

EFFECTO DE LA GLUCOSA Y NITRATO DE AMONIO SOBRE LAS ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS PRODUCIDAS POR *Trametes versicolor* INMOVILIZADO EN ESPUMA Y LA DECOLORACIÓN DE UN EFLUENTE PAPELERO EN UN BIORREACTOR DE LECHO FLUIDIZADO

**M. Martínez-Salgado¹, A. Pedrosa-Rodríguez^{1,2}, R. Rodríguez-Vázquez²,
J. Rosas-Acosta¹**

¹Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial. Departamento de Microbiología.

Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Cra. 7ª No. 40-62 Bogotá, Colombia

²Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN. CINVESTAV. Departamento de Bioingeniería y Biotecnología. Laboratorio de Xenobióticos. México D.F., México

jrosas@javeriana.edu.co

RESUMEN

En Colombia se han realizado varios estudios para el tratamiento de aguas residuales de la industria papelera a escala de laboratorio, con el hongo *Trametes versicolor* inmovilizado en espuma de poliuretano; este hongo ha sido ampliamente estudiado por la producción de enzimas ligninolíticas y su potencial uso en la decoloración de efluentes. En este trabajo, se estudió el efecto de una fuente de carbono (glucosa) y una de nitrógeno (nitrato de amonio) en un biorreactor de lecho fluidizado, con adición al medio de cultivo de 0.02% (v/v) de Tween 80, 12 ppm de $MnSO_4$ y 1 mM de $CuSO_4$, desarrollando un diseño factorial 2^2 con dos diferentes concentraciones de los nutrientes, siendo éstos las variables independientes y las variables dependientes fueron la actividad enzimática, las unidades de color y el consumo de sustrato los cuales fueron determinados por métodos colorimétricos, además de la biomasa y pH. El uso del biorreactor de lecho fluidizado con entrada de aire constante, arrojó datos importantes sobre la decoloración y la producción de enzimas en el agua residual no estéril. Los máximos valores de la enzima Mn-peroxidasa fueron hallados en las concentraciones altas y bajas de glucosa y nitrato de amonio con valores de 9.257U y 6.502U; para la enzima Lacasa, al adicionar separadamente las dos variables se obtuvo valores de 8.618U y 8.341U. Las enzimas fueron relacionadas con la disminución de las unidades de color hasta 481.06UC, junto con el aumento de la biomasa del hongo *Trametes versicolor* hasta 3.365 g junto con flora nativa del agua residual. Los resultados encontrados, determinaron que las variables de consumo de sustrato y biomasa, tienen una gran importancia debido a que el aumento de la biomasa genera un aumento en la actividad de la enzima MnP y en la reducción de las unidades de color.

Palabras clave: biorreactor de lecho fluidizado, enzimas ligninolíticas, unidades de color, *Trametes versicolor*, agua residual.

ABSTRACT

Several studies for the treatment of residual waters from the paper industry have been carried out on a laboratory scale, with the fungus *Trametes versicolor* immobilized on polyurethane foam; this fungus has been widely studied for its production of ligninolytic enzymes and its potential use in decolorizing effluents. In this project, the effect of a carbon source (glucose) was studied as well as that of a nitrogen source (ammonium nitrate) in a air lift bioreactor, with 0.02% (v/v) Tween 80, 12 ppm $MnSO_4$ and 1 mM $CuSO_4$, also added to the culture medium, developing a factorial design, 2^2 , with two different concentrations of the nutrients, these were the independent variables. The dependent variables were the enzymatic activity, the color units and the substrate consumption, which were determined by colorimetric methods, as well as the biomass and pH. The use of the air lift bioreactor with the constant entrance of air generated

important data on the decolorization of, and the enzyme production in nonsterile waste-water. The maximum values for the enzyme Mn-peroxidase were found in the high and low concentrations of glucose and ammonium nitrate with values of 9.257U and 6.502U. Regarding the enzyme, Laccase, it was found when adding the two variables separately that the values 8.618U and 8.341U were obtained. The enzymes were related to a decrease of the color units of up to 481.06UC, together with an increase of the biomass of up to 3.365 g produced by the fungus *Trametes versicolor* and the native flora of the waste-water. The results obtained determined that the variables, substrate consumption and biomass, have great importance because the increase of the biomass generates an increase in the activity of the enzyme MnP accompanied by the reduction in the color units.

Key words: air lift bioreactor, ligninolytic enzymes, color units, *Trametes versicolor*, waste-water.

INTRODUCCIÓN

Varias especies de basidiomicetos, han sido estudiadas en los últimos años gracias a su capacidad de degradar la lignina, entre ellos el hongo *Trametes versicolor*, cuyo sistema enzimático está comprendido por las enzimas Lignina peroxidasa (LiP), Mn-peroxidasa (MnP) y Lacasa (LAC), las cuales tienen un potencial uso industrial, además de su viabilidad para decolorar efluentes provenientes de industrias productoras de textiles y papeles (Addleman *et al.*, 1995). En Colombia, se han realizado varios estudios en el tratamiento de aguas residuales de la industria papelera provenientes del tren de producción, a escala de laboratorio, en uno de los cuales se obtuvo un 51.9% de reducción de las unidades de color al utilizar una cepa de *Trametes versicolor* inmovilizada en espuma de poliuretano (Herrera-Mora y Rosas-Acosta, 2003; Herrera-Mora *et al.*, 2004).

Sin embargo, se ha reportado un mejoramiento de la decoloración, así como un incremento en la actividad enzimática, al utilizar diferentes biorreactores ya sean empaquetados o fluidizados (Mielgo *et al.*, 2002), debido a la posibilidad de controlar la entrada de aire u oxígeno, lo cual tiene una gran relevancia debido a que las enzimas ligninolíticas son activadas a diferentes tensiones de oxígeno en el medio (Dosoretz *et al.*, 1990; Rothschild *et al.*,

1995; Rothschild *et al.*, 1999). Por otro lado, se ha hecho indispensable el estudio de las necesidades nutricionales de estos hongos debido a que se ha reportado que las enzimas ligninolíticas, son generadas como un proceso idiofásico y estimulado por la limitación de nutrientes como carbono, nitrógeno o sulfato; también, se ha reportado que altas concentraciones de una fuente de carbono o de nitrógeno, pueden limitar la producción de las enzimas ligninolíticas y disminuir la degradación de los agentes cromógenos que se encuentran en las aguas residuales (Dosoretz *et al.*, 1990; Rothschild *et al.*, 1999; Schlosser *et al.*, 1997; Swamy and Ramsay, 1999).

Por lo anterior, se hace relevante la evaluación del efecto de una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno en un biorreactor de lecho fluidizado, con entrada permanente de 1vvm de aire; en el cual se denote un incremento en la actividad de las enzimas ligninolíticas y por ende el incremento en decoloración del agua residual de la industria papelera colombiana por parte del hongo *Trametes versicolor* inmovilizado en espuma de poliuretano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos

Para estos estudios, se utilizó una cepa de *Trametes versicolor* LAC 2M del cepario

del Laboratorio de Biotecnología Aplicada de la Pontificia Universidad Javeriana (Bogotá, Colombia), conservada a 4°C en agar PDA; y reconstituida en caja con siembra en forma de sandwich en agar extracto de salvado desarrollado por Ha *et al.* (2001).

Efluente

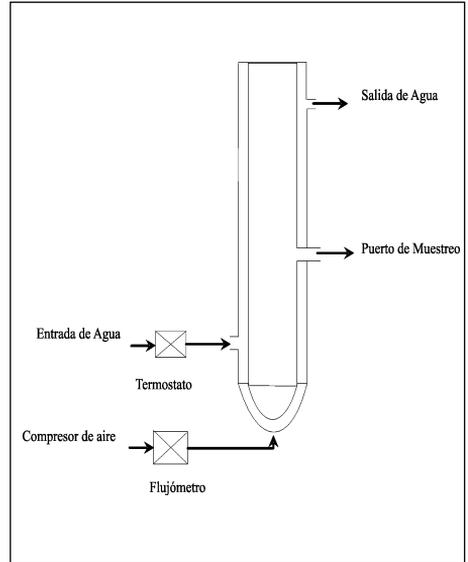
La muestra utilizada para este estudio fue recolectada del canal que transporte el agua residual del tren de producción hacia la planta de tratamiento de la empresa Propal S.A., Colombia, a la cual se le han retirado los sólidos suspendidos de mayor tamaño. La toma de muestra fue realizada por la empresa.

Producción del inóculo

A partir del cultivo agarizado, se tomaron 3 discos de agar de 0.5 cm de diámetro que posteriormente fueron transferidos a erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de caldo extracto de salvado (Márquez-Rocha *et al.*, 2000) y 20 cubos de 1 cm³ de espuma de poliuretano (Herrera-Mora, 2003); las condiciones de operación fueron agitación de 120 rpm, pH 6.0 ± 0.2 y 30°C por 5 días siguiendo la metodología de Font *et al.* (1997) y Herrera-Mora *et al.* (2004).

Biorreactor de lecho fluidizado

El estudio del efecto de fuentes de carbono y nitrógeno, se realizó en biorreactores de lecho fluidizado (gráfica 1.), con 481 ml de agua residual no estéril (L:D 1:7) colonizado con 48 cubos de hongo inmovilizado siguiendo la metodología de Font *et al.* (1997) y la adición de 0.02% (v/v) de Tween 80, 12 ppm de MnSO₄ y 1 mM de CuSO₄; la temperatura fue controlada por circulación de agua a través de una camisa de vidrio a 30°C y la agitación fue dada por aireación de 1vvm controlada con flujómetro por 3 días.



GRÁFICA 1. Columna de vidrio y sistema de entrada de aire y control de temperatura.

Evaluación del efecto de fuentes de carbono y nitrógeno, diseño factorial 2²

Se planteó un diseño factorial 2² con el fin de determinar el efecto de la adición de una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno sobre la decoloración del efluente y la actividad enzimática del hongo *Trametes versicolor* (Box *et al.*, 1998; Montgomery, 1991). Las variables independientes fueron glucosa y nitrato de amonio siguiendo la metodología de Mielgo *et al.* (2002). Las concentraciones altas del factorial fueron determinadas por la adición de 250 mg/L*h de glucosa y de 0.6 mg/L*h de nitrato de amonio para 3 días de fermentación; el nivel bajo fue determinado por la no adición de glucosa y nitrato de amonio. Las variables dependientes fueron pH, consumo de sustrato, biomasa producida, unidades de color (UC) y expresión de las enzimas Mn-peroxidasa (MnP) y lacasa (LAC) (tabla 1).

Tabla 1
Diseño factorial 2²

Tratamiento	Glucosa	NH ₄ NO ₃
1	0 mg/L*h	0 mg/L*h
2	250mg/L*h	0 mg/L*h
3	0 mg/L*h	0,6mg/L*h
4	250mg/L*h	0,6mg/L*h

Determinación de la biomasa y consumo de sustrato

La biomasa fue determinada mediante peso seco a partir de las muestras tomadas al día 3. La biomasa (x) se obtuvo por filtración en papel Wathman y posterior secado a 50°C por 24 horas siguiendo la metodología descrita por Herrera-Mora y Rosas-Acosta (2003) y Herrera *et al.* (2004). El consumo de sustrato (s) fue determinado por la técnica del ácido 3,5 dinitrosalicílico siguiendo la metodología de Miller (1959). El rendimiento se determinó por $Y_{x/s} = \Delta x / \Delta s$ siguiendo la metodología de Guillen *et al.* (1998).

Determinación de las unidades de color del efluente

Las UC fueron determinadas acorde con el método estandarizado del cobalto-platinato, para el cual es necesario ajustar el pH a 7.0 ó 7.6). La medición de UC fue realizado en espectrofotómetro a 465 nm contra blanco de agua destilada, siguiendo la metodología descrita por Livernoche *et al.* (1983) y Pallerla and Chambers (1997) .

Determinación de la actividad enzimática

La enzima MnP se determinó por el método de la oxidación de rojo de fenol; volumen de reacción de 1 ml, con rojo de fenol (Merck 70156870) 0.01%, lactato de sodio

(J.T. Baker V034-08) 25 mM, MnSO₄ (Merck 632 A 132963) 100 mM, albúmina de huevo (Sigma A5503) 0.1%, H₂O₂ (Merck 107210) 100 mM, Succinato de sodio (Sigma S-5047) 20 mM pH 4.5, (Kuwahara *et al.*, 1984), con coeficiente de extinción $\xi_{610\text{ nm}} = 4,460 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Michel *et al.*, 1991). La enzima LAC se determinó por la oxidación del 2,2' azino-bis-(3 ethyl benzthiazoline sulphato acid) (ABTS), con volumen de reacción de 1ml, ABTS (Sigma A1888) 0.5 mM y buffer acetato de sodio 100 mM pH 4.5; con coeficiente de extinción $\xi_{436\text{ nm}} = 29300 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y tiempo de reacción de 3 minutos (Tinoco *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001).

Análisis estadístico

El análisis de varianza (ANOVA), fue realizado en el software estadístico Design Expert 6.0.11 con un nivel de confianza del 95%. Las superficies de respuesta fueron realizadas en el software Statistica 5.1.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio, se determinó la influencia de una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno utilizando glucosa y el nitrato de amonio, sobre la producción de las enzimas ligninolíticas por parte del hongo *Trametes versicolor* y la decoloración de efluentes no estériles de la industria papera. Tabla 2.

Tabla 2
Medias establecidas en cada uno de los niveles del factorial 2²

Glucosa	NH ₄ NO ₃	pH	Sustrato g/L	Biomasa g	MnP	LAC	UC	Yx/s*g ⁻¹
0 mg/L*h	0 mg/L*h	7,84	0,004	1,14	6,50	1,47	2857,95	1,26
250mg/L*h	0 mg/L*h	4,96	14,435	2,12	0,73	8,34	481,06	1,07
0 mg/L*h	0,6mg/L*h	7,61	0,000	0,71	0,25	8,61	931,81	0,10
250mg/L*h	0,6mg/L*h	6,65	19,200	3,36	9,25	1,79	1018,94	4,78

En el desarrollo del análisis de varianza (ANOVA), arrojó que el modelo generado, no fue significativo para el pH; esto indicó la poca influencia que tiene la fuente de carbono y la de nitrógeno sobre cambios drásticos o simples del pH. Fue determinado el rendimiento, donde se encontró que la glucosa y ésta junto con el nitrato de amonio, tiene un efecto significativo sobre la formación de biomasa por sustrato consumido, incrementando en $+1.22 \pm 0.69 \text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ la biomasa; esto debido a que el hongo y la flora nativa del efluente, toman la glucosa como una fuente fácilmente asimilable de carbono para la producción de biomasa; resultados diferentes, fueron dados por Guillen *et al.* (1998) al adicionar 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15, y 20 g/L de glucosa al medio trabajando con *Pleurotus ostreatus*, donde encontraron que a pesar de que la biomasa aumenta al incrementar la glucosa, el rendimiento disminuye; esto puede reflejar las distintas necesidades nutricionales entre diferentes géneros de hongos ligninolíticos y entre especies para la formación de biomasa y de diferentes metabolitos (Schlosser *et al.*, 1997). En la figura 1, se puede observar el incremento dado por la acción conjunta de las variables sobre Yx/s; sin embargo, este incremento de la biomasa, puede ser contraproducente al determinar la actividad enzimática, dado a que en otros estudios, se ha encontrado que estas enzimas son activadas cuando hay un agotamiento del sustrato debido al consumo de éste por parte del hongo o se encuentra limitado desde el principio de la

fermentación en el medio de cultivo (Dosoretz *et al.*, 1990; Guillén-Navarro *et al.*, 1998; Rothschild *et al.*, 1995).

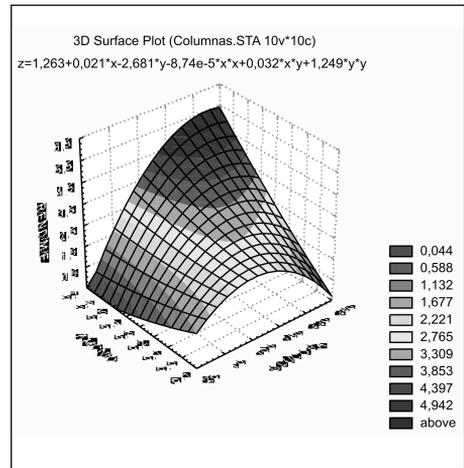


FIGURA 1. Efecto la adición de glucosa y nitrato de amonio sobre el incremento de la biomasa por sustrato consumido.

El mismo análisis generado para la producción de la enzima MnP, determinó que las fuentes de carbono y de nitrógeno tienen un efecto positivo de manera conjunta; la adición de los dos componentes glucosa y nitrato de amonio, aumentaron la actividad de esta enzima en $3.69 \pm 3.10 \text{U}$. Schlosser *et al.* (1997) trabajando con una cepa de *Trametes versicolor*, identificaron que la producción de MnP, se ve limitada por altas cantidades de carbono en medios con glucosa, astilla de madera y paja de trigo, estableciendo que esta enzima, es

generada en medios con baja cantidad de fuente de carbono y que no está influenciada por la cantidad de nitrógeno en el medio. Igualmente, Rothschild *et al.* (1999) y Dosoretz *et al.* (1990) describen que esta enzima, es producida en medios con limitación de carbono y/o nitrógeno aunque estos dos parámetros tienen una baja influencia sobre la actividad de la enzima; también indican que en medios con limitación de nitrógeno, los valores más altos de actividad fueron de 3.1 U/L, en medios con baja concentración de carbono, esta actividad fue estable y en medios con altas concentraciones de carbono el incremento de la actividad fue mínima.

La adición de las diferentes concentraciones de glucosa y nitrato de amonio, determinan el aumento de la actividad enzimática debido a que esto genera cambios en la relación carbono-nitrógeno del medio. En la figura 2, se puede observar el efecto conjunto de las variables glucosa y nitrato de amonio sobre la actividad de la enzima MnP, donde se observa que a concentraciones altas y bajas de las fuentes de carbono y nitrógeno, se incrementa la actividad, mientras que el efecto independien-

te de las dos variables disminuye la actividad de la enzima. Los máximos valores determinados en el factorial para esta enzima, fue de 9.27U al adicionar 250 mg/L*h de glucosa y de 0.6 mg/L*h de nitrato de amonio al medio. En otros trabajos realizados, se han encontrado valores de 16.63U de actividad de la enzima MnP; esto trabajando en un sistema de lotes realizado en erlenmeyers; Herrera-Mora *et al.* (2004) indican actividades de 13.4U en sistema de lotes pero con un efluente estéril. Los valores encontrados en este trabajo son bajos los cuales pueden ser influenciados tanto por los valores de pH's que arrojó el estudio debido a la inestabilidad de esta enzima a pH's básicos o también al incremento de la flora nativa del efluente la cual puede producir una serie de enzimas que degraden la enzima MnP.

Por otro lado, la enzima LAC, también arrojó que el efecto conjunto de las dos fuentes disminuye la actividad de ésta en $-3.42 \pm 1.04U$; los máximos valores de esta enzima fueron de 8.62U y 8.34U al adicionar nitrato de amonio o glucosa al medio. Al igual que la enzima MnP, ésta también es producida por los hongos ligninolíticos

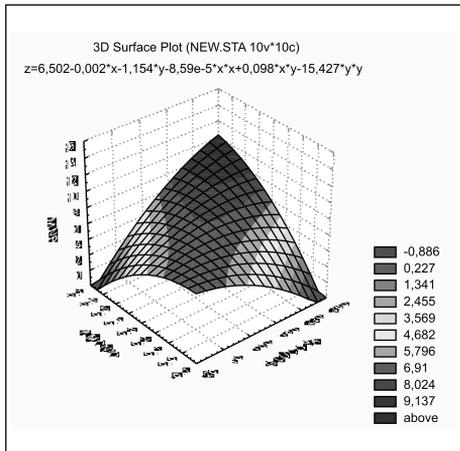


FIGURA 2. Efecto la adición de glucosa y nitrato de amonio sobre la actividad de MnP.

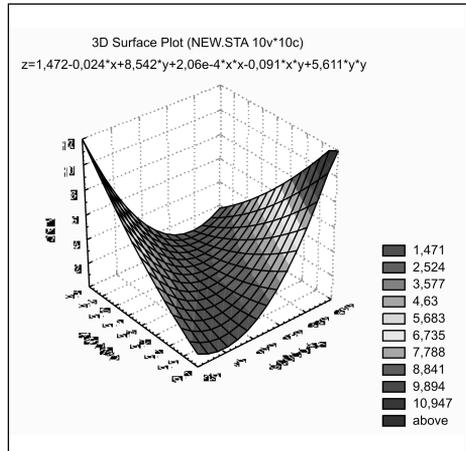


FIGURA 3. Efecto la adición de glucosa y nitrato de amonio sobre la actividad de LAC.

como un evento idiofásico determinado por la limitación de macronutrientes (Herrera-Mora y Rosas-Acosta, 2003; Rothschild *et al.*, 1999).

En la figura 3, se puede observar el efecto de la glucosa y del nitrato de amonio en la actividad de las enzimas LAC, donde al adicionar por separado los macronutrientes, se observan los máximos valores de actividad de la enzima mientras que la no adición o la adición conjunta de los dos macronutrientes glucosa y nitrato de amonio, disminuye la actividad de la enzima en $-3.42 \pm 1.04U$. Swamy and Ramsay (1999), describen que la producción de la enzima LAC se ve inhibida al adicionar un compuesto dador de Mn(II) junto con bajas concentraciones de nitrógeno; pero en medios enriquecidos con nitrógeno, la actividad de la enzima es mayor que en medios limitados; en este estudio, la adición de nitrato de amonio genera un incremento no significativo de la actividad de la enzima LAC en $0.15 \pm 1.04U$. Schlosser *et al.* (1997) determinó que diversas cepas de *Trametes versicolor*, tienen diferentes requerimientos de carbono y nitrógeno para una producción eficiente de la enzima. La cepa utilizada sugiere la necesidad de un medio bajamente enriquecido con nitrato de amonio; para poder obtener una producción eficiente de esta enzima.

La determinación de las unidades de color en el agua residual estableció en el análisis de varianza, que el efecto conjunto de las variables glucosa y nitrato de amonio, aumenta las unidades de color en $616.00 \pm 31.49UC$. Figura 4. Los valores mínimos en las unidades de color, fueron de 481.06UC, determinados al adicionar 250 mg/L*h de glucosa al efluente. Se determinó que a mayores concentraciones de glucosa y de nitrato de amonio, hay una disminución de las unidades de color. La no adición de ningún nutriente, determina un incremento en las unidades de color

pero el efecto de cada una por separado, determina una disminución en las unidades de color, que se hace evidente en el análisis de varianza al determinar que éstas, disminuyen $-572.44 \pm 31.49UC$ al adicionar 250 mg/L*h de glucosa al medio o $-347.06 \pm 31.49UC$ al adicionar 0.6 mg/L*h de nitrato de amonio.

Swamy and Ramsay (1999) describen que el hongo *Trametes versicolor*, puede decolorar el efluente y pulpa kraft al enriquecer el medio con nitrógeno; siendo las enzimas extracelulares LAC y MnP las que tienen una mayor relación con la decoloración de estos efluentes; en este estudio, se puede observar que tanto la enzima LAC como la enzima MnP, se relacionan con la decoloración del efluente. La reducción de la expresión de la enzima MnP, hace que la decoloración del efluente sea deficiente (Swamy, 1999) pero también la actividad de la enzima LAC, interviene directamente sobre la decoloración aumentando la decoloración (Herrera-Mora y Rosas-Acosta, 2003; Herrera-Mora *et al.*, 2004); otro factor que interviene, es el

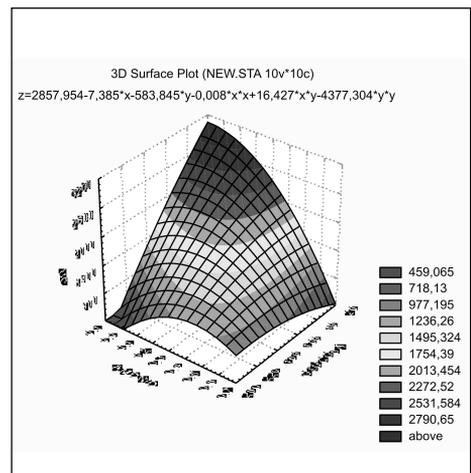


FIGURA 4. Efecto la adición de glucosa y nitrato de amonio sobre las unidades de color del efluente sin esterilizar.

aumento de la biomasa por consumo de sustrato, el cual tiene gran relación determinando que a mayor cantidad de biomasa en el medio, mayor es la reducción de color en el medio; este factor se observa en las figuras 1 y 4.

CONCLUSIONES

El uso de un biorreactor de lecho fluidizado, arrojó datos importantes al adicionar al agua residual una fuente de carbono fácilmente asimilable como la glucosa a una concentración de 250 mg/L*h y una fuente de nitrógeno como el nitrato de amonio a una concentración de 0.6 mg/L*h por tres días de fermentación. La adición o no de la fuente de carbono y/o de nitrógeno, establecieron efectos significativos sobre la actividad enzimática y la decoloración del efluente por parte del hongo *Trametes versicolor* inmovilizado en espuma de poliuretano. Una de las variables más importantes determinadas en el estudio, fue el rendimiento de la biomasa y sustrato; esto debido a que el aumento de la biomasa fúngica junto con la flora natural del agua residual, se relacionó con la disminución de las unidades de color del efluente, así mismo del aumento de la actividad de la enzima MnP, la cual parece aumentar su actividad al haber mayor cantidad de biomasa, ya sea fúngica y de flora nativa, en el efluente y por ende, la actividad enzimática también ésta se relaciona con la degradación de agentes cromógenos en el agua.

La enzima LAC, tiene una relación más directa con la decoloración del efluente, debido a que las unidades de color se encuentran disminuidas en los puntos con mayor actividad enzimática; el estudio realizado, determinó que para alcanzar mayores niveles de actividad de esta enzima, es necesario realizar un enriquecimiento del medio en bajas cantidades. Por otro lado, el estudio realizado deja en evidencia que el sistema de enzimas ligninolíticas gene-

radas por el hongo *Trametes versicolor*, tiene diferentes necesidades de carbono y nitrógeno para su mantenimiento y su eficaz accionar en la decoloración de efluentes de la industria papelera.

LITERATURA CITADA

- ADDLEMAN, K.; DUMONCEAUX, T.; PAICE, M.G.; BOURBONNAIS, R.; ARCHIBALD, F.S. 1995. "Production and characterization of *Trametes versicolor* Mutants unable to bleach hardwood kraft pulp". *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (10): 3687-3694.
- BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. 1998. Estadística para investigadores: introducción al diseño de experimentos, análisis de datos y construcción de modelos. Barcelona, España, Editorial Reverté S.A., 673.
- DOSORETZ, C.; CHEN, A.; GRETHLEIN, H. 1990. "Effect of oxygenation conditions on submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium*". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34: 131-137.
- FONT, X.; CAMINAL, G.; GABARRELL, X.; LAFUENTE, J.; VICENT, M.T. 1997. "Online enzyme activity determination using the stopped-flow technique: application to laccase activity in pulp mill waste-water treatment". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48: 168-173.
- GUILLÉN-NAVARRO, G.K.; MÁRQUEZ-ROCHA, F.J. SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, J.E. 1998. "Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido". *Revista Iberoamericana de Micología*, 15: 302-306.
- HA, H.-C.; HONDA, Y.; WATANABE, T.; KUWAHARA, M. 2001. "Production of manganese peroxidase by pellet culture of the lignin-degrading basidiomycete, *Pleuro-*

- tus ostreatus*". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55: 704-711.
- HERRERA-MORA, J.A.; ROSAS-ACOSTA, J.M. 2003. Estudio preliminar de la producción de enzimas ligninolíticas por los hongos *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* y *Pleurotus ostreatus* para el tratamiento de efluentes de la industria papelera. *Microbiología Industrial*. Bogotá, Colombia, Pontificia Universidad Javeriana, 151.
- HERRERA-MORA, J.A.; ROSAS-ACOSTA, J.M. MERCADO, M.; MARTÍNEZ, M.M.; PEDROZA, A. M. 2004. "Efecto de las enzimas ligninolíticas de los hongos *Trametes versicolor* y *Phanerochaete chrysosporium* inmovilizados en espuma sobre la remoción de color, demanda química de oxígeno y clorofenoles en aguas residuales de industria papelera colombiana". En revisión.
- KUWAHARA, M.; GLENN, J.K.; MORGAN, M.A.; GOLD, M.H. 1984. "Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*". *Federation of European Biochemical Societies*, 169 (2): 247-250.
- LIVERNOCHE, D.; JURASEK, L.; DESROCHERS, M.; DORICA, J. 1983. "Removal of color from kraft mill wastewater with cultures of white rot fungi and with immobilized mycelium of *Coliorus versicolor*". *Biotechnology and Bioengineering*, 24: 2055-2065.
- MÁRQUEZ-ROCHA, F.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, V.; VÁZQUEZ-DUHALT, R. 2000. "Biodegradation of soil-adsorbed polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*". *Biotechnology Letters*, 22: 469-472.
- MICHEL, F.; DASS, S.B.; GRULEKE, E.; REDDY, A. 1991. "Role of manganese peroxidase and lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of kraft bleach plant effluent". *Applied and Environmental Microbiology*, 57(8): 2368-2375.
- MIELGO, I.; MOREIRA, M.T.; FEJOO, G.; LEMA, J.M. 2002. "Biodegradation of a polymeric dye in a pulsed bioreactor by immobilized *Phanerochaete chrysosporium*". *Water Research*, 1896-1901.
- MILLER, G. 1959. "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar". *Analytical Chemistry*, 31: 246-428.
- Montgomery, D.C. 1991. Diseño y análisis de experimentos. México D.F.; Grupo Editorial Iberoamérica, 589.
- PALLERLA, S.; CHAMBERS, R. 1997. "Characterization of a Ca-alginate-immobilized *Trametes versicolor* bioreactor for decolorization and AOX reduction of paper mill effluents". *Bioresource Technology*, 60: 1-8.
- ROTHSCHILD, N.; HADAR, Y.; DOSORETZ, C. 1995. "Ligninolytic system formation by *Phanerochaete chrysosporium* in air". *Applied and Environmental Microbiology* 61 (5): 1833-1838.
- ROTHSCHILD, N.; LEVKOWITZ, A.; HADAR, Y.; DOSORETZ, C. 1999. "Manganese deficiency can replace high oxygen levels needed for lignin peroxidase formation by *Phanerochaete chrysosporium*". *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (2): 483-488.
- SCHLOSSER, D.; GREY, R.; FRITSCH, W. 1997. "Patterns of ligninolytic enzymes in *Trametes versicolor*. Distribution of extra- and intracellular enzymes activities during cultivation on glucose, wheat straw and beech wood".

Applied Microbiology and Biotechnology, 47: 412-418.

SWAMY, J.; RAMSAY, J.A. 1999. "Effects of Mn^{+2} and NH_4^+ concentration on laccase and manganese peroxidase production and Amaranth decoloration by *Trametes versicolor*". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51: 391-396.

TINOCO, R.; PICKARD, M.A.; VÁZQUEZ-DUHALT, R. 2001. "Kinetic differences of puri-

fied laccases from six *Pleurotus ostreatus* strain". *Letters in Applied Microbiology*, 32: 331-335.

WANG, Y.; VÁZQUEZ-DUHALT, R.; PICKARD, M. 2001. "Effect of growth conditions on the production of manganese peroxidase by three strains of *Bjerkandera adusta*". *Canadian Journal of Microbiology*, 47: 277-282.

Recibido: 8.04.2005

Aceptado: 11.09.2005