



ESTUDIO DEL EFECTO DE DOS INDUCTORES Y UN PROTECTOR ENZIMÁTICO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS Mn-PEROXIDASA Y LACASA PRODUCIDAS POR *Trametes versicolor* Y SU EFECTO EN LA DECOLORACIÓN DE EFLUENTES DE LA INDUSTRIA PAPELERA

**C. Gómez-Dorado¹, M. Martínez-Salgado², D. Nieto- Mosquera¹,
A. Pedrosa- Rodríguez^{2,3}, R. Rodríguez-Vázquez³, J. Rosas-Acosta^{1,2}**

¹Laboratorio de Biotecnología Aplicada

²Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial. Departamento de Microbiología.

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

³Centro 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 este estudio se realizaron dos factoriales 2^3 para determinar el efecto del Tween80, como protector enzimático y la adición de $MnSO_4$ y $CuSO_4$ como inductores enzimáticos del hongo *Trametes versicolor* sobre un efluente estéril y uno no estéril. Para tal fin se realizó un diseño factorial 2^3 con tres concentraciones de cada uno de los inductores además del protector enzimático, siendo éstos las variables independientes; las variables dependientes del factorial fueron el porcentaje de decoloración y la actividad enzimática las cuales fueron determinadas por métodos colorimétricos, además del pH. Los datos generados en este estudio, determinaron que las diferentes concentraciones de los inductores definidos para cada una de las enzimas, no tienen un efecto significativo sobre la actividad enzimática. Se determinaron máximos valores de actividad para la enzima Mn-peroxidasa de 6.19U y de 18.17U y los valores de actividad de la enzima Lacasa fueron de 4.99U y de 2.37U en los factoriales estéril y no estéril. Estos datos de actividad no fueron relacionados con los máximos índices de decoloración que fueron del 85% y 61% en cada uno de los factoriales al adicionar 0.02% de Tween80, 2mM de $MnSO_4$ y 5ppm de $CuSO_4$. Las diferencias en la decoloración entre los dos efluentes, es dada por la cantidad de sólidos suspendidos en el medio que cambian su conformación al ser esterilizados y por la acumulación de metabolitos en el medio debido al crecimiento de flora nativa y del mismo hongo *Trametes versicolor*.

Palabras clave: protector enzimático, inductores enzimáticos, *Trametes versicolor*, Mn-peroxidasa, Lacasa.

ABSTRACT

In this study two factorials 2^3 were carried out to determine the effect of Tween80, as an enzyme protector and the addition of $MnSO_4$ and $CuSO_4$ as enzyme inducers for the action of the fungi *Trametes versicolor* on sterile vs. nonsterile effluents. To this end a factorial design, 2^3 , was carried out with three concentrations of each one of the enzyme inducers as well as the enzyme protector; these being the independent variables. The dependent variables of the factorial were the percentage decolorization and the enzyme activity, which were determined by colorimetric methods, as well as the pH. Results generated in this study determined that the different concentrations of the defined inducers for each one of the enzymes don't have a significant effect on the enzyme activity. Maximum activity values were determined for the enzyme Mn-peroxidase, 6.19U and 18.17U, and the activity values for the enzyme Laccase were 4.99U and of 2.37U for the two factors, sterile and not sterile effluents. This activity data was not related to the maximum indices of decolorization that were 85% and 61% under all of the conditions where 0.02% of Tween80, 2mM of $MnSO_4$ and 5ppm of $CuSO_4$ were added. The decolorization differences between the two effluents were due to the quantity of suspended solids, given that they change their conformation when being sterilized, and from the accumulation of metabolites in the media due to the growth of native flora and the fungus *Trametes versicolor*.

Keys words: protective enzymatic, enzyme inducers, *Trametes versicolor*, Mn-peroxidase, Laccase

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, las aguas residuales provenientes de las industrias papeleras, se caracterizan por la intensidad del color generado en los procesos de despulpado y blanqueamiento de la pulpa y caracterizadas también por la alta demanda química y biológica de oxígeno (DQO y DBO) (Nyanhongo, 2002). Los hongos ligninolíticos como *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* y *Pleurotus ostreatus*, han sido ampliamente estudiados en la recuperación de efluentes provenientes de esta industria, debido a la producción de un sistema enzimático capaz de degradar la lignina y compuestos fenólicos, el cual se compone por las enzimas Mn-peroxidasa (MnP), Lignina peroxidasa (LiP) y Lacasa (LAC) (Herrera-Mora *et al.*, 2004; Rothschild *et al.*, 1999; Ullah *et al.*, 2000).

Las enzimas son expresadas por los hongos como un proceso idiofásico, el cual está ligado a la limitación de carbono y/o nitrógeno o sulfato en el medio y su síntesis es particularmente activa con altas tensiones de oxígeno (Dosoretz *et al.*, 1990; Michel *et al.*, 1991; Rothschild *et al.*, 1995; Rothschild *et al.*, 1999; Schlosser *et al.*, 1997). La actividad de estas enzimas puede ser incrementada por el uso de mediadores como el ABTS (2,2'-azino-bis[3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico]), e intermediarios de la degradación de la lignina entre los que se encuentra el alcohol veratrílico (Bourbonnais, 1995; Johannes, 1996; Majcherczyk, 1999), al igual que la adición de iones metálicos como Mn^{+2} para la enzima MnP y Cu para la enzima LAC (Galhaup y Haltrich, 2001; Kirk y Farrell, 1987). Por otra parte, debido a que éstas son enzimas extracelulares, se ha estudiado también el uso de protectores enzimáticos como CHAPS, Triton, SDS y Tween80 que recubren la enzima y evitan la degradación por acción mecánica (Bañuelos-Panuco, 1994).

Por lo anterior, se determinó la adición de dos inductores y un protector enzimático para la decoloración del efluente que sale de la industria a la planta de tratamiento de aguas de la industria papelera, por medio de la adecuación de un diseño factorial 2^3 con puntos medios y se determinaron las diferencias de la acción de estos inductores sobre el agua residual estéril y no estéril.

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 PDA; la cual fue reconstituida en caja con siembra en forma de sandwich en agar extracto de salvado siguiendo el método de Ha *et al.* (2001).

Efluente

El agua utilizada para este estudio fue recolectada del canal que sale del tren de producción del papel y que alimenta la planta de tratamiento de aguas residuales proporcionada por la empresa Propal S.A., Cali, Colombia a la cual se le han retirado los sólidos suspendidos de mayor tamaño.

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 y Rosas-Acosta, 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).

Evaluación del efecto de inductores enzimáticos

El estudio del efecto de inductores enzimáticos se realizó en erlenmeyers de 125 mL con 25 mL (relación 1:4) de agua residual estéril y no estéril a pH 6.5 y 3 cubos de hongo inmovilizado siguiendo la metodología de Herrera-Mora *et al.* (2004) llevándolos a incubación en agitador mecánico a 30°C y 120 rpm durante 3 días.

Diseño factorial 2³

Se realizó un diseño factorial 2³ con puntos medios con el fin de determinar el efecto de diferentes inductores enzimáticos sobre la decoloración del efluente y la actividad enzimática del hongo *Trametes versicolor* (Box *et al.*, 1998; Montgomery, 1991). Las variables independientes del factorial, fueron Tween80 como protector de enzimas, CuSO₄ inductor de la enzima lacasa y MnSO₄ inductor de la enzima manganeso peroxidasa; con valores de 0.05% (v/v) de Tween80, 1.5 mM de CuSO₄ y 8.5 ppm de MnSO₄ para los puntos medios (Bañuelos-Panuco, 1994; Michel *et al.*, 1991), valores de 0.02% (v/v) de Tween80, 1mM de CuSO₄ y 5 ppm de MnSO₄ para las concentraciones bajas y 0.08% (v/v) de Tween80, 2 mM de CuSO₄ y 12 ppm de MnSO₄ determinando así concentraciones altas (Bañuelos-Panuco, 1994; Galhau y Haltrich 2001; Rosas-Acosta *et al.* En revisión). Las variables dependientes fueron pH, unidades de color (UC) y expresión de las enzimas Mn-peroxidasa (MnP) y lacasa (LAC).

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 Mn, albúmina de huevo (Sigma A5503) 0.1%, H₂O₂ (Merck 107210) 100 Mn, Succinato de sodio (Sigma S-5047) 20 Mn pH 4.5, (Kuwahara *et al.*, 1984), con coeficiente de extinción $\xi_{610}=4,460 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Michel *et al.* 1991). La enzima LAC se determinó por la oxidación del ABTS (2,2'-azino-bis[3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico]), con volumen de reacción de 1 ml, ABTS (Sigma A1888) 0.5 mM y buffer acetato de sodio 100 mM pH 4.5; con coeficiente de extinción $\xi_{436}=29300 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y tiempo de reacción de 3 minutos (Tinoco *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001).

Determinación de las unidades de color del efluente

Las UC fueron determinadas acorde con el método estandarizado del cobalto-platino, 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 y Chambers (1997).

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®.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis factorial sobre agua residual estéril

El desarrollo del análisis de varianza (ANOVA), arrojó que el modelo generado para el pH, % de decoloración y de la enzima LAC no fue significativo, lo cual indica que los diferentes inductores y el protector enzimático, tienen poca influencia en el

incremento o en la disminución de las variables anteriormente mencionadas; caso contrario se obtuvo con la determinación de la enzima MnP donde el CuSO_4 , tiene un efecto significativo sobre la actividad enzimática aumentándola en $2.24 \pm 2.26\text{U}$. El ión Cu, ha sido ampliamente estudiado para aumentar la actividad de la enzima LAC, pero en nuestro estudio pudimos observar que éste, genera un aumento en la enzima MnP, pero este aumento puede estar más relacionado a las concentraciones de sulfatos que a la misma acción del ión Cu; Schlosser *et al.* (1997) describen en uno de sus apartes que además de la importancia de la concentración de carbono y nitrógeno para la actividad de las enzimas ligninolíticas, también son importantes las concentraciones de sulfatos en el medio y que es un factor adicional que puede estar limitado o en exceso; en estas aguas, los niveles de sulfato pueden ser altos debido a la extracción de pulpa por el método del sulfito.

En la figura 1, se puede observar el efecto que tiene el CuSO_4 , sobre la actividad de la enzima MnP, junto con las variables de Tween80 (figura 1a) y MnSO_4 (figura 1b), las cuales no tienen efecto significativo sobre la actividad; los valores máximos de actividad arrojados por el estudio fueron de 6.19U al adicionar 0.08% (v/v) de Tween80, 2 mM de CuSO_4 y 5 ppm de MnSO_4 .

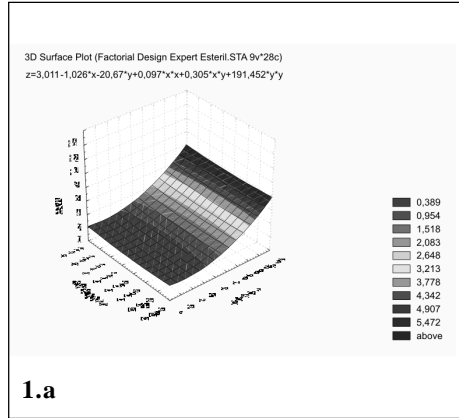


FIGURA 1a. Efecto del CuSO_4 y del Tween80 sobre la actividad de MnP.

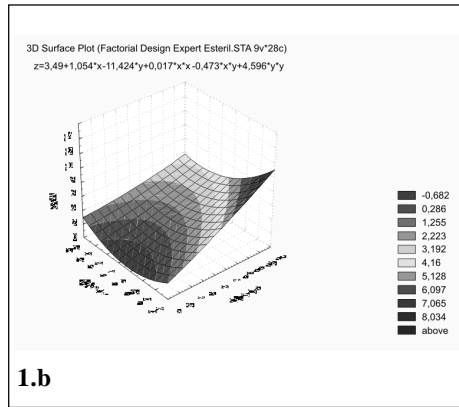


Figura 1b. Efecto del MnSO_4 y del CuSO_4 sobre la actividad de MnP.

Tabla 1

Valores de los promedios de cada uno de los niveles del factorial 2³ agua estéril

Tween 80 % (v/v)	CuSO_4 mM	MnSO_4 ppm	pH	% Dec	MnP	LAC
0,02	5	1	7,22	74,53	0,00	4,27
0,08	5	1	7,02	79,63	0,00	3,68
0,02	12	1	6,81	71,11	6,06	1,98
0,08	12	1	7,06	67,43	6,19	1,69
0,02	5	2	6,96	85,01	0,00	4,89
0,08	5	2	6,82	80,70	0,00	4,47
0,02	12	2	6,54	80,57	2,75	4,99
0,08	12	2	6,85	69,92	2,88	4,02

Michel *et al.* (1991), reportan en su trabajo una actividad enzimática de 1500U en un medio de cultivo que contiene 1.45 g/L de $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; la cual fue aumentada al adicionar 2.4 mM de NH_4 hasta 2000U. Los componentes dadores de Mn(II) generan un incremento sobre la actividad enzimática debido a que la enzima MnP, oxida el Mn(II) a Mn(III), pero esto se da bajo ciertas concentraciones de manganeso; a altas concentraciones, se genera una inhibición de la enzima debido a que se generan grandes cantidades de peróxido de hidrógeno que rompen el ciclo catabólico de la enzima (Kirk y Farrell, 1987) y también afecta la cantidad de biomasa fúngica y el crecimiento miceliar del hongo (Rothschild *et al.*, 1999); por otro lado, Kirk y Farrell (1987), indican que la enzima MnP también es estimulada por la acción de otros sustratos como el lactato el cual ayuda a la oxidación del Mn(II) a Mn(III); esto puede ser un punto relevante para incrementar la actividad enzimática. Igualmente, el pH es un factor indispensable debido a que la enzima MnP es inestable a pH's mayores a 7.5 en los cuales la determinación de la actividad es nula; en este estudio, el valor promedio del pH, fue de 6.91, valor que puede generar una disminución en la actividad enzimática gracias a la inestabilidad de la enzima a valores neutros o básicos del pH (Gill y Arora, 2003).

Con respecto a la decoloración por parte del hongo *Trametes versicolor*, se alcanzó un valor del 85% en tres días. Esta decoloración fue determinada al adicionar al medio 0.02% (v/v) de Tween80, 1mM de CuSO_4 y 15 ppm de MnSO_4 . Herrera-Mora *et al.* (2004), determinaron un porcentaje de decoloración del 43% sobre el efluente de entrada a la laguna de oxidación, los cuales fueron relacionados con la actividad enzimática del hongo *Trametes versicolor*. En este estudio no se puede relacionar la actividad enzimática con la decoloración del efluente y esto determina el accionar de otras enzimas como glioxal oxidasa, celobiosa quinona oxidoreductasa y veratril alcohol oxidasa no determinadas en el estudio las cuales tienen una forma de acción similar a las enzimas MnP, Lignina peroxidasa y LAC (Reid y Paice, 1994) en la reducción de los agentes cromógenos en los efluentes.

Análisis factorial sobre agua residual no estéril

En este factorial, a diferencia del realizado con el agua estéril, al análisis de varianza (ANOVA), para el pH, la enzima MnP y la enzima LAC, determinó que el modelo no fue significativo. De otro modo, el mismo análisis realizado para el % de decoloración, determinó que los efectos conjuntos del Tween80 con MnSO_4 que disminuye la

Tabla 2

Valores de los promedios de cada uno de los niveles del factorial 2^3 agua no estéril

Tween 80 % (v/v)	MnSO_4 mM	CuSO_4 ppm	pH	%Dec	MnP	LAC
0,02	1	5	6,98	48,34	18,17	2,37
0,08	1	5	7,21	12,02	9,80	0,53
0,02	2	5	7,06	61,08	16,63	1,26
0,08	2	5	7,39	0,00	12,04	1,13
0,02	1	12	7,06	8,66	15,50	1,74
0,08	1	12	7,10	48,76	12,36	2,02
0,02	2	12	7,06	15,57	11,53	1,18
0,08	2	12	6,83	13,35	12,38	1,01

decoloración en $-9.17 \pm 16.25\%$, y del Tween80 con CuSO_4 son que aumenta la decoloración en $+15.03 \pm 16.25\%$, son significativos ($p > 0.05$).

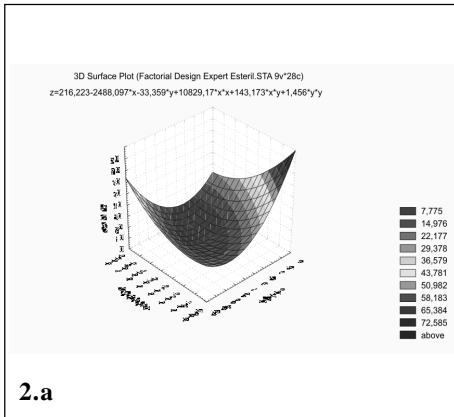
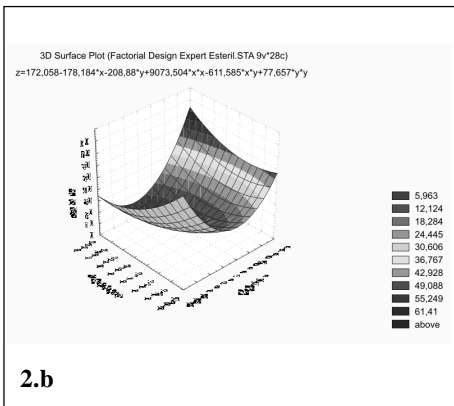


FIGURA 2a. Efecto del Tween80 y MnSO_4 sobre la decoloración.



b. efecto del Tween80 y CuSO_4 sobre la decoloración.

En la figura 2a, se puede observar el efecto conjunto del Tween80 y del MnSO_4 , concentraciones altas o bajas en conjunto de los inductores, presentan las más altas decoloraciones del efluente; pero sus combinaciones, presentan decoloraciones bajas. Por otro lado, la figura 2b, determina

que a concentraciones altas y bajas de los dos inductores en conjunto, se presentan los menores datos de decoloración, mientras que las combinaciones, generan los más altos índices de decoloración del efluente. La determinación de las unidades de color de los efluentes, es altamente influenciada por el pH del mismo; esto debido a que los elementos que generan color, son desestabilizados a pH's ácidos y son reconstituidos a pH's cercanos al neutro. Por otro lado, la cantidad de color en el efluente puede estar relacionado a la cantidad microorganismos nativos de la misma o también a la acumulación de metabolitos propios de los hongos (Livernoche *et al.*, 1983). La decoloración más alta encontrada en el factorial fue generada al agregar 0.02% (v/v) de Tween80, 2mM de MnSO_4 y 5 ppm CuSO_4 ; los demás niveles presentan una disminución de las unidades de color excepto al adicionar 0.08% (v/v) de Tween80, 2mM de MnSO_4 y 5ppm CuSO_4 .

Los máximos valores de actividad de las enzimas MnP y LAC (MnP = 16.635U y LAC = 1.263U), no fueron reportados en las concentraciones de inductores donde se alcanza la máxima decoloración del efluente; según los estudios realizados por Mielgo *et al.* (2002), la adición de Mn(II) para incrementar la actividad enzimática no afecta la decoloración del efluente y por el contrario, genera un efecto negativo al presentarse altas concentraciones de Mn(II) reduciendo así la decoloración del efluente. Razón por la cual es importante determinar el accionar de otras enzimas como celobiosa quinona oxidorreductasa, glioxal oxidasa y veratril alcohol oxidasa sobre la decoloración de este tipo de efluentes debido a que degradan sustratos similares los que degradan las enzimas MnP y LAC, las cuales son generadas por el hongos para realizar una mayor degradación de los sustratos y que hacen parte del sistema ligninolítico (Herrera-Mora y Rosas-Acosta, 2003; Reid y Paice, 1994).

CONCLUSIONES

Los datos generados en este estudio, determinaron que las diferentes concentraciones de los inductores definidos para cada una de las enzimas, no tienen un efecto significativo sobre la actividad enzimática; la enzima MnP, alcanzó valores máximos de 6.19U y 18.172U en el factorial estéril y no estéril respectivamente. Estos valores no se reflejaron al adicionar gran cantidad de $MnSO_4$ el cual fue utilizado como dador de Mn(II) al sistema de la enzima MnP. La enzima LAC, alcanzó máximos valores de 4.99U y 2.377U en el factorial estéril y no estéril; en el factorial estéril, el máximo valor (4.99U), se presenta en concentraciones altas del $CuSO_4$ (inductor escogido para esta enzima) y para el factorial no estéril (2.377U), se presentó a concentraciones bajas de $CuSO_4$; estos datos sugieren que la actividad enzimática, está sujeta a la presencia de flora nativa en el efluente, debido a la competencia de los microorganismos por el sustrato.

Las diferencias de la decoloración del efluente en cada uno de los ensayos, están dadas a la cantidad de sólidos suspendidos del agua residual que al ser esterilizada, cambia la conformación de éstos, generando un aumento relativo en las unidades de color y también por la cantidad de microorganismos nativos del agua residual que pueden generar una acumulación de metabolitos en el efluente disminuyendo así el porcentaje de decoloración por parte del hongo. Las enzimas ligninolíticas MnP y LAC no fueron relacionadas con la decoloración del efluente; esto pone entre dicho la acción de otras enzimas no determinadas en este estudio que son producidas por este hongo y tienen un efecto similar sobre los radicales generados en la degradación de la lignina.

LITERATURA CITADA

BAÑUELOS-PANUCO, C.A. (1994). Reducción de color de aguas residuales prove-

nientes de una empresa papelera empleando el hongo *Phanerochaete chrysosporium*. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. México D.C., Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), 86.

- BOURBONNAIS, R.; PAICE, M.G.; REID, I.D.; LANTHIER, P.; YAGUCHI, M. (1995). "Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization". *Applied and Environmental Microbiology*, 61(5): 1876-1880.
- 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). "On-line 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.
- GALHAUP, C.; HALTRICH, D. (2001). "Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56: 225-232.
- GILL, P.K.; ARORA, D.S. (2003). "Effect of culture conditions on manganese peroxidase production and activity by some white rot fungi". *Journal of In-*

dustrial Microbiology and Biotechnology, 30: 28-33.

- HA, H.-C.; HONDA, Y.; WATANABE, T.; KUWAHARA, M. (2001). "Production of manganese peroxidase by pellet culture of the lignin-degrading basidiomycete, *Pleurotus 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.
- JOHANNES, C.; MAJCHERCZYK, A.; HÜTTERMANN, A. (1996). "Degradation of anthracene by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of different mediator compounds". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46: 313-317.
- KIRK, T.K.; FARRELL, R.L. (1987). "Enzymatic 'combustion': the microbial degradation of lignin". *Annual Reviews of Microbiology*, 41: 465-505.
- 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.
- MAJCHERCZYK, A.; JOHANNES, C.; HÜTTERMANN, A. (1999). "Oxidation of aromatic alcohols by laccase from *Trametes versicolor* mediated by the 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) cation radical and dication". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51: 267-276.
- 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.; FEIJOO, G.; LEMA, J.M. (2002). "Biodegradation of a polymeric dye in a pulsed bioreactor by immobilized *Phanerochaete chrysosporium*". *Water Research*, 1896-1901.
- MONTGOMERY, D.C. (1991). *Diseño y análisis de experimentos*. México D.F., Grupo Editorial Iberoamérica, 589.
- NYANHONGO, G.S.; GOMES, J.; GÜBITZ, G.M.; ZVAUYA, R.; READ, J.; STEINER, W. (2002). "Decolorization of textile dyes by laccase from a newly isolated strain of

- Trametes modesta*". *Water Research*, 36: 1449-1456.
- 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.
- REID, I.; PAICE, M. (1994). "Biological bleaching of kraft pulps by white-rot fungi and their enzymes". *Federation of European Microbiology Societies*, 13: 369-376.
- ROSAS-ACOSTA, J.M.; DÍAZ-CERVANTES, M.D.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R. (En revisión). "Effect of C/N ratio and shaking on color reduction of soda pulping effluent by *Phanerochaete chrysosporium* immobilized in Ca-alginate".
- 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.
- TINOCO, R.; PICKARD, M.A.; VAZQUEZ-DUHALT, R. (2001). "Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strain". *Letters in Applied Microbiology*, 32: 331-335.
- ULLAH, M.A.; KADHIM, H.; RASTALL, R.A. EVANS, C.S. (2000). "Evaluation of solid substrates for enzymes production by *Coliorus versicolor*, for use in bioremediation of chlorophenols in aqueous effluents". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54: 832-837.
- 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: 6.03.2005

Aceptado: 11.09.2005