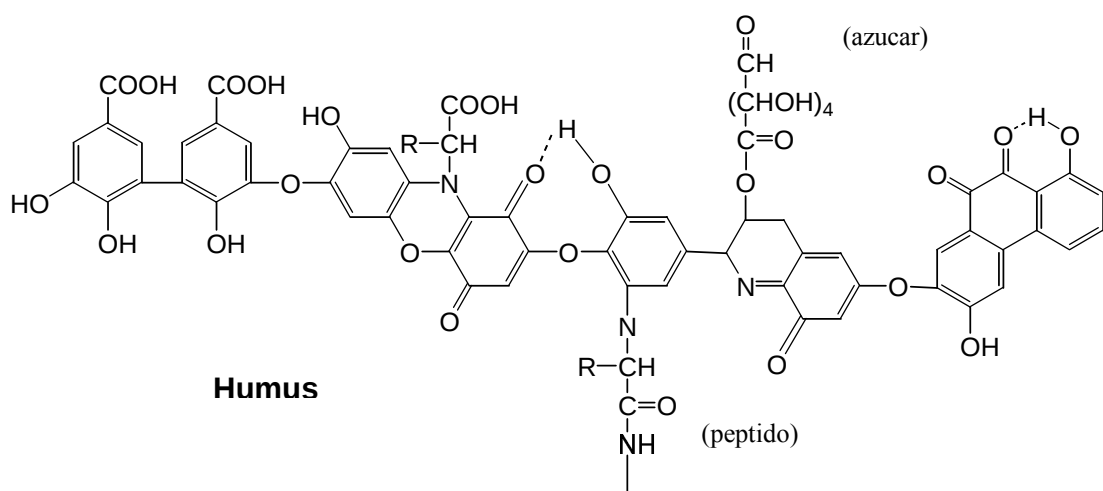
- Roussos S. *Eds.*, Kluwer Academy Publishers: Dordrecht , The Netherlands: 437-446. **2000.**
- Pick E., Keisare Y. A simple colorimetric method for a measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J. Immunol. Meth.*, 38: 161-170. **1980.**
- Pinzón L. M., Ruiz M.E. Comprobación del tipo de pudrición y selectividad del sustrato de 15 hongos poliporoides xilófagos de los Tuxtlas, Veracruz, México. *Rev. Mexicana de Micología*, 18: 47-59. **2004.**
- Pointing S.B. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 57: 20-23. **2001.**
- Raghukumar C., Rivonkar G. Decolorization of molasses spent wash by white-rot fungus *Flavodon flavus*, isolated from a marine habitat. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 55: 510-514. **2001.**
- Ramírez J., Clifford M. Coffee pulp polyphenols: an overview. *In: Coffee Biotechnology and Quality.* Sera T., Soccol CR., Pandey A., Roussos S. (*eds*) Kluwer Dordrecht: 471-488. **2000.**
- Ramos-Cormenzana A., Juárez A., García M.P. Antimicrobial activity of olive mill waste-waters (alpechín) and biotransformed olive mill wastewater. *Int. Biodeterior. and Biodegrad.*, 38: 283-290. **1996.**
- Reynolds TM. Chemistry of nonenzymic browning. I. The reaction between aldoses and amines. *Advan. Food Res.*, 12: 1-52. **1968.**
- Robinson T., McMullan G., Marchant R., Nigam P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology*, 77: 247-255. **2001.**
- Rodríguez E., Nuero O., Guillén F., Martínez A.T., Martínez MJ. Degradation of phenolic and non phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* specie: the role of laccase and versatile peroxidase. *Soil Biology and Biotechnology*, 36: 909-916. **2004.**
- Rodríguez S., M. Fernández, R. C. Bermúdez, H. Morris, Tratamiento de efluentes industriales coloreados con *Pleurotus sp.* *Revista Iberoamericana de Micología*, 20: 164-168. **2003.**
- Rodríguez, E.; Pickard, M.; Vazquez-Duhalt, R. Industrial Dye Decolorization by Laccases from Ligninolytic Fungi. *Current Microbiology*, 38: 27-31. **1999.**
- Sánchez J., Royse D. La Biología y el cultivo de *Pleurotus spp.* *Ed. Limusa, S.A. México:* 27-47. **2002.**
- Sawyer C., McCarty P. Chemistry for sanitary engineers. McGraw-Hill *Ed.*, New York. **1967.**
- Scalbert A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30: 875-883. **1991.**
- Scheel T., Höfer M., Ludwig S., Hölker U. Differential expression of manganese peroxidase and laccase in white-rot fungi in the presence of manganese or aromatic compounds. *Appl. Microbiol. Environ.*, 54: 686-691. **2000.**
- Shevchenko S., Bailey G. Life after death: Lignin-humic relationships re-examined. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 26: 95-153. **1996.**
- Shin K., Oh I., Kim Ch. Production and purification of Remazol brilliant blue R decolorizing peroxidase from the culture filtrate of *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environm. Microbiol.*, 63: 1744-1748. **1997.**
- Shützendüel, A.; Majancherczk, A. Degradation of fluorene, phenanthrene, fluoranthene, and pyrene lacks conection to the production of extracellular enzymes by *Pleurotus ostreatus* and *Bjerkandera adusta*. *Int. Biodeterioration*, 43: 93-100. **1999.**
- Sigarroa, A. Biometría y Diseño Experimental. *Ed. Pueblo y Educación. Habana, Cuba.* **1985.**
- SIGMA-Aldrich. Biochemicals and Reagents Catalog for Life Science Research. USA. **2004-2005.**

- Singh D., Nigam P. Disposal and treatment of distillery effluent. *In: Moo-Young, M., Anderson, W.A., Chakraborty, A.M. (Eds.), Environmental Biotechnology: Principles and Applications.* Kluwer Academic Publisher, Holland: 735-750. **1995.**
- Sirianuntapiboon S, Chairattanawan K., Ohmomo S. Removal of coloured substances from molasses waste water by biological treatment system combined with chemical treatment. *Japan Agric. Res. Quarterly*, 32: 1-30. **1998.**
- Soden M., Dobson A. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. *Microbiology*, 147:1755-1763. **2001.**
- Sodergren A. Biological effects of bleached pulp mill effluents. National Swedish Environmental, Protection Board. Report 3558: 72-100. **1989.**
- Southern T.G. Technical solutions to the colour problem: critical review. *In: Cooper P., editor. Colour in dyehouse effluent.* Bradford: Society of Dyers and Colourists; 75. **1995.**
- Stajic M., Persky L., Cohen E., Hadar Y., Brceski I., Wasser S., Nevo E. Screening of laccase, manganese peroxidase and versatile peroxidase activities of the genus *Pleurotus* in media with some raw plant materials as carbon sources. *Appl. Biochem. and Biotechnol.*, 117:155-164. **2004.**
- Staszczak M., Zdunek E., Leonowicz A. Studies on the role of proteases in the white-rot fungus *Trametes versicolor*: effects of PMSF and chloroquine on ligninolytic enzyme activity. *J. Basic Microbiol.*, 40: 36-51. **2000.**
- Thurston CF. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 140:19-26. **1994.**
- Tien M., Kirk T. Lignin-degrading enzymes from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization and catalytic properties of a unique H₂O₂ requiring oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 2280-2284. **1984.**
- Valdéz E., Obaya MC., García A., Reyes A., Chivás M. Estudio del tratamiento anaeróbico de los residuales de la industria alcoholera. *Rev. ICIDCA*. 19: 7-11, **1985.**
- Varela E., Guillén F., Martínez A., Martínez M.J. Expression of *Pleurotus eryngii* aryl-alcohol oxidase in *Aspergillus nidulans*: purification and characterization of the recombinant enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1546: 107-113. **2001.**
- Verdecia M.J. Cultivo del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* var. Florida sobre pulpa de café en condiciones rurales. Tesis de maestría. Universidad de Oriente, Santiago de Cuba. **2000.**
- Verma I. Toxicity of distillery waste to *Puntius sophore* (Ham) and *Mystinvittatus* (Bloch) (*Piscu Cyprinidal Bagridal*). Part III. Bioassay studies and TLm determination. *Acta Hydrochims. Hydrobiol.* 4: 547-550. **1976.**
- Vidal G., Méndez R., Lema J. La industria de pasta celulósica y papel: Tratamiento externo de los efluentes residuales. *Rev. Ingeniería Química*, 6: 139-146. **1996.**
- Vyas B., Molitoris H. Involvement of an extracellular H₂O₂-dependent ligninolytic activity of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in the decolorization of Remazol Brilliant Blue R. *Appl. Environm. Microbiol.*, 61: 3919-3927. **1995.**
- Watanabe Y., Sugi R., Tanaka Y., Hayashida S. Enzymatic decolorization of melanoidin by *Coriolus* sp. No. 20. *Agric. Biol. Chem.*, 46: 1623-1630. **1982.**
- Wesenberg D., Kyriakides I., Agathos S.N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of the industrial dye effluents. *Biotechnology Advances*, 22:161-187. **2003.**
- Willmott N., Guthrie J., Nelson G. The biotechnology approach to colour removal from textile effluent. *J. Soc. Dyers Colour*, 114: 38-41. **1998.**
- Wolfenden R.S., Willson R.L. Radical-cations as reference chromogens in the kinetics studies of one-electron transfer reactions. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*: 805-812. **1982.**

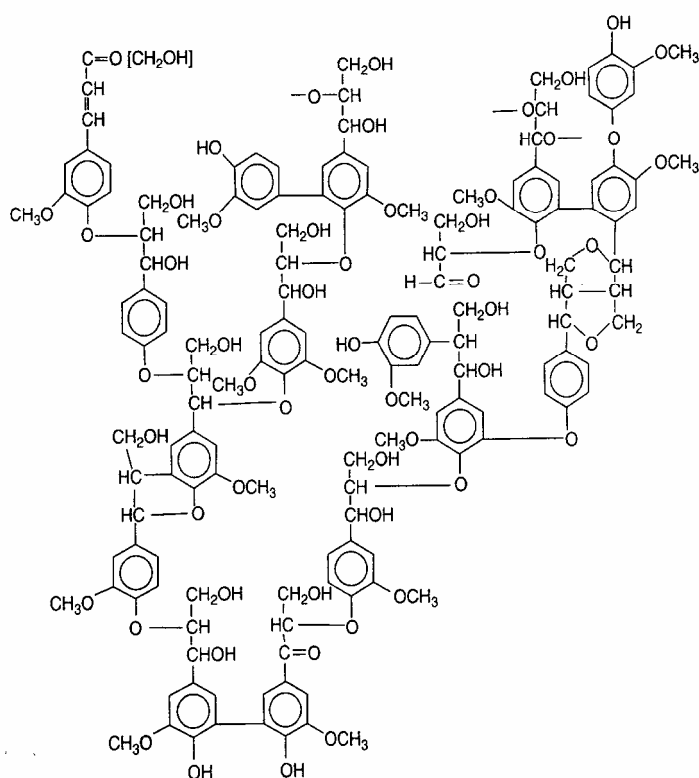
- Xu F. Oxidation of phenols, anilines and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry*, 35: 7608-7614. **1996**.
- Yagüe S, Terrón MC, González T, Zapico E, Bocchini P, Galletti GC., González AE. Biotreatment of a rich-tannin beer-factory wastewater with the white-rot basidiomycete *Coriopsis gallica* monitored by pyrolysis/gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 14: 905-910. **2000**.
- Yesilada O., Sik S., Sam M. Biodegradation of olive mill wastewater by *Coriolus versicolor* and *Funalia troggi*: effects of agitation, initial COD concentration, inoculum size and immobilization. *World J. of Microbiol. & Biotechnol.*, 14: 37-42. **1998**.
- Yesilada E. Genotoxic activity of vinasse and its effects on fecundity and longevity of *Drosophila melanogaster*. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, 63: 560-566. **1999**.
- Yesilada O., Asma D., Cing S. Decolorization of textile dyes by fungal pellets. *Process Biochem.*, 38: 933-938. **2003**.
- Zapico E.J. Estudios fisiológicos y moleculares de la expresión de lacasa en *Coriopsis gallica* y su aplicación a la decoloración de efluentes industriales. Tesis Doctoral, Universidad de Alcalá. **1999**.
- Zhang F., Knapp J., Tapley K. Decolourisation of cotton bleaching effluent with wood rotting fungus. *Wat. Res.*, 33 (4): 919-928. **1999**.
- Zuluaga, J. Utilización integral de los subproductos de café. I Seminario Internacional sobre Biotecnología en la Agroindustria Cafetalera. Ciudad de México. **1988**.

comunicación personal * (Dr. Giovanni Sannia, Grupo de Biotecnología Ambiental y Molecular, Departamento de Química Orgánica y Bioquímica, "Universidad Federico II", Nápoles, Italia)

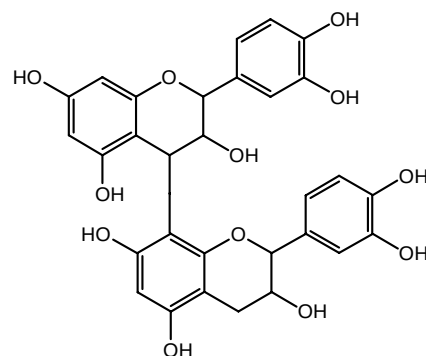
ANEXOS



Lignina



Taninos condensados (dímero)



Ácido clorogénico

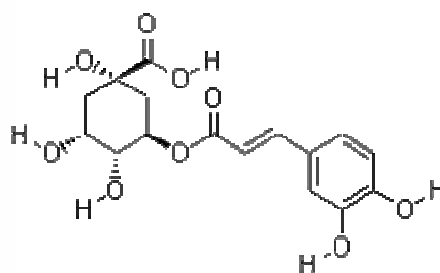


Figura 1. Estructura de la lignina y de compuestos relacionados, presentes en los residuales ELP y vinaza.

Los modelos estructurales fueron tomados de Dehorter y Blondeau, 1992; Ramírez y Clifford, 2000; Eggen, 2000; según orden de aparición.

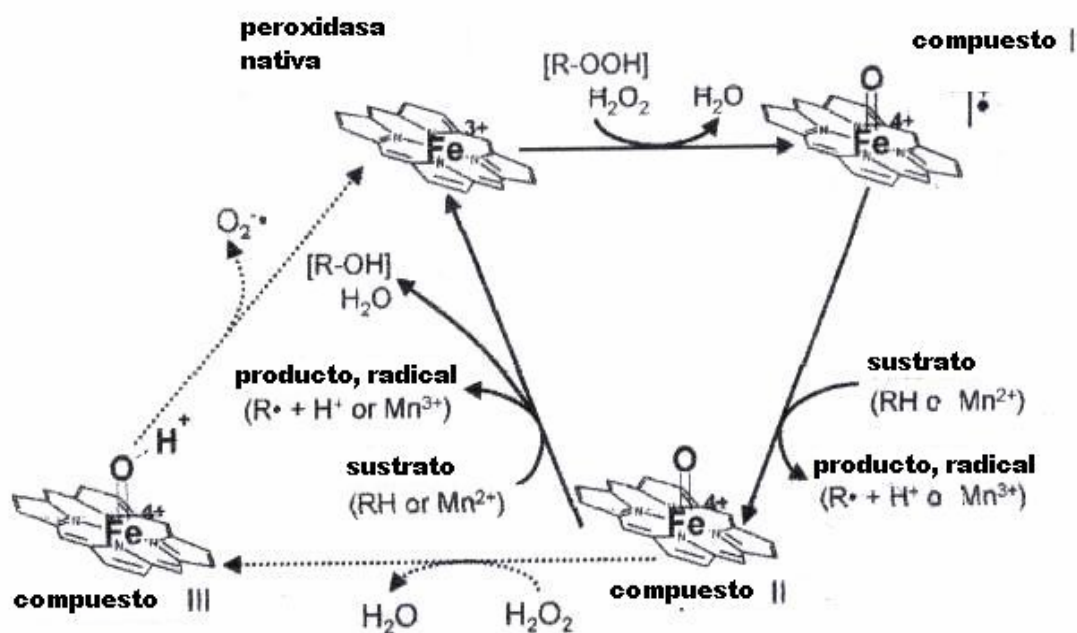


Figura 2. Ciclo catalítico de las peroxididasas (tomado de Wesenberg y col., 2003).

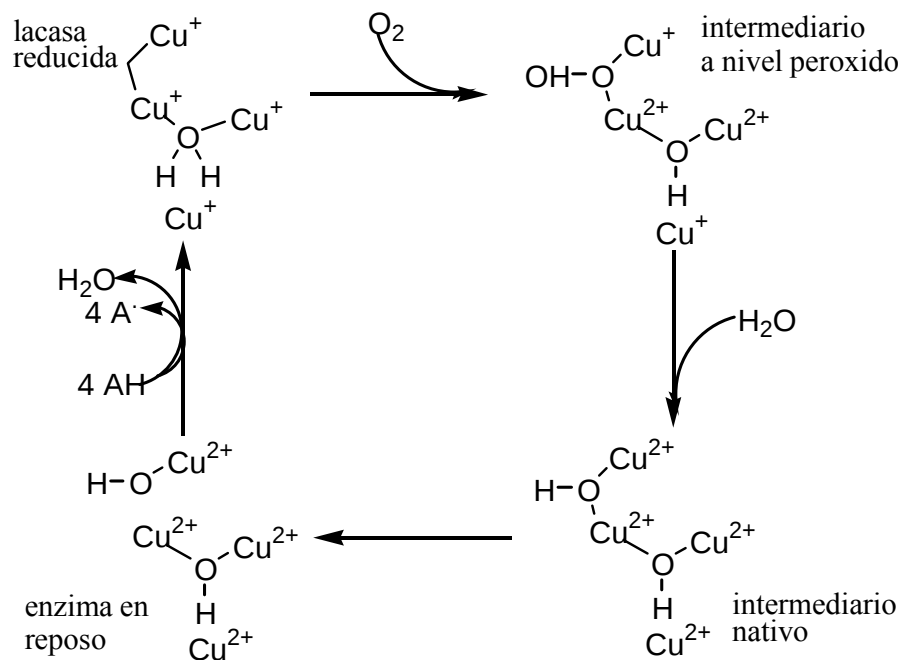


Figura 3. Ciclo catalítico de la lacasa (tomado de Wesenberg y col., 2003).

Tabla 2. Principales hongos basidiomicetos de pudrición blanca empleados para el tratamiento de la vinaza o compuestos relacionados.

Objeto de estudio	Microorganismo	Referencias
Vinaza y melanoidinas	<i>Phanerochaete sp.</i> <i>Coriolus sp.</i> <i>Trametes sp.</i> <i>Flavodon flavus</i>	Dahiya y col., 2001; Fahy y col., 1997; Fitzgibbon y col., 1995. Miyata y col., 1998 y 2000; Ohmomo y col., 1985; Watanabe y col., 1982. Kahraman y Yesilada, 2003; González, 2001; Benito y col., 1997; Dehorter y Blondeau, 1993. Raghukumar y Rivonkar, 2001.
Melaza	<i>Funalia trogii</i> <i>Bjerkandera sp.</i> BOS55 <i>Geotricum candidum</i> Dec-1 <i>Coriolus versicolor</i>	Kahraman y Yesilada, 2003. Moreira y col., 1997. Kim and Shoda, 1999a; Kim and Shoda, 1998. Aoshima y col., 1985.
Acido húmico	<i>P. chrysosporium</i> <i>Trametes versicolor</i>	Dehorter y Blondeau, 1992; Blondeau, 1989; Haider y Martin, 1988. Dehorter y Blondeau, 1992.

Tabla 4. Caracterización de los residuales coloreados: vinaza de destilería (V) y de la pasteurización de la pulpa de café (ELP).

Parámetros	V	ELP
pH	4,2 ± 0,2	6,4 ± 0,6
DQO (g/L)	73,6 ± 5,1	59,4 ± 3,3
DBO ₅ (g/L)	48,2 ± 2,4	31,5 ± 3,1
AGV (como acético) (mg/L)	2,25 ± 0,06	0,91 ± 0,04
Sólidos totales (g/L)	58,60 ± 2,90	7,90 ± 0,90
Carbohidratos (g/L)	8,24 ± 0,60	1,15 ± 0,19
Nitrógeno total (mg/L)	707,59 ± 2,11	12,50 ± 1,07
Sulfatos (g/L)	2,15 ± 0, 02	0,08 ± 0,01
Fósforo (mg/L)	4,82 ± 0,12	2,95 ± 0,10
Sodio (g/L)	8,80 ± 0,31	7,9 ± 0,06
Magnesio (g/L)	0,480 ± 0,09	0.008 ± 0,001
Calcio (g/L)	0,106 ± 0,021	0,019 ± 0,005
Cobre (g/L)	0,014 ± 0,001	Trazas
Fenoles (mg/L)	50,5 ± 2,5	25,8 ± 1,7
Color aparente	marrón oscuro	negro
Luminancia (% para dil. 1/10)	30 ± 2,4	50,9 ± 3,1

Los residuales proceden de la Planta de producción de setas comestibles del CEBI (ELP) y de la Fábrica de ron Hatuey de Santiago de Cuba (CUBARON) (V). Se almacenaron a 4 °C en recipientes plásticos y se tomaron alícuotas para la caracterización. Se dan los valores promedios de cinco mediciones ± DS.

AGV: ácidos grasos volátiles; DQO: demanda química de oxígeno; DBO: demanda bioquímica de oxígeno.

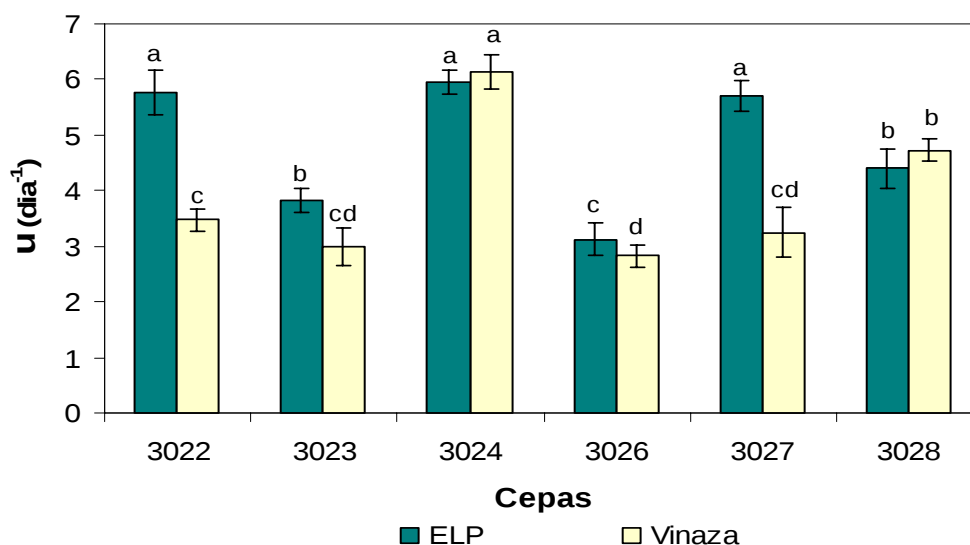


Figura 5. Crecimiento de las cepas de *Pleurotus* en medio agarizado con los residuales de la pasteurización de la pulpa de café (ELP) y vinaza de destilería (V) al 25 % (v:v).

Se empleó como medio el MSH y la inoculación se realizó con fragmentos de cultivos crecidos en APD (0,8 cm de diámetro). La velocidad de crecimiento específico (μ) se calculó a partir de la medición diaria del crecimiento radial del micelio. Las comparaciones estadísticas se realizaron entre las cepas para un mismo residual. Letras diferentes denotan diferencias estadísticas entre las medias según la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan ($p < 0,05$).

Tabla 5. Influencia de la vinaza y el ELP sobre el crecimiento de dos cepas de *Pleurotus* en medio sólido.

Cepa	Medio	% del residual	μ (día ⁻¹)
CCEBI 3024	Vinaza	25	8,69 ± 0,30 ^a
		50	6,28 ± 0,33 ^b
		100	3,62 ± 0,71 ^{cd}
	ELP	25	6,98 ± 1,91 ^{ab}
		50	6,13 ± 0,46 ^b
		100	5,39 ± 0,15 ^b
	Control	-	6,31 ± 0,95 ^b
CCEBI 3022	Control	-	4,69 ± 0,58 ^{bc}
	Vinaza	25	5,66 ± 0,66 ^b
		50	5,12 ± 1,30 ^{bc}
		100	2,17 ± 0,47 ^d
	ELP	25	7,46 ± 0,48 ^{ab}
		50	7,27 ± 1,03 ^{ab}
		100	6,92 ± 0,72 ^{ab}

Los supraíndices corresponden a los indicadores de significancia estadística según Prueba de Rangos Múltiples de Duncan ($p < 0,05$). Letras iguales, no existen diferencias estadísticamente significativas. Se muestran los valores promedios de cinco réplicas $\pm$ desviación estándar. Se tomó como control el crecimiento en MSH. μ : velocidad específica de crecimiento.

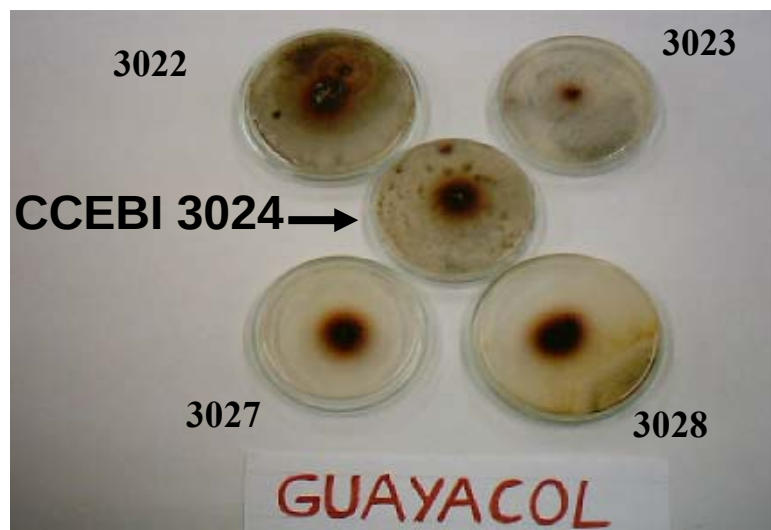


Figura 6. Formación del halo de color púrpura resultado de la oxidación del guayacol por las fenoloxidasas excretadas por cepas de *Pleurotus sp.* (CCEBI 3022, 3023, 3024, 3027, 3028).

El guayacol fue adicionado al medio MSH en una concentración de 10 mmol/L empleando un filtro bacteriológico. El pH de los medios agarizados fueron ajustados a 6,5 con buffer McIlvaine. El inóculo consistió en fragmentos de micelio (0,8 cm de diámetro) crecidos en APD. El tiempo de crecimiento fue de siete días.

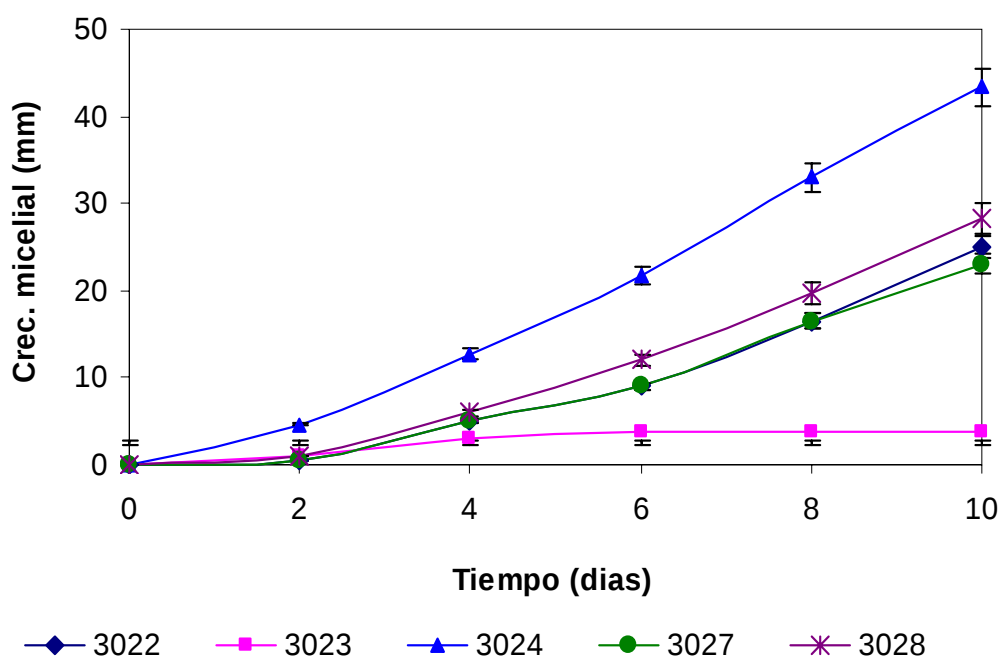


Figura 7. Crecimiento de las cepas de *Pleurotus sp.* en medio sólido MSH (placas Petri) con guayacol (10 mmol/L) a pH 6,5.

Tabla 6. Influencia de diferentes fuentes carbonadas en el crecimiento de *Pleurotus* sp. CCEBI 3024 y decoloración de los residuales estudiados.

Tratamientos	Biomasa (g/L)	Rendimiento Yx/s	% R (color)	Lac (U/mL)
V + Glucosa + MSH	19,31 ^a	0,96 ^a	56 ^a	3,93 ^a
V + Sacarosa + MSH	18,12 ^a	0,91 ^a	58 ^a	2,51 ^a
V + Glicerol + MSH	15,86 ^{ab}	0,79 ^{ab}	63 ^a	1,64 ^a
ELP + Glucosa + MSH	13,27 ^b	0,66 ^b	66 ^a	2,19 ^a
ELP + Sacarosa + MSH	6,16 ^c	0,31 ^c	52 ^a	1,77 ^a
ELP + Glicerol + MSH	10,77 ^{bc}	0,54 ^{bc}	66 ^a	2,34 ^a

V: vinaza; ELP: residual de la pasteurización de la pulpa de café; MSH: medio sintético para hongos; Lac: lacasa; Yx/s: rendimiento biomasa/sustrato. Las fuentes carbonadas se adicionaron en una concentración de 20 g/L. Los supraíndices son el grado de significación según la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan ($p < 0,05$), letras desiguales para diferencias estadísticas probadas. Se muestra el promedio de cinco réplicas para cada tratamiento y los CV no sobrepasan el 10 % en todos los casos. El cultivo fue sumergido, agitado (120min^{-1}) y con los residuales al 50 % (v:v). La actividad enzimática tomada como referencia es la lacasa y se determinó usando el guayacol como sustrato.

Tabla 7. Evaluación de la influencia de diferentes concentraciones de glucosa en la decoloración del residual de la pasteurización de la pulpa de café (ELP) y la vinaza de destilería (V), por *Pleurotus* sp. CCEBI 3024.

Tratamientos	Peso seco (g/L)	Lacasa (U/mL)	R (color) %
V+5g/L	8,24 ± 0,32 ^b	7,32 ± 1,21 ^a	13,6 ± 3,8 ^c
V+10g/L	7,80 ± 0,34 ^c	7,05 ± 0,91 ^a	22,5 ± 1,6 ^b
V+20g/L	9,69 ± 0,44 ^a	7,91 ± 1,50 ^a	26,0 ± 2,8 ^b
ELP+5g/L	1,42 ± 0,70 ^e	3,18 ± 1,23 ^b	8,1 ± 2,0 ^c
ELP+10g/L	4,37 ± 1,01 ^d	2,19 ± 0,65 ^b	23,3 ± 3,2 ^b
ELP+20g/L	8,26 ± 0,24 ^b	1,88 ± 0,53 ^b	57,1 ± 4,5 ^a

Los experimentos se realizaron con los residuales al 50 % en MSH. Se reflejan los valores promedios para cinco réplicas y la desviación estándar ($\pm$ DE). Los supraíndices son el grado de significación según la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan ($p < 0,05$). Letras iguales en una misma columna, no existen diferencias significativas entre los tratamientos. La actividad lacasa se determinó usando guayacol como sustrato.

Tabla 8. Evaluación de la influencia de los diferentes componentes del medio de cultivo en el tratamiento biológico del residual de la pasteurización de la pulpa de café (ELP) con *Pleurotus sp.* CCEBI 3024

Tratamientos	Biomasa (g/L)	% R color	% R DQO	Lacasa (U/mL)
ELP (50 %)	0,26 ± 0,04 ^d	15,0 ± 1,2 ^c	25 ± 5,1 ^d	1,07 ± 0,11 ^c
MBH	7,30 ± 0,51 ^b	-	-	0,14 ^d
MSH	6,90 ± 0,32 ^b	-	-	0,19 ^d
ELP (50 %) + MBH	13,27 ± 1,21 ^a	65,0 ± 4,3 ^b	60,0 ± 2,3 ^b	2,19 ± 0,06 ^b
ELP (50 %) + glu + microelementos	8,2 ± 1,44 ^b	60,0 ± 1,8 ^b	55,5 ± 4,4 ^b	2,30 ± 0,09 ^b
ELP (50 %) + glu	3,15 ± 0,70 ^c	58,0 ± 2,2 ^b	46,5 ± 2,0 ^c	1,27 ± 0,09 ^c
ELP (50 %) + MSH	11,80 ± 1,01 ^a	74,6 ± 4,1 ^a	71,6 ± 1,6 ^a	4,53 ± 0,82 ^a
ELP (100 %) + MSH	14,6 ± 0,77 ^a	68,6 ± 3,9 ^a	49,7 ± 2,2 ^c	5,70 ± 0,5 ^a

MS: medio sintético para hongos y MBH: medio basal para hongos; glu: glucosa (20 g/l). Los microelementos son los que aparecen descritos en el MBH. Los valores son el promedio de cinco réplicas en cada tratamiento y se expresan con sus desviaciones estándares. Entre paréntesis se especifica la dilución del residual. Letras diferentes en los supraíndices, denotan diferencias estadísticas significativas según Prueba de Rangos Múltiples de Duncan ($p < 0,05$).

Tabla 9. Influencia de la utilización de diferentes medios de cultivo y la suplementación con cobre, en la decoloración de la vinaza de destilería (V) con *Pleurotus sp.* CCEBI 3024.

Tratamientos	Biomasa (g/L)	% R (color)	A.E (U/mL)
V + Glu *	6,32 ± 0,43 ^c	61,2 ± 5,1 ^a	3,19 ± 0,70 ^c
V + MSH	9,85 ± 0,77 ^b	59,1 ± 4,6 ^a	6,93 ± 0,43 ^{ab}
V + PDY	14,75 ± 0,44 ^a	65,2 ± 3,4 ^a	7,19 ± 0,35 ^a
V + MSH+ Cu	9,60 ± 0,23 ^b	58,1 ± 4,4 ^a	5,85 ± 0,22 ^b

Glu: glucosa (20 g/L), MSH: medio sintético para hongo, PDY medio papa dextrosa-extracto de levadura, Cu: cobre. La vinaza se emplea diluida 1:1 (v:v) con agua destilada (*) o los medios sintéticos ensayados. El cobre se adiciona en una concentración de 150 $\mu\text{mol/L}$. La actividad enzimática determinada es la lacasa y se utilizó guayacol como sustrato. Letras diferentes en los supraíndices, denotan diferencias estadísticas significativas según Prueba de Rangos Múltiples de Duncan ($p < 0,05$).

Tabla 10. Influencia de la agitación (120 min^{-1}) en el cultivo de *Pleurotus sp.* CCEBI 3024 en medios con los residuales para la remoción de la carga orgánica (DQO) y el color.

Tratamientos	Biomasa (g/L)	Color removido (%)	DQO removido (%)
ELP + MSH agitado	$8,20 \pm 0,97^a$	$74,6 \pm 2,5^a$	$71,6 \pm 3,6^a$
ELP + MSH estático	$2,45 \pm 0,78^b$	$49,7 \pm 4,7^b$	$49,2 \pm 3,0^b$
V + MSH agitado	$14,00 \pm 1,32^a$	$54,7 \pm 3,1^a$	$59,5 \pm 4,2^a$
V + MSH estático	$4,60 \pm 1,04^b$	$25,5 \pm 1,6^b$	$21,4 \pm 3,1^b$

ELP: residual de la pasteurización de la pulpa de café; V: vinaza de destilería. Ambos residuales se adicionaron hasta dilución 1:1 (v:v) con el medio sintético para hongos (MSH). Se reflejan los valores promedios de cinco réplicas $\pm$ la desviación estándar. Letras iguales para un mismo residual, refiere no existencia de diferencias estadísticas significativas entre las medias de los tratamientos (Prueba de Duncan, $p < 0,05$). Los cultivos agitados se pusieron en zaranda rotatoria a 120 min^{-1} .

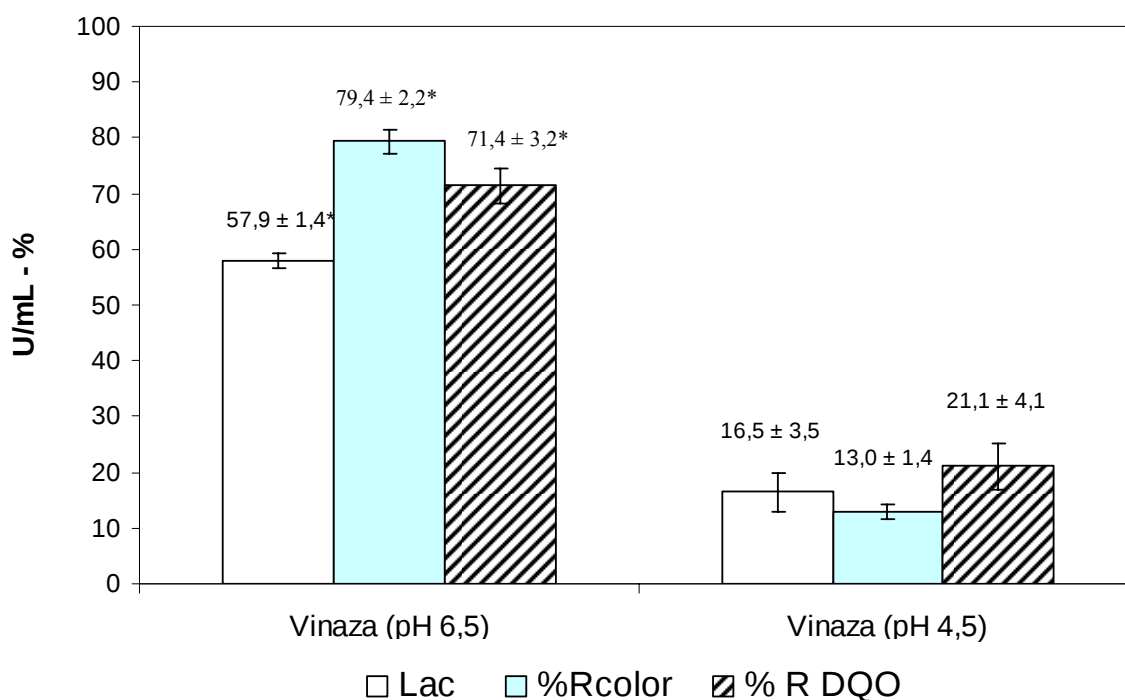


Figura 10. Efecto del pH inicial del medio en el proceso de decoloración de la vinaza de destilería por *Pleurotus sp.* CCEBI 3024.

El valor de pH 4,5 se logró con la adición de vinaza sin posterior ajuste del mismo en el medio de cultivo. Se expresan los valores promedios de cinco réplicas más la desviación estándar de los datos en el gráfico. Las mediciones se realizaron en el sobrenadante de cultivo a los 15 días. Las determinaciones resultaron estadísticamente diferentes según prueba t de "student" para valores no pareados: $*(p < 0,001)$.

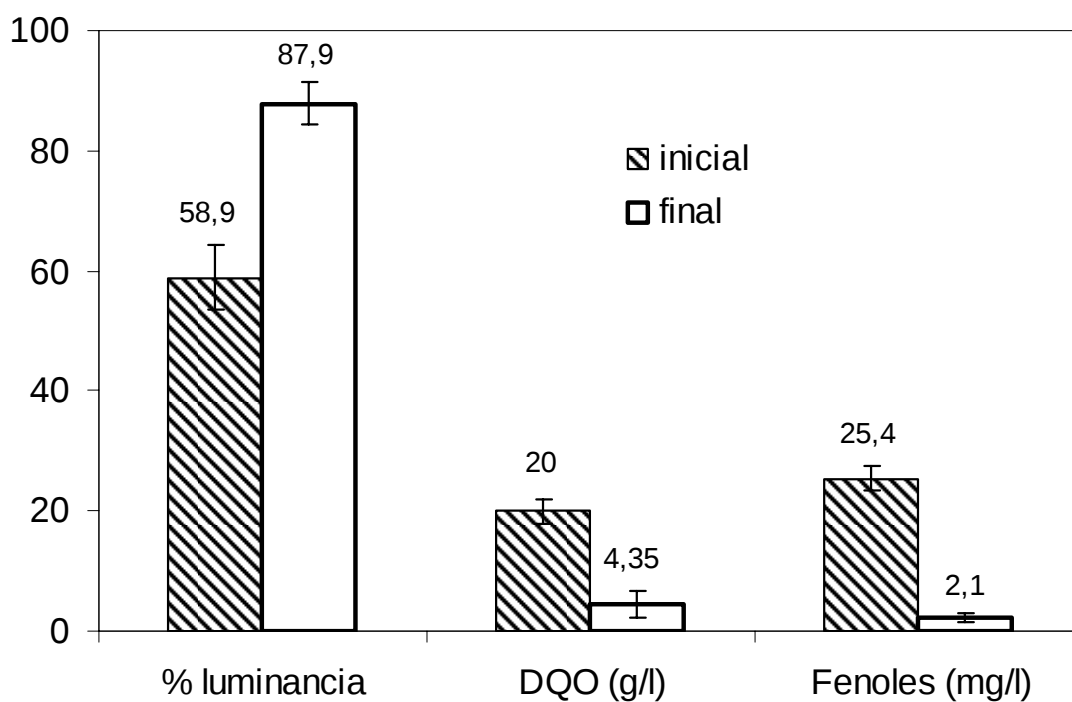


Figura 11. Efecto del tratamiento por 15 días del ELP con *Pleurotus* sp. CCEBI 3024 sobre los parámetros de contaminación medidos (color, carga orgánica, fenoles).

Los datos graficados son el promedio de tres experimentos independientes realizados. Para cada parámetro medido se expresa en el gráfico el valor promedio de 5 réplicas con su barra de error. El tratamiento se hizo bajo condiciones de cultivo agitado (120 min^{-1}), a 30°C , en la oscuridad y a pH 6,5. La luminancia es el método escogido para medir el color de las muestras.

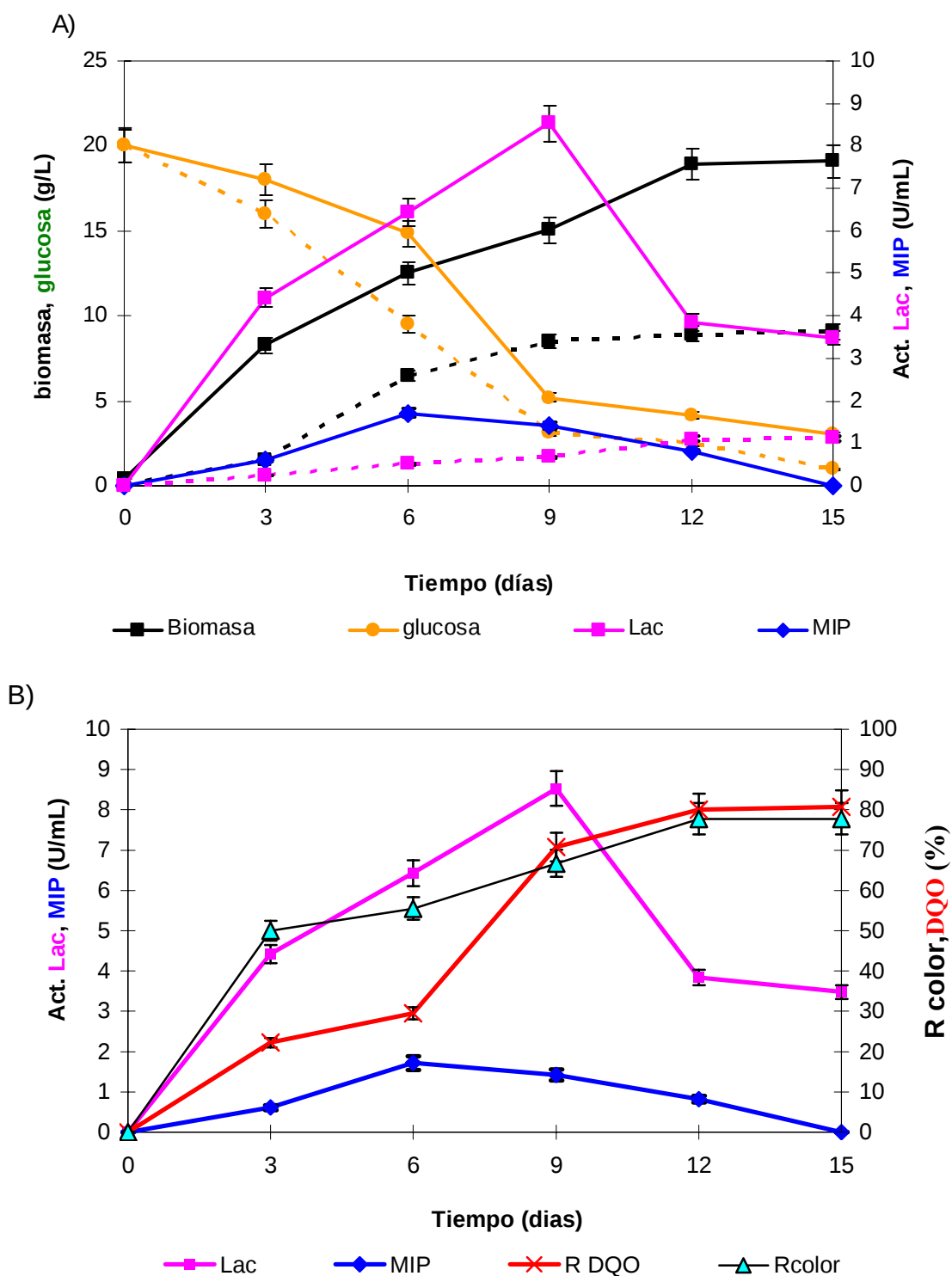


Figura 12. Cinética de crecimiento y producción enzimática ligninolítica durante la biodecoloración del ELP con *Pleurotus sp.* CCEBI 3024.

Se ofrecen los valores promedios de las determinaciones, para dos repeticiones independientes del experimento, con cinco réplicas para cada tiempo. El residual se utilizó al 100 % con la adición de los componentes del medio MSH. En el grafico A se muestran en discontinuo los valores obtenidos en el medio control (MSH sin ELP) y en continuo los del medio con residual. En el grafico B refleja el comportamiento de la remoción del color y la DQO, en los cultivos con ELP. La actividad Lac se determinó usando el guayacol como sustrato.

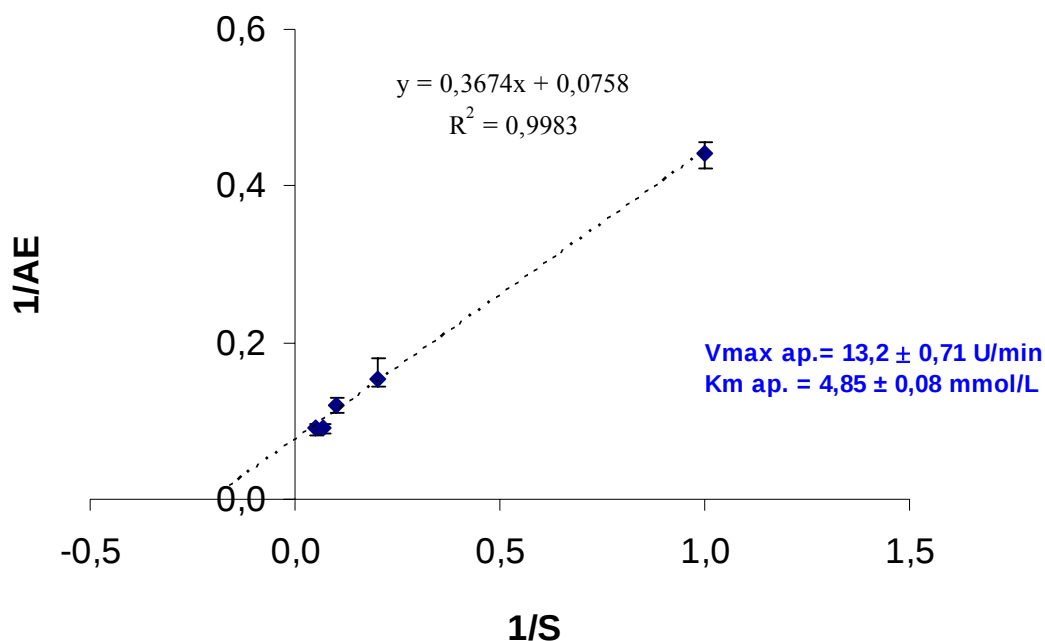


Figura 13. Determinación de los parámetros cinéticos enzimáticos que caracterizan la actividad del extracto enzimático crudo obtenido del cultivo de *Pleurotus sp.* CCEBI 3024 en ELP, frente al guayacol usado como sustrato.

Se ensayaron diferentes concentraciones de guayacol (0-20 mmol/L) y se determinaron las actividades (A.E) de Lac fijando 5 minutos como tiempo de ensayo. Luego se realizó la determinación de los inversos de las A.E y de la concentración de guayacol (Transformación de Lineweaver-Burk). Cada punto constituye la media de cinco mediciones y se tomaron dos réplicas del cultivo. El extracto enzimático crudo proviene de un cultivo de 15 días. Previo al ensayo cinético, se añadió al extracto enzimático KCN (10 μ mol/L).

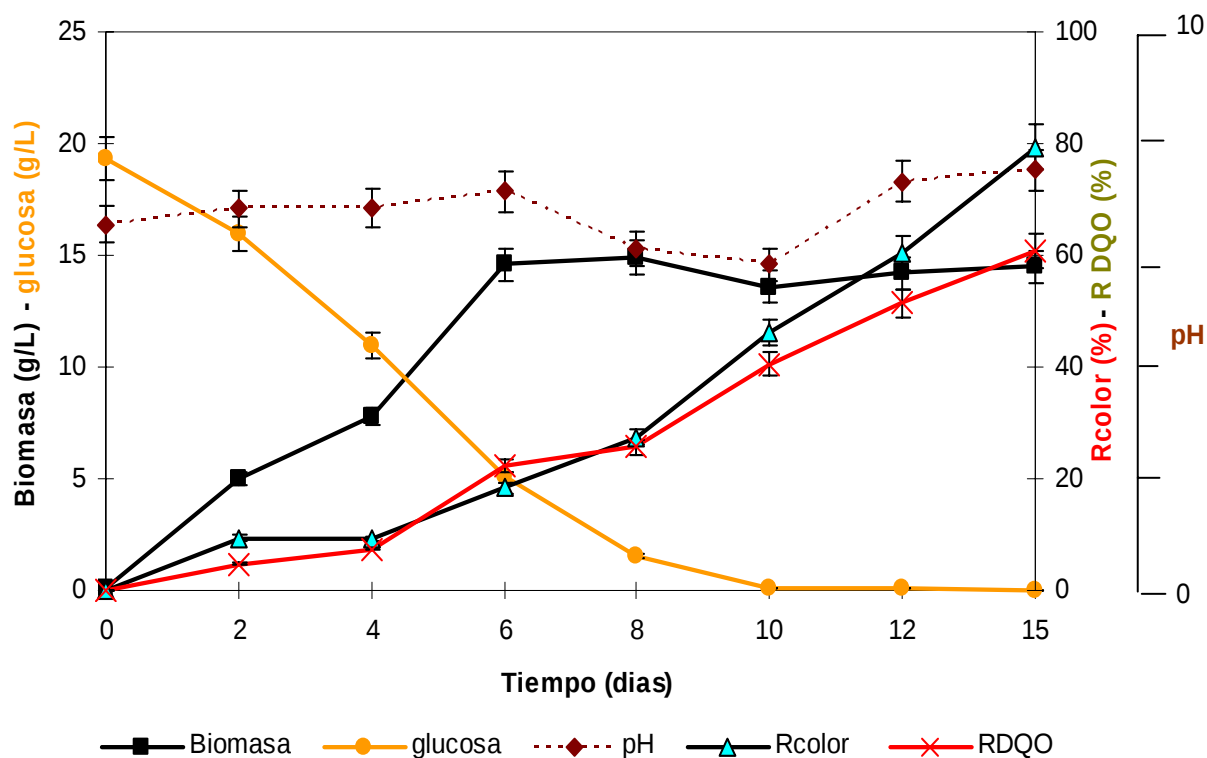


Figura 14. Decoloración de la vinaza (50 %) con *Pleurotus* sp. CCEBI 3024 y su relación con el crecimiento.

El cultivo se desarrolló en PDY con el residual, con un pH inicial de 6,5, agitado (120 min^{-1}) y en la oscuridad. Cada punto es el valor promedio de tres réplicas. Los datos son el promedio de dos experimentos independientes. La inoculación se realizó según procedimiento descrito en el apartado II.5.1b de Materiales y métodos. El color se expresa como luminancia (% L) y la remoción de color se calculó a partir de la conversión de ésta a absorbancia ($A=2-\log L$)

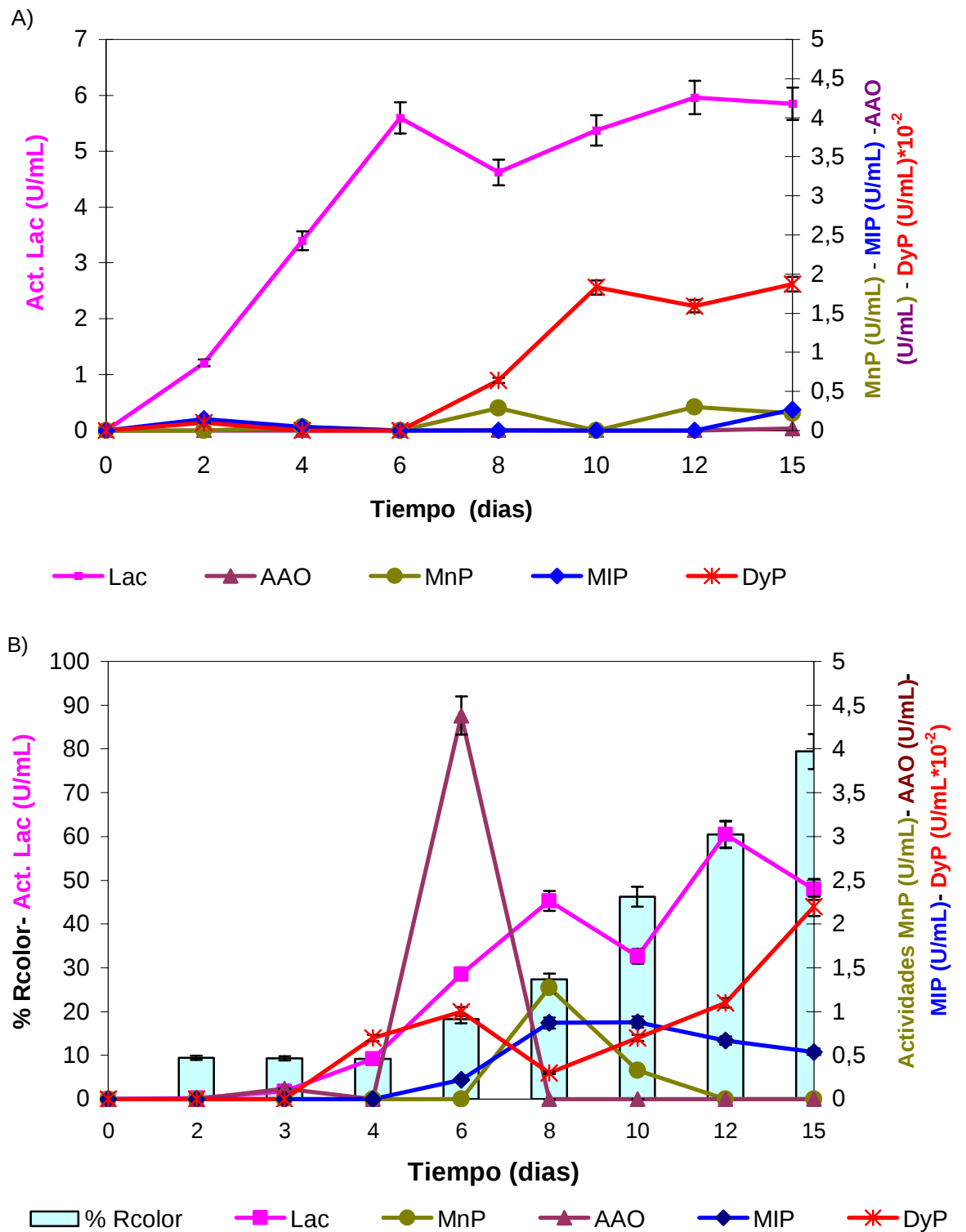


Figura 15. Producción de enzimas ligninolíticas durante el crecimiento de *Pleurotus* sp. CCEBI 3024 y decoloración del medio con vinaza. A) medio PDY, B) medio PDY + V (50 % v:v):

La actividad Lac se realizó usando ABTS como sustrato. Cada punto es el valor promedio de tres mediciones y se hicieron tres réplicas del cultivo.

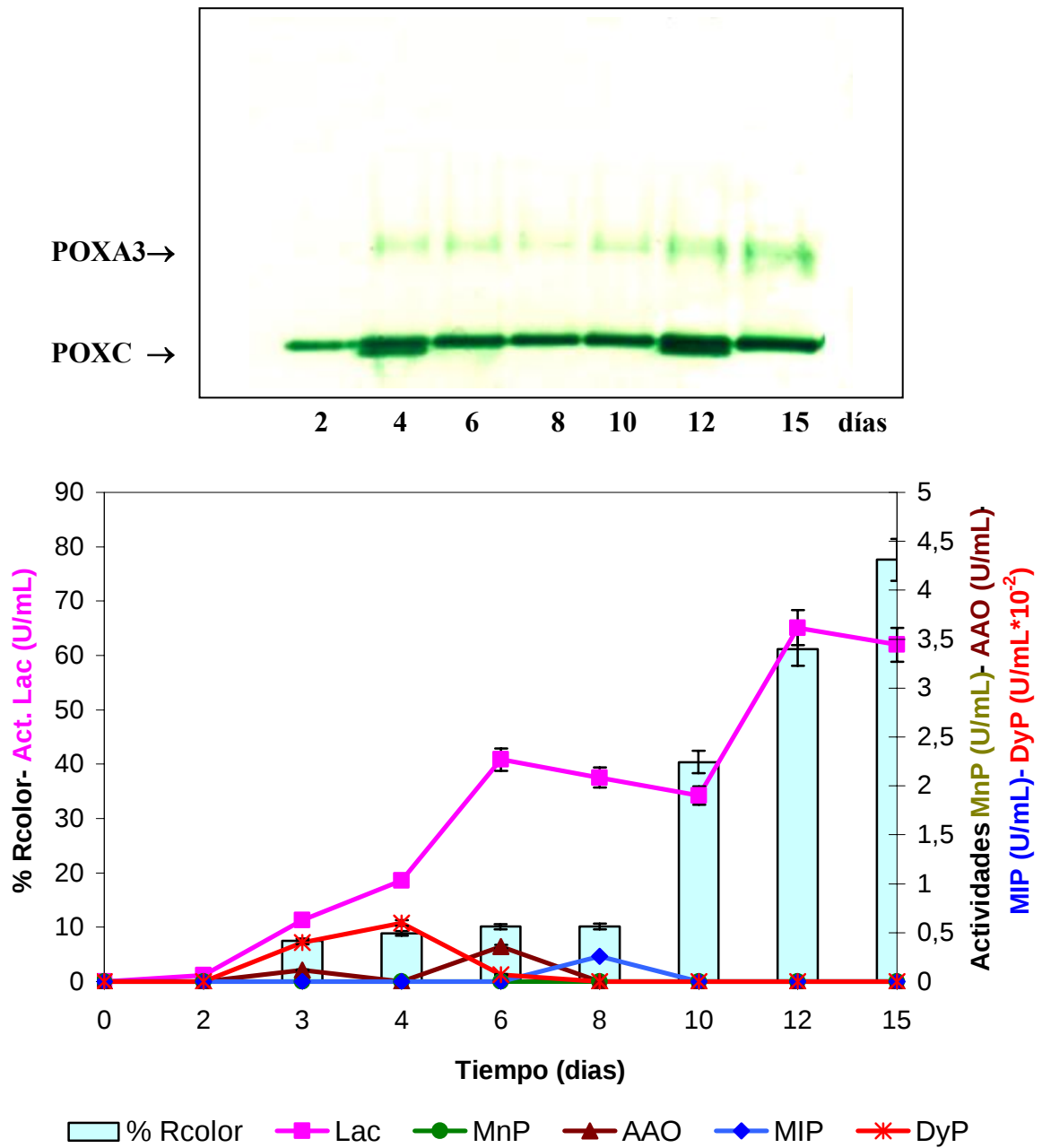


Figura 16. Decoloración de la vinaza por la cepa de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kummer (var. Florida). Se muestra además, el comportamiento de las isoenzimas de Lac durante el proceso de decoloración por este hongo.

La vinaza se adicionó al 50 % al medio PDY. El cultivo fue agitado (120 min^{-1}) e incubado a 30°C . La Lac fue determinada usando ABTS como sustrato y se tomaron alícuotas del sobrenadante para cada tiempo. Los valores que se grafican constituyen el promedio de 5 réplicas del cultivo, para cada tiempo. Se realizaron dos experimentos independientes. La electroforesis (zimograma) se realizó en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes, a pH alcalino y se cargaron $12 \mu\text{L}$ del sobrenadante del cultivo. Se revelaron las bandas con ABTS.

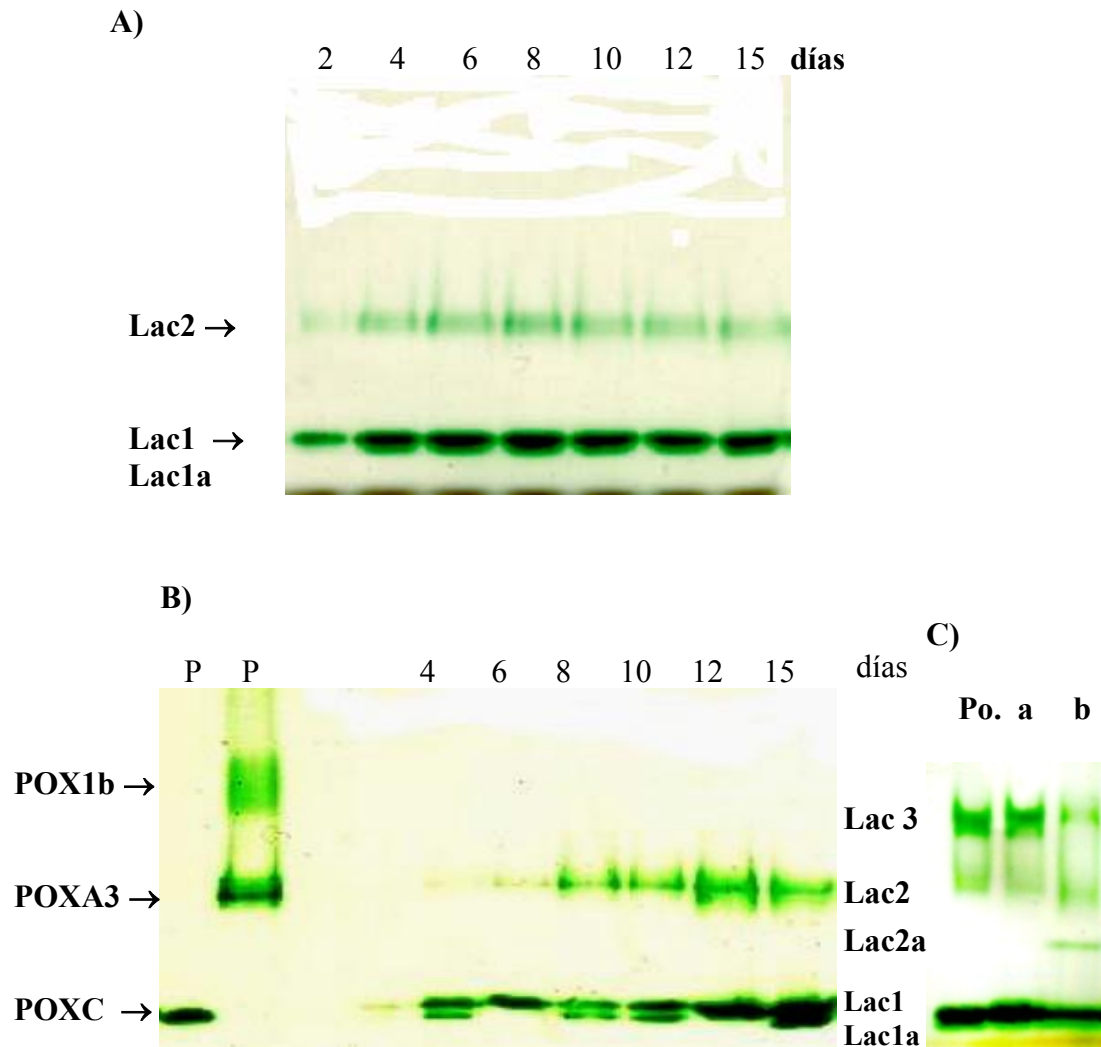


Figura 17. Zimogramas de lacasas producidas por *Pleurotus sp.* CCEBI 3024. Se tomaron alícuotas del sobrenadante de cultivos de 15 días en medio PDY (A) y PDY-vinaza 50 % (B). También se compararon los perfiles isoenzimáticos al 2do día (C) utilizando un caldo de cultivo de la cepa control de *P. ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kummer (var. Florida) (Po): a) cultivos de CCEBI 3024 en PDY, b) cultivos de CCEBI 3024 en vinaza.

Los zimogramas se corrieron en condiciones alcalinas y se emplearon patrones de isoenzimas purificadas (P: POXC, POXA3, POX1b). Se reveló con ABTS. Se cargaron 12 uL de muestras en los pocillos para la electroforesis (A) y (B). Para la corrida (C) se adiciono 16 uL de muestra y se esperó más tiempo en el revelado.

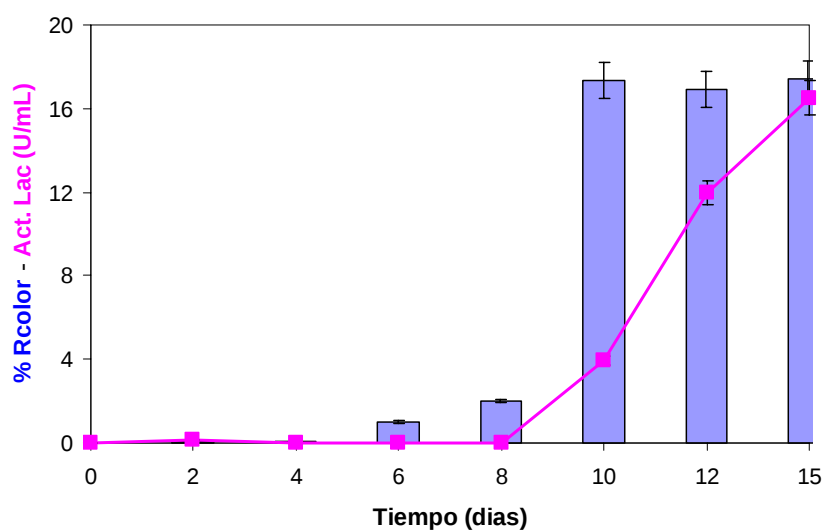
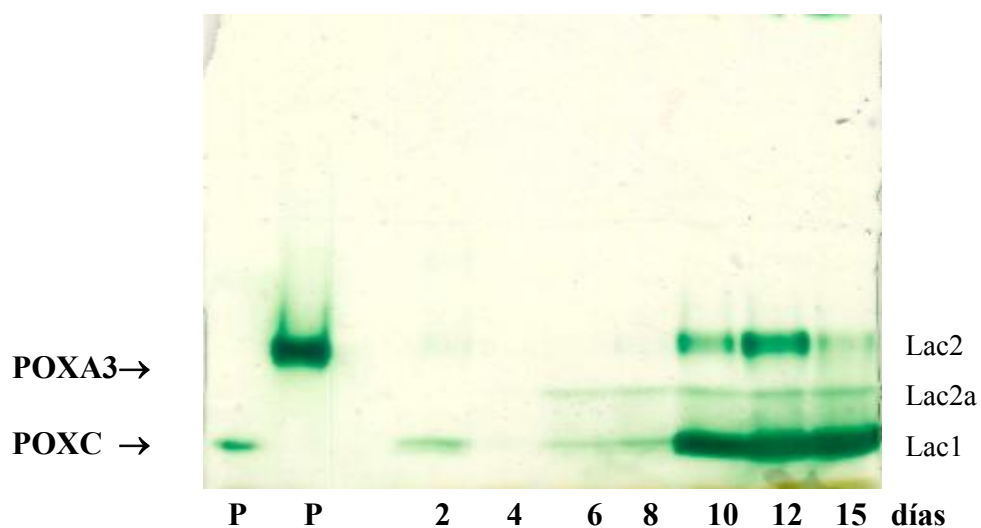
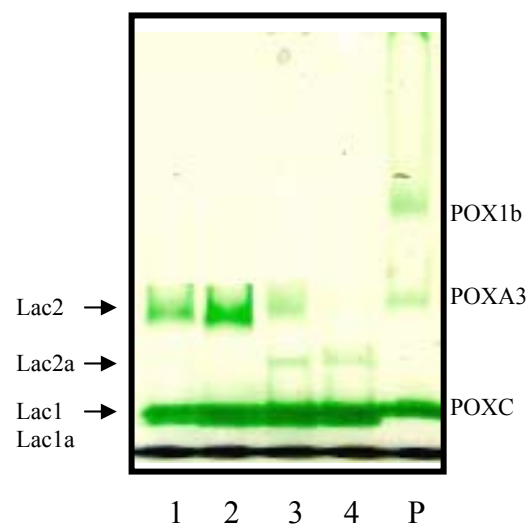


Figura 18. Zimograma y gráfico de actividad Lac (líneas) y remoción del color (barras) en la biodecoloración de vinaza por *Pleurotus sp.* CCEBI 3024 a pH 4,5.

Para los zimogramas se cargaron con 12 μ L en los pocillos del gel y se corrieron las muestras a pH alcalino y en condiciones no desnaturizantes. Se utilizaron isoenzimas purificadas como patrones (P). Se reveló con ABTS.



1. CCEBI 3024 en PDY
2. CCEBI 3024 en vinaza (pH 6,5)
3. CCEBI 3024 en vinaza (pH 4,5)
4. CCEBI 3024 en vinaza (adición de PMSF)

Figura 19. Efecto del pH del medio y de la adición de PMSF al cultivo, sobre la actividad de las isoenzimas de lacasa, del organismo *Pleurotus sp.* CCEBI 3024.

Los cultivos contienen vinaza al 50 % (v:v). El PMSF se añadió diariamente a partir del segundo día de cultivo en una concentración de 0,1 mmol/L. La electroforesis fue corrida en condiciones nativas, alcalinas y los zimogramas revelados con ABTS. Se tiene una muestra control consistente en sobrenadante de cultivo en PDY.

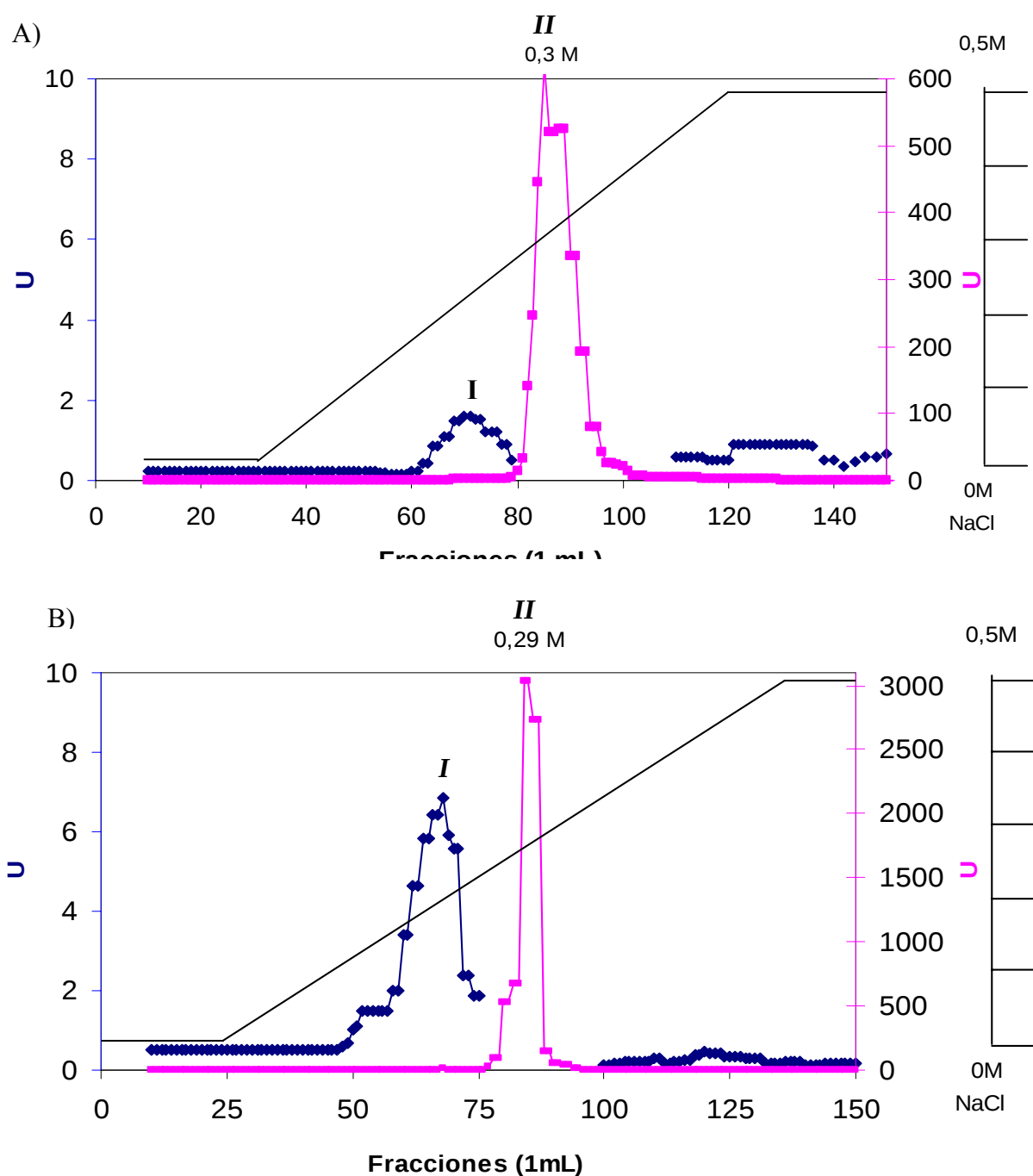


Figura 20a. Fraccionamiento cromatográfico de crudos proteicos extracelulares de cultivos con PDY (A) y PDY- vinaza (B).

Se realizó el fraccionamiento de cultivos de *Pleurotus* sp. CCEBI 3024 para el día 12 donde se detectó la mayor actividad Lac. Se filtró el cultivo para separar el micelio y se tomó el sobrenadante. Se utilizó una cromatografía en DEAE-Sepharose Fast Flow según especificaciones en el epígrafe II.9 de Materiales y métodos y se eluyó en un gradiente de NaCl de 0-0,5 mol/L. Se empleó dos escalas para la AE (Lac) en cada cromatograma por la diferencia en los picos I y II.

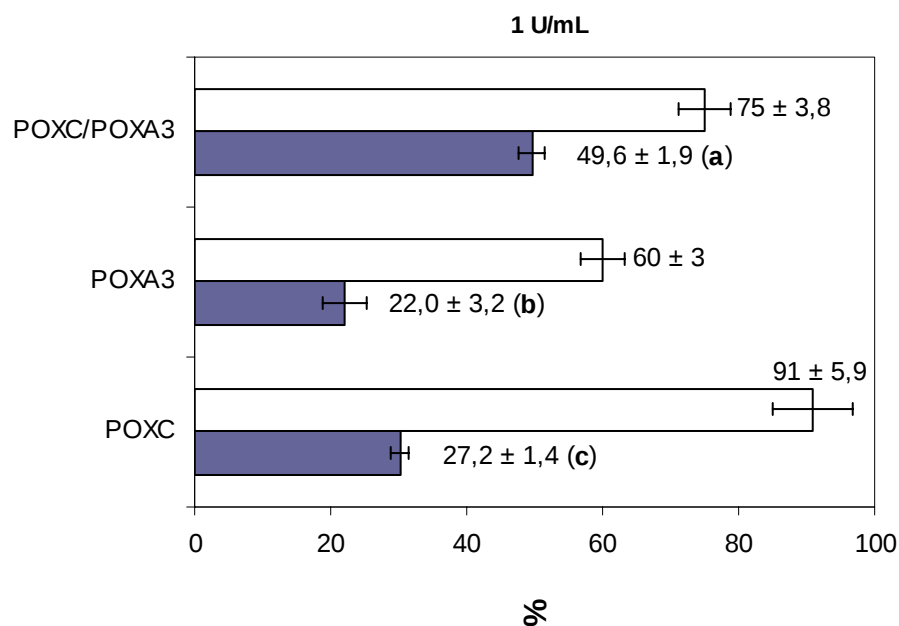


Figura 21. Decoloración de la vinaza (diluida al 50 %) con isoenzimas purificadas de lacasa (POXC, POXA3) (■) y estabilidad de las enzimas en presencia del residual (□).

La actividad Lac en cada ensayo fue de 1 U/mL y el tiempo de ensayo fue de 24 horas. Se utilizó el ABTS como sustrato para determinar la actividad Lac. La decoloración se dio en % remoción de color y la estabilidad de la enzima, en % de actividad residual. Los ensayos se realizaron sin ajuste de pH donde el valor del mismo osciló de 4,45-4,50. Cada valor graficado es el promedio de cinco determinaciones y las letras dentro de paréntesis indican grado de significación estadística, según prueba de Rangos Múltiples de Duncan ($p < 0,05$). Letras diferentes indican diferencias estadísticas entre las medias.

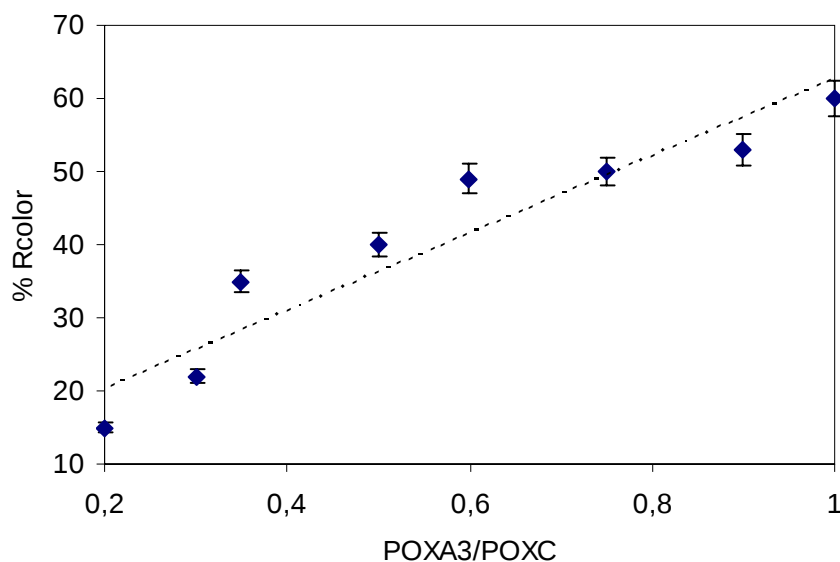


Figura 22. Decoloración de la vinaza con diferentes relaciones de isoenzimas de lacasa purificada (POXC y POXA3).

La actividad lacasa total en cada punto fue de 10 U/mL ($r^2=0,93$; $p=0,003$). El tiempo de ensayo fue de cuatro horas. Cada punto representado es el promedio de tres réplicas.

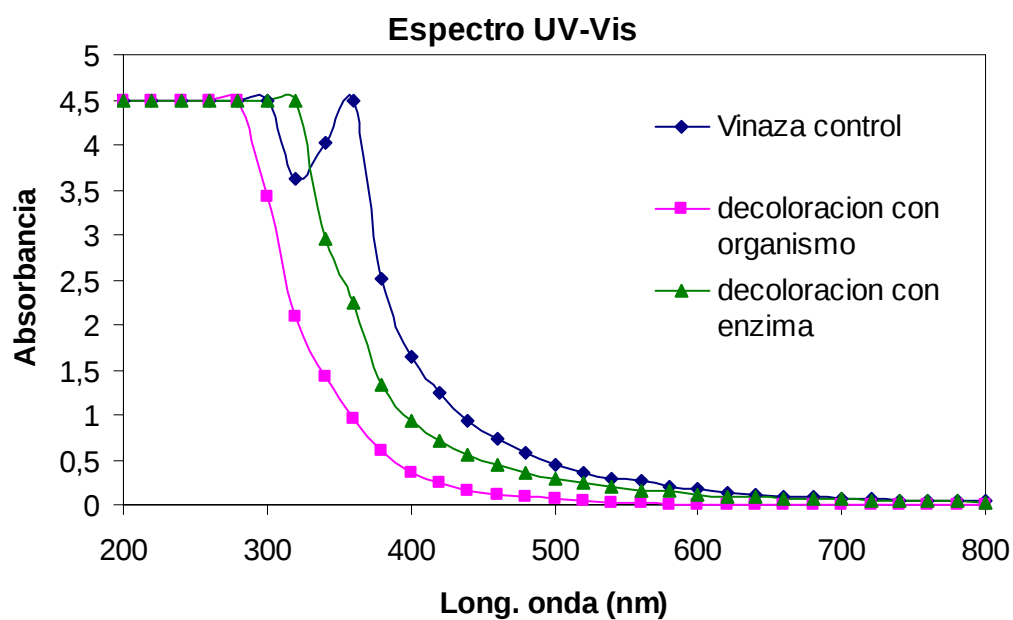


Figura 23. Espectros de las vinazas después de la biodecoloración con *Pleurotus* sp. CCEBI 3024 y sus enzimas.

Se monitoreó la absorbancia para las longitudes de onda de 200-800 nm. Se realizaron diluciones 1:10 a las muestras, previo a su lectura. Cada tratamiento se realizó por triplicado.



Decoloración del ELP con *Pleurotus* sp. CCEBI 3024
(al centro se muestra el residual sin tratar).



Decoloración de la vinaza con *Pleurotus* sp. CCEBI 3024
(a la derecha se muestra el residual sin tratar)

Tabla 11. Resultados del tratamiento de la vinaza con *Pleurotus sp.* CCEBI 3024

Organismo utilizado	R color %	R DQO %	R fenoles %	pH final	R toxicidad %
<i>Pleurotus sp.</i> CCEBI 3024	79,4 ± 2,9	62,5 ± 3,1	79,9 ± 0,31	7,5 ± 0,2	100 ± 0,9
<i>Pleurotus ostreatus</i>	77,7 ± 3,1	58,9 ± 1,9	65,2 ± 0,61	7,8 ± 0,5	92,0 ± 2,2
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	90,5 ± 2,8	77,6 ± 4,4	80,5 ± 0,93	6,1 ± 0,8	87,5 ± 1,7

Los cultivos con los microorganismos se realizaron con PDY-vinaza (50%) en cultivo sumergido agitado (120 min^{-1}), pH 6,5 y a 30°C . El color se determinó por el método de luminancia y para la toxicidad se empleó *Bacillus cereus* como organismo indicador.

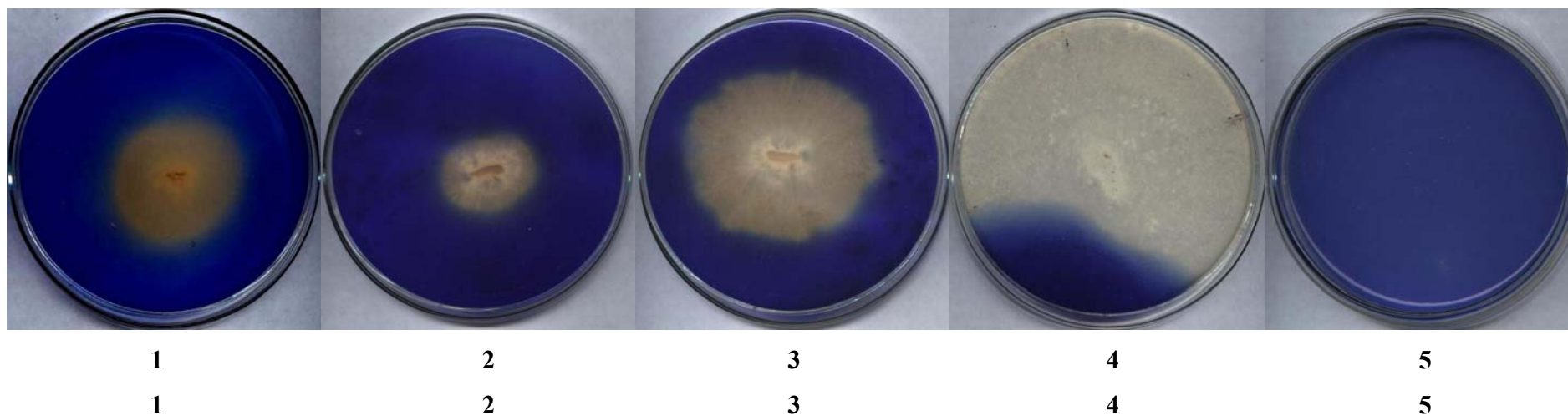


Figura 8. Decoloración de la anilina por varias cepas de hongos de pudrición blanca: *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kummer (var. Florida) (1), *Pleurotus* sp. CCEBI 3022 (2), *Pleurotus* sp. CCEBI 3024 (3), *P. chrysosporium* (4). Se utilizó una placa control (5) sin inocular. Se muestra el envés de la placa a los siete días.

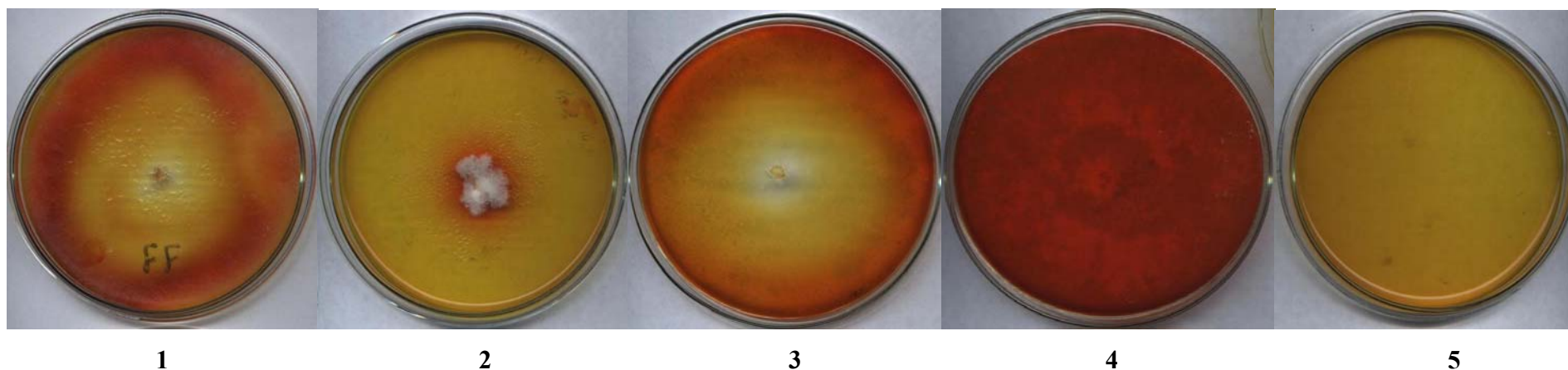


Figura 9. Oxidación y decoloración del rojo fenol por varias cepas de hongos de pudrición blanca: *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kummer (var. Florida) (1), *Pleurotus* sp. CCEBI 3022 (2), *Pleurotus* sp. CCEBI 3024 (3), *P. chrysosporium* (4). Se utilizó una placa control (5) sin inocular. El ensayo fue realizado a pH 6,5. El color rojo es indicio de oxidación de este colorante y sólo la (3) presenta un halo de decoloración al centro.

	PDY	PDY-Vinaza
Fraccion I	0,41%	1,10%
Fraccion II	68,78%	85,11%

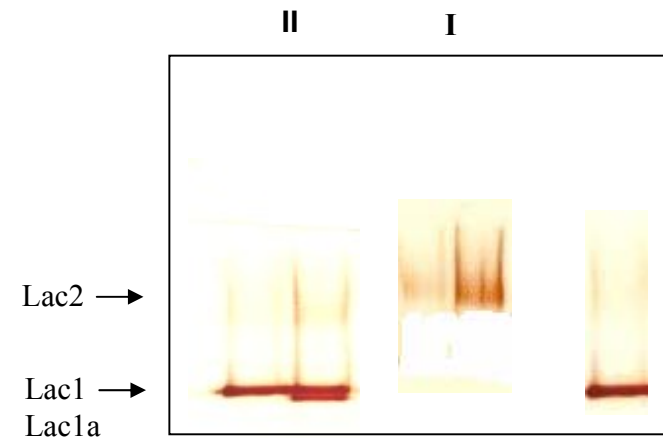


Figura 20b. Se muestran los aportes de enzima lacasa de cada fracción (I y II) c A B A B POXC ogramas correspondiente a cada pico cromatográfico, en muestras que proceden del sobrenadante del cultivo de *Pleurotus sp.* CCEBI 3024 en PDY (A) y PDY- vinaza (B).

Se calcularon las actividades enzimáticas específicas de las colectas de cada fracción y luego se determinó el % de estas con respecto al total. Para los zimogramas se cargaron en los pocillos 0,02 U de actividad lacasa (usando ABTS como sustrato). La electroforésis fue en condiciones no desnaturizantes, pH alcalino y fueron reveladas las bandas con 2,6-dimetoxifenol.

Tabla 1. Ejemplos de hongos empleados para la decoloración de las aguas residuales de la destilería (vinaza). Son descritas las condiciones de cultivo y el efecto del tratamiento con estos microorganismos (tomado de Coulibaly y col., 2003).

Efluente	Hongo	Tratamiento		Referencias
		Reactor y condiciones de cultivo usados	Parámetros	
Vinaza destilería.	<i>Geotrichum. candidum</i> ; <i>Mycelia sterilia</i>	Células inmovilizadas en alginato de calcio	Decoloración (53 %, 10d); inhibición de la velocidad de crecimiento en diluciones por debajo del 50 %. Sólo 3 % remoción del color en diluciones del residual al 25 %.	FitzGibbon y col. (1995)
	<i>P. chrysosporium</i> ;	Dilución 6,25 %, suplementado con glucosa (25 g/L).	Decoloración de melanoidinas (80%) por <i>P. chrysosporium</i> JAG-40.	Fahy y col. (1997)
	<i>Aspergillus. awamori</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i>	Cultivo agitado en frascos, burbujeo continuo, cosustrato (sacarosa, fructosa y glucosa, 10 g/L); MgSO ₄ (1g/L); KH ₂ PO ₄ (0,5 g/L); NH ₄ NO ₃ (1,8 g/L); peptona (5%).	Resistencia específica del medio de cultivo (decrementos del 97,5 %); DBO (56 %); COT (72 %), fosfatos (80%); proteína en micelio (40%), a temperaturas superiores a 40 °C. Incrementa la remoción de la COT del efluente pre-tratado anaeróbicamente. Decoloración 69 %, se evidencia adsorción del micelio.	Miranda y col. (1996) Ohmomo y col. (1987)
	<i>Geotrichum candidum</i>	Reactor agitado; fermentador-Jar de 7 L; inmovilización en espuma de poliuretano; co-sustrato (glucosa 0,5 -1%)	Decoloración (80 %) en 4 semanas; acumulación de peroxidasa.	Kim y Shoda (1999b)
	<i>Trametes versicolor</i> <i>Coriolus versicolor</i>	Reactor agitado; tamaño del inóculo; adición de sacarosa (3 g/L); KH ₂ PO ₄ (0,1g/L). Cultivo agitado en frascos; adición de 5 g/L de glucosa y 50 mg/L de peptona.	Decoloración (82 %); DQO (77%); NH ₄ ⁺ (36 %). Decoloración (65 %); pretratado por digestión anaerobia con 0,1 g/L de DQO	Benito y col. (1997) Ohmomo y col. (1985)
	<i>Coriolus hirsutus</i>	Reactor agitado; reactor continuo, inmovilización en espuma de poliuretano; MnSO ₄ ; co-sustrato (glucosa, etanol).	Decoloración (76%, 12días); COT (45%). Mejora la decoloración previo tratamiento con lodo activado	Miyata y col. (1998 y 2000)
	<i>Flavodon flavu</i> <i>Penicillium. decumbens</i>	Reactor agitado; aireación; co-sustrato (sacarosa, glucosa, manosa, manitol, xilosa, arabinosa, fructosa, glicerol) probados al 10 % el residual.	Decoloración (80%), MnP (400/L); Lac (550 nkat/L) Incremento de la eficiencia de la digestión anaerobia del efluente pre–tratado por <i>P. decumbens</i> .	Raghukumar y Rivoncar(2001); Jiménez y Borja (1997)