



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

## TESIS

PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

DECOLORACIÓN DE COLORANTES AZO Y TRIFENILMETANO  
POR *Phanerochaete chrysosporium* POR FERMENTACIÓN EN  
MEDIO SÓLIDO



COORDINACION DE SERVICIOS  
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA

POR:

MAYOLA GARCÍA RIVERO  
ING. BIOQUÍMICO INDUSTRIAL

Sustentada el 3 de Mayo de 1996 ante el jurado compuesto por:

DR. ERNESTO FAVELA TORRES

Presidente

DR. MARIANO GUTIERREZ ROJAS

Secretario

DRA. REFUGIO RODRÍGUEZ VASQUEZ

Vocal

DRA. SUSANA SAVAL BOHORQUEZ

Vocal

1996

**CONTENIDO**

CONTENIDO	i
AGRADECIMIENTOS	v
RESUMEN	vi
INTRODUCCIÓN	viii
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
1.1 FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO	1
1.1.1. Características de la FMS	2
1.1.2. Ventajas y desventajas de la FMS	2
1.1.3. Fermentación en medio sólido con hongos de la pudrición blanca de la madera	3
1.2. COMPUESTOS RESISTENTES A LA DEGRADACIÓN	5
1.2.1. Factores que afectan la biodegradación de compuestos resistentes	6
1.2.2. Biodegradación de compuestos resistentes	7
1.2.3. Degradación de compuestos resistentes con <i>P.chrysosporium</i>	9
1.2.4. Ventajas de <i>P.chrysosporium</i> en la degradación de compuestos resistentes	11
1.2.5. Producción de enzimas ligninolíticas de <i>P. chrysosporium</i> para la degradación de resistentes	12
1.3. COLORANTES	12
1.3.1. Clasificación y características	12
1.3.2. Importancia ambiental	16
1.3.2.1. Tratamientos fisico-químicos	16
1.3.2.2. Tratamientos biológicos	17
1.4. <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	22
1.4.1. Descripción y características	22
1.4.2. Lignina peroxidasa	24
1.4.3. Manganeso peroxidasa	25
1.4.4. Enzimas productoras de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	27
1.4.5. Aspectos fisiológicos de la actividad ligninolítica	27
2. OBJETIVOS	29

3. HIPÓTESIS	31
4. MATERIALES Y MÉTODOS.	
4.1. Reactivos	32
4.2. Medio de cultivo	32
4.3. Microorganismos	33
4.3.1. Conservación de las cepas	33
4.3.2. Producción del inóculo	33
4.4 Condiciones de cultivo	34
4.4.1. Cultivo superficial	34
4.4.2. Fermentación en medio sólido	34
4.4.2.1. Producción de extractos enzimáticos	34
4.4.2.2. Cinéticas de decoloración	35
4.5. Técnicas analíticas	35
4.5.1. Cultivo superficial	35
4.5.1.1. Determinación de biomasa	35
4.5.1.2. Determinación de colorante residual	36
4.5.2. Fermentación en medio sólido	36
4.5.2.1. Tratamiento de muestras	36
4.5.2.2. Determinación de pH	36
4.5.2.3. Determinación de humedad	36
4.5.2.4. Ensayos enzimáticos	36
4.5.2.5. Ensayos de decoloración con extractos enzimáticos	37
4.5.2.6. Determinación de colorante residual	37
4.5.3. Valoración del Peróxido de hidrógeno	38
4.5.4. Curva estándar de veratraldehído	38
4.5.5. Curvas estándar de colorantes	38
5. CARACTERÍSTICAS DE LOS COLORANTES Y ESTABILIDAD A FACTORES ABIÓTICOS	40
5.1. Características fisico-químicas de los colorantes	40
5.2. Determinación de la longitud de onda de máxima absorción	42
5.3. Estabilidad de los colorantes	42
5.3.1. Efecto de la temperatura y luz ambiental	43
5.3.2. Efecto del pH	44
5.3.3. Efecto del medio de cultivo	45
6. SELECCIÓN DE LA CEPA	46
6.1. Caracterización del crecimiento en cultivo superficial	46
6.2. Caracterización de la capacidad de decoloración de las cepas	47

7. BIODECOLORACIÓN EN CULTIVO SUPERFICIAL	50
7.1. Biodecoloración	50
7.2. Efecto de la relación carbono-nitrógeno	53
8. BIODECOLORACIÓN POR FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO	56
8.1. Estudios de producción de actividad LiP y MnP	56
8.1.1. Cinéticas de producción de extractos enzimáticos	56
8.1.2. Estabilidad de la actividad enzimática de los extractos	58
8.1.3. Efecto de la concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y pH en la actividad LiP y MnP	59
8.2. Efecto de la relación carbono-nitrógeno y de la aireación sobre la producción de actividad LiP y MnP	61
8.3. Decoloración <i>in vitro</i> con extractos enzimáticos producidos por FMS	65
8.4. Biodecoloración por <i>P. chrysosporium</i> en FMS	67
9. CONCLUSIONES GENERALES	71
10. RECOMENDACIONES	73
11. BIBLIOGRAFÍA	76
ANEXO	83

*A mis papas :  
Por su amor y comprensión.*

*A mis amigos :  
Por su apoyo que he tenido en todo momento.*

## **AGRADECIMIENTOS.**

El presente trabajo fue realizado en la Planta Piloto de Fermentación en medio Sólido de la Universidad Autónoma Metropolitana, bajo la dirección del Dr. Ernesto Favela T. y del Dr. Mariano Gutiérrez a quienes agradezco el interés y apoyo durante el desarrollo experimental, así como su contribución en mi formación académica y profesional.

A la Dr. Refugio Rodríguez V. y Dr. Susana Saval B. por las aportaciones y sugerencias realizadas en la revisión de la tesis.

A CONACYT expreso un especial reconocimiento por el financiamiento otorgado que hizo posible la realización de mis estudios de posgrado.

A mis compañeros de la Planta Piloto de Fermentaciones por el grato ambiente de convivencia que es más que un aliciente en el desarrollo de todo trabajo.

A la M. en C. Teresa Cruz C. y al Ing. Juan Guzmán, quienes me apoyaron con sus conocimientos en la realización de los ensayos enzimáticos.

A los profesores que durante la maestría y la licenciatura contribuyeron en la adquisición de conocimientos y de un espíritu crítico para el desarrollo de todas las actividades

## RESUMEN

El objetivo fundamental del presente trabajo fue estudiar la degradación de colorantes azo y trifenilmetano por fermentación en medio sólido (FMS) con *Phanerochaete chrysosporium*. Debido a la poca información sobre el crecimiento de este microorganismo en este tipo de cultivo, primero se realizaron estudios en cultivo superficial (CS) para la caracterización del crecimiento de *P. chrysosporium* y su capacidad de decoloración. Para esto se probaron colorantes azo (Amarillo ácido 9, Rojo 40 y Tropaeolin O) y trifenilmetano (Azul 1), encontrándose que el nivel de decoloración depende de los grupos químicos presentes en el anillo aromático y que no son utilizados como fuente de carbono y/o nitrógeno. En CS se observó que la capacidad de decoloración es favorecida en medio limitado en nitrógeno.

Se estudió el efecto del peróxido de hidrógeno y del pH sobre la actividad de las enzimas lignina peroxidasa (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP) provenientes de extractos producidos por FMS. Se encontró que el efecto de estas variables sobre la actividad enzimática es similar al reportado para enzimas producidas por fermentación en medio líquido (FmL). En las condiciones de reacción establecidas se realizaron ensayos de decoloración con los extractos enzimáticos producidos por FMS. Se encontró que el Amarillo ácido 9 y Rojo 40 son decolorados por los extractos enzimáticos en las condiciones de reacción establecidas en tanto que el Azul 1 no es decolorado.

La producción de actividad LiP en FMS se favorece en condiciones limitadas de nitrógeno, en tanto que la MnP muestra un mínimo efecto por la limitación de carbono o nitrógeno. La producción de actividad LiP se favoreció con una tasa de aireación específica de 5.33 vgm, mientras que la MnP varió ligeramente con tasas de aireación de 5.33 y 10 .66 vgm.

En la última parte del presente trabajo se probó la decoloración con *P. chrysosporium* por FMS en medio limitado en nitrógeno, adicionando los colorantes a las columnas de fermentación al inicio del cultivo, en estas condiciones se encontró que la decoloración del

Amarillo ácido 9, Rojo 40 y Azul 1 fue total y siguió una cinética parecida a la que se reporta para la FmL.

Los estudios de actividad ligninolítica en FMS demostraron que es factible la producción de enzimas por este tipo de cultivo, pero la actividad (comparada en términos de la decoloración) no fue sustancialmente mayor, aunque la optimización del medio y condiciones de cultivo podrían mejorar la producción de las enzimas.

## INTRODUCCION

La fermentación en medio sólido (FMS) representa una importante alternativa para la obtención de diversos productos de interés industrial, las ventajas que presenta son muchas y las desventajas se han ido superando en los últimos años. No obstante, que se reconoce el potencial de los hongos de la pudrición blanca de la madera para la degradación de compuestos resistentes a la degradación, el uso de este tipo de cultivo se ha limitado a la degradación de lignina en residuos agrícolas y en contados estudios se ha dado importancia a la determinación de las diferentes actividades enzimáticas presentes.

A partir de los años 50's comenzaron a vislumbrarse los problemas reales y potenciales asociados a la introducción de compuestos químicos persistentes en el ambiente. Desde entonces han surgido reportes sobre la habilidad de diferentes bacterias y hongos para degradar compuestos de difícil degradación (Bumpus y Aust, 1986). Entre las bacterias, las pertenecientes al género *Pseudomonas* son las más efectivas en la degradación de xenobióticos -se han identificado al menos 100 compuestos xenobióticos que soportan su crecimiento-. Entre los hongos, destacan los de la pudrición blanca de la madera y particularmente *Phanerochaete chrysosporium* que, a diferencia de las *Pseudomonas*, cometaboliza sustratos orgánicos. Este hongo excreta enzimas oxidativas altamente inespecíficas que permiten en algunos casos la asimilación y la subsecuente mineralización de los productos de la degradación enzimática.

Basándose en el conocimiento de la capacidad de *P. chrysosporium* para degradar lignina y compuestos aromáticos halogenados, se sugirió su uso en otros compuestos resistentes a la degradación tales como: DDT, bifenilos y lindano (Bumpus y col., 1985). Actualmente es muy amplio el número de compuestos reconocidos como susceptibles a la degradación por *P. chrysosporium*, que incluyen fenoles clorados, bifenilos policlorados, dioxinas, hidrocarburos aromáticos policíclicos, nitrotoluenos y colorantes industriales.

La degradación de colorantes fue demostrada inicialmente en ensayos con colorantes poliméricos como sustrato modelo para la degradación de lignina (Glenn y Gold, 1983). Esos conocimientos establecieron las bases para iniciar diversos estudios de biodegradación en cultivo líquido que han permitido conocer los factores que afectan la mineralización de esos compuestos e incluso proponer mecanismos de reacción para la degradación de algunos colorantes.

La poca información publicada sobre la actividad ligninolítica de *P. chrysosporium* en FMS, en relación a la degradación enzimática de compuestos resistentes a la degradación en este cultivo, motivo el interés de la parte fundamental de este trabajo: proponer el uso de la fermentación en medio sólido para la degradación de colorantes como un modelo experimental representativo de compuestos resistentes a la degradación.

El trabajo se dividió en tres partes, en la primera se presentan algunas características físico-químicas de los colorantes usados como sustrato. La segunda parte se refiere a estudios en cultivo superficial (CS) para la selección y caracterización de la cepa de *P. chrysosporium*; también se incluyen resultados de biodecoloración y el efecto de las condiciones de cultivo sobre esta actividad.

En la tercera parte, se estudio la decoloración *in vitro* e *in situ* partiendo de la hipótesis de que si *P. chrysosporium* era capaz de decolorar en CS, entonces sería posible esperar la misma respuesta para la FMS, primero se presentan los resultados de las actividades enzimáticas y el efecto de las condiciones de cultivo sobre la producción de la LiP y MnP. Posteriormente con los datos obtenidos se establecieron las condiciones para los ensayos de decoloración con los extractos enzimáticos. Finalmente se ensayó la decoloración durante la FMS en presencia de *P. chrysosporium*.

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten abrir una serie de expectativas en torno al estudio de la aplicación de la FMS para la producción de enzimas ligninolíticas y su posible empleo en la degradación de compuestos resistentes a la degradación microbiana.

# REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

# 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

## 1.1. FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO

La fermentación en medio sólido (FMS) es usualmente referida al crecimiento de microorganismos en cultivos donde el agua necesaria para el crecimiento no se encuentra en exceso (Gutiérrez, 1995). Este tipo de cultivo ha sido preferentemente aplicado a hongos filamentosos debido a que reúnen una serie de características que facilitan su cultivo en FMS y a que las condiciones de cultivo son muy próximas a las de su *habitat* natural.

Se han desarrollado algunos procesos de interés industrial, por FMS, para la producción de enzimas, ácidos orgánicos, e incluso biomasa; además de procesos cuyo objetivo es el aprovechamiento de desechos agrícolas para la producción de alimento para ganado y hongos comestibles, algunos de esos productos y procesos se muestran en la Tabla 1.1.

**Tabla 1.1 Productos y procesos en diferentes sistemas de FMS**

<u>MICROORGANISMOS</u>	<u>SUSTRATOS</u>	<u>PRODUCTOS y/o PROCESOS</u>
<i>Aspergillus niger</i>	Pulpa de café y bagazo de caña	Pectinasas
<i>Aspergillus niger</i>	Bagazo de caña, glucosa y pectina	Pectinasas
<i>Aspergillus niger</i>	Residuos de manzana	Ácido cítrico
<i>Aspergillus niger</i>	Yuca, plátano y amberlita	Biomasa
<i>Aspergillus niger</i>	Yuca	Amilasas
<i>Aspergillus terreus</i>	Bagazo de caña y melazas	Biomasa
<i>Giberella fujikuroi</i>	Centeno y almidón soluble	Ácido giberélico
<i>Neurospora crassa</i>	Paja de trigo	$\beta$ -Glucosidasa
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Bagazo de caña y sacarosa	Penicilina G
<i>Rhizopus arhisuz</i>	Yuca	Biomasa
<i>Trichoderma harzianum</i>	Bagazo de caña y glucosa	Celulasas y esporas
<i>Candida utilis</i>	Bagazo de caña y salvado de trigo	Biomasa
<i>Schwanomyces castelli</i>	Bagazo de caña y almidón	Biomasa y etanol
<i>Bacillus licheniformis</i>	Centeno	$\alpha$ - Amilasas
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Lignina residual del pulpeo Kraft	Bioblanqueo
Hongos de la pudrición blanca	Paja de trigo	Degradación de lignina
Hongos de la pudrición blanca	Residuos de plantas agrícolas	Alimento mejorado para ganado
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Paja de cebada, trigo y avena	Producción de hongos comestibles

Fuente: Gutiérrez, 1995.

### **1.1.1. Características de la FMS**

Entre las características más relevantes de la FMS se pueden citar: la baja actividad de agua de los medios de cultivo, las altas concentraciones de sustratos y productos que pueden tolerarse y la heterogeneidad del sistema (Mitchell y Lonsane, 1992):

- a) La actividad de agua de los sustratos puede ser menor a 0.99 lo cual favorece el crecimiento de microorganismos filamentosos capaces de tolerar valores de hasta 0.93. Para la mayoría de las bacterias y levaduras se requieren actividades de agua superiores a 0.99, por lo que este tipo de cultivo es poco apropiado para tales microorganismos.
- b) Los sustratos están más concentrados en la FMS que en fermentación en medio líquido (FmL), en esta última el agua representa del 90 al 99% de la masa total, mientras que en FMS toma valores del 40 al 85%; esto permite que la concentración de sustratos solubles en agua y productos alcancen niveles que pueden ser inhibitorios en otro tipo de cultivo.
- c) Los sustratos utilizados son en general materiales heterogéneos y complejos que son humedecidos con el medio de cultivo, aunque ocasionalmente requieren algún pretratamiento. Este tipo de materiales produce un ambiente muy heterogéneo con espacios entre partículas que permiten el paso de una fase gaseosa continua, restringiendo el crecimiento a la superficie provocando en consecuencia gradientes de sustratos, productos y pH dentro de las partículas sólidas.

### **1.1.2. Ventajas y desventajas de la FMS**

Este tipo de cultivo presenta una serie de ventajas y desventajas con respecto a la FmL que deben tomarse en cuenta (Mitchell y Lonsane, 1992):

- a) Los soportes, que bien pueden servir como sustrato, son generalmente productos agrícolas que usualmente se someten a un tratamiento muy sencillo para facilitar el acceso a los nutrientes; mientras que los medio de cultivo para FmL usualmente requieren un manejo más complejo.
- b) La baja disponibilidad de agua en el sistema limita el crecimiento de bacterias y levaduras indeseables, pero esa misma característica restringe el número de microorganismos que pueden cultivarse por FMS.

- c) La baja actividad de agua del medio puede favorecer la producción de compuestos específicos que son producidos pobremente o no se producen en la FMI. En el caso de las enzimas se ha observado que sus propiedades cinéticas cambian en función del tipo de cultivo (Acuña y col., 1995) e incluso la composición de complejos multienzimáticos puede alterarse.
- d) Las altas concentraciones de sustrato permiten el empleo de reactores más pequeños en la FMS, para manejar las mismas cantidades de sustrato que en la FmL. Las productividades volumétricas pueden ser superiores aunque las velocidades de crecimiento y rendimiento de biomasa algunas veces son menores.
- e) La aireación forzada en FMS es facilitada por los espacios entre partículas que favorecen la transferencia de aire hacia las películas delgadas de agua de la superficie sólida. Sin embargo, la naturaleza sólida de los sustratos causa problemas en el control de los parámetros del proceso y tiene un efecto directo sobre la difusión de masa y de calor que puede llegar a ser el paso limitante para el crecimiento celular.
- f) Los procesos de recuperación y disposición de desechos son más simples en la FMS, sobre todo si se emplean sustratos agrícolas que pueden ocuparse como suplemento alimenticio.

### **1.1.3. Fermentación en medio sólido con hongos de la pudrición blanca de la madera**

Como se mostró en la Tabla 1.1 la FMS con hongos de la pudrición blanca de la madera - específicamente con *P. chrysosporium*- se ha enfocado al aprovechamiento de residuos agrícolas, aunque su capacidad selectiva de degradación de lignina ha sugerido su utilización para bioblanqueo (Katagiri y col., 1995). Así que los estudios de degradación de lignina son la mayor fuente de información sobre el crecimiento y actividad enzimática ligninolítica en FMS, a través de los cuales se ha logrado determinar que el crecimiento sucede en dos etapas en la FMS, en la primera ocurre la colonización del sustrato y se caracteriza por un incremento en la actividad respiratoria y una disminución de los azúcares libres presentes; para *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor* se ha estimado una duración de 8 días en promedio. La segunda etapa corresponde a la degradación de lignina y polisacáridos (Valmaseda y col., 1991). La FMS sobre paja de algodón con *P. chrysosporium* coincide con estas observaciones, la proteína soluble llega

al máximo al tercer día de incubación, coincidiendo con la máxima producción de CO<sub>2</sub>, y la degradación de lignina inicia el día 4 con una velocidad constante entre el día 7 y 12 (Kerem y col., 1992).

En cultivos por FMS sólo se tienen algunos reportes de actividad ligninolítica: la actividad lignina peroxidasa ha sido detectada durante la degradación de materiales lignocelulósicos por *Lentinula edodes* (Forrester y col., 1987) y con *T. versicolor* en FMS sobre paja de algodón (Valmaseda y col., 1991). Con *P. chrysosporium* en FMS sobre pulpa de madera de álamo, como actividad predominante se encontró la manganeso peroxidasa y la lignina peroxidasa se detectó en niveles muy bajos (Datta y col., 1991).

La eficiencia de la bioconversión de materiales lignocelulósicos con hongos de la pudrición blanca es afectada principalmente por el intercambio gaseoso del sistema (Zadrazil y Brunnert, 1981). En FMS este intercambio depende de la densidad y humedad inicial del sustrato, cuando el contenido de humedad es alto se reduce la fase gaseosa y se limita el intercambio gaseoso; si el contenido de humedad es bajo, las condiciones no son adecuadas por la alta tensión de agua e hinchamiento pobre del sustrato. Se ha observado que el crecimiento de *P. chrysosporium* y la degradación de lignina es mayor en atmósferas de oxígeno que en aire y se considera que es la limitación parcial de oxígeno la responsable de la degradación lenta de lignina (Puniya y col., 1994). Sin embargo, se ha demostrado que la transferencia de oxígeno no es el paso limitante en FMS con hongos ligninolíticos (Levonen-Muñoz y Bone, 1985) como sucede en la FmL donde el crecimiento, en forma de agregados microbianos o “pellets”, limita la transferencia (Leisola y col., 1983).

La humedad inicial adecuada para la degradación de lignina y materia orgánica en FMS se encuentra entre 66 y 80 % y aparentemente el tamaño de partícula no influye en la degradación de la lignina (Zadrazil y Brunnert, 1982).

El crecimiento de *P. chrysosporium* en FMS también se afectado por el tipo de inóculo, el crecimiento se detiene a las 72 horas si se inocula con esporas y se prolonga por un tiempo mayor si se inocula con micelio, sin embargo, no se conocen los factores que detienen el crecimiento (Martin y Nicoli, 1987).

**1.2. COMPUESTOS RESISTENTES A LA DEGRADACIÓN**

Son numerosos los compuestos resistentes a la degradación microbiana, aquellos que no son biodegradables y persisten en el ambiente se les denomina resistentes. Es importante distinguir entre compuestos de origen natural, como la lignina, y aquellos que son producto de la síntesis química, llamados xenobióticos. Estos últimos son extraños a los sistemas biológicos debido a que no han sido expuestos a ellos en el curso de la evolución y en consecuencia tienden a acumularse en el ambiente.

La resistencia de los compuestos a la degradación microbiana es muy variada, algunos xenobióticos pueden ser degradados rápidamente mientras que compuestos naturales, tales como la lignina, son extremadamente resistentes. En la Tabla 1.2 se citan grupos de compuestos de diferente resistencia a la degradación microbiana, por ejemplo, el *p*-clorofenol tiene una vida media de tres días en tanto que la vida media del DDT es de varios meses.

**Tabla 1.2. Degradabilidad de compuestos xenobióticos.**

<u>Fácilmente degradables</u>	<u>Moderadamente degradables</u>	<u>Difíciles de degradar</u>
Tolueno	Aceite crudo	Tricloroetano
Benceno	Aceites lubricantes	Cloruros de vinilo
Alcohol isopropílico	Carbón de hulla	Bifenilos policlorados (BPCs)
Metanol	Creosotas	DDT
Cetonas	Pentaclorofenol	Clordano
Fenoles	Nitrobenceno	Heptacloro
Acrilonitrilo	Anilina	
Combustible diesel	Cadenas alifáticas largas	
<i>p</i> -clorofenol	Ftalatos	

Fuente: Leahy y Brown, 1994.

Recientemente se han identificado diversos microorganismos capaces de degradar compuestos resistentes, en algunos casos la oxidación es total hasta la producción de CO<sub>2</sub> y agua, proceso llamado mineralización, en otras transformaciones se producen diversos productos que pueden tener propiedades tóxicas.

La degradación de xenobióticos se favorece ocasionalmente por un proceso llamado cometabolismo, por el que un microorganismo que crece en un sustrato particular oxida a un segundo sustrato que no es asimilable como fuente de carbono y energía.

### **1.2.1. Factores que afectan la biodegradación de compuestos resistentes**

El carácter resistente de un compuesto está directamente relacionado con los factores que afectan la velocidad y grado de degradación en un ambiente dado. Las propiedades físico químicas de los compuestos definen su comportamiento en los ecosistemas, pero sin duda alguna los factores ambientales también influyen en su degradación en diferentes formas, por ejemplo, evitando el crecimiento de microorganismos, disminuyendo la disponibilidad del compuesto e incluso modificando la expresión genética (Singleton, 1994). En la Tabla 1.3 se muestran algunas de las características, asociadas al ambiente y a los compuestos, que afectan la degradación biológica de estos últimos (Fewson, 1988).

**Tabla 1.3. Factores que afectan la biodegradación de compuestos resistentes.**

<u>Asociados a los compuestos</u>	<u>Asociados al ambiente.</u>
Tamaño molecular, forma, carga y grupos funcionales	El material es físicamente inaccesible
Composición iónica, concentración, solubilidad y volatilización.	pH, pO <sub>2</sub> , temperatura, potencial redox
Durante la degradación pueden convertirse en productos que interfieren con el metabolismo	Presencia de interfases.
No es transportado hacia la célula, porque no es inductor adecuado para las enzimas o factores de transporte	Ausencia de microorganismos apropiados para la degradación
No es susceptible del ataque inicial porque no existen enzimas adecuadas	Deficiencia de cometabolitos, nutrientes esenciales, radicales reactivos o presencia de otros compuestos orgánicos e inorgánicos
	Calidad e intensidad de luz.

Aunque no existe una sola característica que pueda definir el grado de resistencia de un compuesto, sí se puede mencionar un conjunto de características que dificultan la biodegradación:

- a) Polimerización o ramificación del compuesto.
- b) Componentes estables que están unidos por enlaces que pueden no ser fácilmente hidrolizados o escindidos.
- c) Presencia de residuos policíclicos, aromáticos o enlaces éter.
- d) Presencia de grupos cloruro, nitro y sulfato (especialmente cuando se encuentran en la posición *meta* de anillos bencénicos o en casos de sustitución múltiple).

La importancia relativa de estas características para la degradación, depende del microorganismo y condiciones ambientales, algunas propiedades (tamaño, grado de ramificación, hidrofobicidad) afectan la concentración que puede alcanzarse en la solución, la accesibilidad al ataque enzimático y el transporte celular. El tipo de enlace, sustitución o carga también afectan la posibilidad de que el compuesto sea usado como sustrato de las enzimas o proteínas de transporte.

### **1.2.2. Biodegradación de compuestos resistentes**

Los problemas ambientales asociados a la acumulación de compuestos xenobióticos han generado un gran interés por identificar microorganismos capaces de degradarlos, actualmente se conocen varios microorganismos, que incluyen hongos y bacterias. En la Tabla 1.4 se muestran los que han sido más ampliamente estudiados incluyendo también los compuestos que pueden degradar. Es importante hacer notar que el hongo de la pudrición blanca, *P. chrysosporium*, es uno de los que presenta el más amplio espectro de compuestos susceptibles de degradación.

Algunas bacterias son capaces de degradar una amplia variedad de contaminantes orgánicos, pero generalmente se requiere la acción conjunta de diversas bacterias para completar la degradación de los compuestos, tal es el caso de los BPCs. Aunque el crecimiento de las bacterias puede ser estimulado por la presencia del compuesto, la disponibilidad de oxígeno y nutrientes en el ambiente puede ser un factor limitante (Leahy y Brown, 1994).

A pesar de que se han identificado algunas bacterias anaerobias, capaces de degradar por vías reductivas algunas compuestos resistentes, tales como disolventes clorados, la clave y probablemente también la limitante de su aplicación es mantener las condiciones de anaerobiosis.

**Tabla 1.4. Microorganismos degradadores de compuestos xenobióticos.**

<u>Compuesto</u>	<u>Microorganismo</u>
Tricloroetano	Metanotrofos <i>Escherichia coli</i>
Pentaclorofenol	<i>P. chrysosporium</i> Bacterias anaerobias <i>Flavobacterium</i>
Disolventes clorados	<i>Methylobacter sp.</i> <i>Methylococcus sp.</i> <i>Pseudomonas putida</i>
Compuestos BTEX (Benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos)	<i>P. chrysosporium</i> Bacterias anaerobias
Hidrocarburos aromáticos policíclicos	Hongos de la pudrición blanca <i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Cunninghamella elegans</i> <i>Mycobacterium</i>
Hidrocarburos alifáticos	<i>Pseudomonas sp.</i> <i>Acinetobacter sp.</i> <i>Mycobacterium sp.</i> <i>Candida sp.</i> <i>Anthrobacter sp.</i>
Insecticidas de alquil haluros	<i>P. chrysosporium</i>
Acido 2,4-diclorofenoxiacético	<i>Alcaligenes xylooxidans</i>
Clorobenzoatos	<i>Pseudomonas sp.</i> <i>Nocardia sp.</i> <i>Anthrobacter sp.</i>

Fuente: Leahy y Brown (1994) y Singleton (1994).

La capacidad de degradación de compuestos xenobióticos de los hongos es mayor que la de las bacterias, debido a su amplio espectro de actividad y flexibilidad metabólica pueden emplearse en diversos *habitats* y con diferentes sustratos. Su crecimiento miceliar les da la posibilidad de extenderse sobre el área contaminada, que en el caso de la biorremediación les permite buscar diferentes sustratos (Illman y Washington, 1993).

Los hongos poseen diversas enzimas que participan en la transformación de compuestos resistentes, las más ampliamente estudiadas son las ligninasas de los hongos de la pudrición blanca de la madera (*P. chrysosporium* y *Trametes versicolor*, entre otros). Su capacidad de degradación de compuestos resistentes ha sugerido su uso en procesos de tratamiento de aguas residuales, suelos contaminados y aguas subterráneas (Morgan y col., 1991). La mayoría de los estudios de biodegradación han sido realizados con cepas de *P. chrysosporium*. Un método alternativo para la eliminación de contaminantes del ambiente es el uso de fenol oxidasas fúngicas (involucradas en la polimerización y despolimerización de la lignina), particularmente la lacasa que puede ligar los contaminantes al humus del suelo (Singleton, 1994).

### **1.2.3. Degradación de compuestos resistentes con *P. chrysosporium***

La naturaleza aleatoria de la estructura de la lignina implica que los hongos ligninolíticos desarrollen mecanismos de degradación no específicos que pueden funcionar con diversos compuestos de estructura aromática. Bajo condiciones de cultivo que favorecen la actividad ligninolítica muchos compuestos xenobióticos, tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos, BPCs, plaguicidas, nitrotoluenos y colorantes industriales son oxidados y mineralizados por *P. chrysosporium* (Tabla 1.5).

El primer paso en la degradación de muchos químicos es la formación de radicales libres altamente reactivos por adición o eliminación de un electrón, esos radicales reaccionan con otras moléculas sustrayendo o cediendo electrones, de tal manera que ocurren reacciones de radicales en cadena mediante mecanismos no específicos.

**Tabla 1.5 Compuestos susceptibles de degradación por *P. chrysosporium* en condiciones de cultivo ligninolíticas.**

<b>Fenoles clorados</b>	<b>Aquil haluros</b>
Pentaclorofenol	Lindano
Triclorofenol	Clorano
Diclorofenol	
Cloroguayacoles	<b>Nitrotoluenos</b>
	Trinitrotoluenos
<b>Bifenilos policlorados</b>	Dinitrotoluenos
Arocloro 1254	
Tetraclorobifenilo	<b>Colorantes</b>
	Colorantes azo
<b>DDT</b>	Colorantes poliméricos
	Colorantes trifenilmetano
<b>Hidrocarburos aromáticos policíclicos</b>	
Fluoreno	<b>Biopolímeros</b>
Antraceno	Lignina y clorolignina
Fenantreno	Celulosa
Pireno	Lignina Kraft
Benzo $\alpha$ Pireno	

Fuente: Field y col. (1993) y Aust (1988)

En el caso de compuestos altamente oxidados (BPCs, fenoles clorados y compuestos nitroaromáticos) la degradación puede proceder a través de una reacción de reducción mediante la lignina peroxidasa, pero se ha demostrado que existen otros mecanismos mediante los cuales *P. chrysosporium* puede transformar compuestos altamente oxidados como el trinitrotolueno (TNT). En cultivos sin actividad ligninolítica esos compuestos pueden ser reducidos por un sistema redox dependiente de la membrana plasmática, en el que la velocidad de reducción del TNT está correlacionada con la velocidad de bombeo de protones (Barr y Aust, 1994).

Otras aplicaciones de importancia industrial son el biopulpeo (eliminación de la lignina sin afectar la celulosa y hemicelulosa) y el bioblanqueo (eliminación de lignina o de sus derivados que dan una coloración café a la pulpa de papel). Incluso el tratamiento de efluentes de la industria papelera y de la pulpa de papel, en los que la eliminación de ligninas cloradas es difícil de lograr con un sistema de lodos activados, puede obtenerse por *P. chrysosporium* (Boominathan y Reddy, 1992).

#### **1.2.4. Ventajas de *P. chrysosporium* en la degradación de compuestos resistentes**

La capacidad de los hongos de la pudrición blanca y específicamente de *P. chrysosporium* para mineralizar diversos compuestos tiene ventajas en la biodegradación de contaminantes ambientales (Aust, 1988). Las peroxidasas que produce son extracelulares, lo que permite la degradación de muchos compuestos que son inaccesibles a causa de su insolubilidad o enlace a los materiales del suelo; esto permite tolerar concentraciones considerablemente altas de compuestos que pueden ser tóxicos. La naturaleza no específica del mecanismo facilita la oxidación de mezclas de compuestos que no son degradados por sistemas bacterianos.

El hecho de que el sistema ligninolítico funcione por un mecanismo de radicales libres permite la oxidación de diversos materiales mediante una cinética de pseudo primer orden, que procede hasta que la enzima o el  $H_2O_2$  lleguen a ser limitantes.

Otra ventaja es que no se requiere una adaptación al sustrato, debido a que las enzimas se sintetizan en respuesta al agotamiento de la fuente de carbono, nitrógeno o azufre y para su crecimiento pueden utilizarse materiales no costosos: residuos de hojas, olote de maíz, astillas de madera o excedentes de granos. Además, la actividad enzimática se presenta aun cuando la concentración del compuesto está en niveles mínimos que no inducen la síntesis de las enzimas comunes.

### **1.2.5. Producción de enzimas ligninolíticas para la degradación de compuestos resistentes**

Las propuestas de aplicación comercial de *P. chrysosporium* para el tratamiento de efluentes y procesos de biopulpeo contemplan la producción de enzimas ligninolíticas más que el cultivo del microorganismo. Se tienen ciertos avances en la producción de enzimas con bioreactores para cultivo en medio líquido no agitado o inmovilizado. Sin embargo, independientemente de la fuente de carbono y tipo de cultivo se tienen picos muy pronunciados de actividad ligninolítica, lo que dificulta el cultivo continuo (Feijoo y col., 1995).

Con el fin de obtener mayores cantidades de enzimas se han probado diferentes tipos de bioreactores, tales como reactores de mezclado completo en tanque agitado y reactores Airlift, que permiten una alta velocidad en la transferencia de oxígeno, pero aparentemente un alto grado de mezclado implica un aumento en la actividad proteolítica con la consecuente disminución de actividad ligninolítica. Se han estudiado también reactores de tipo rotacional de contacto y membrana fibrilar, pero en este caso el desarrollo de la biopelícula y su control son complejos (Lema, 1995).

Para la producción continua de lignina peroxidasa (LiP) (Feijoo y col., 1995) y manganoso peroxidasa (MnP) (Lema, 1995) se han propuesto reactores de lecho fijo con *P. chrysosporium* inmovilizado en espuma de poliuretano. Con este tipo de reactores se han obtenido niveles importantes de actividad, pero el crecimiento del micelio en los cubos de poliuretano dificulta la transferencia de oxígeno, provocando una disminución de actividad, y hace más complicada la determinación de la velocidad de reciclado adecuada para una óptima producción de enzimas.

## **1.3. COLORANTES**

### **1.3.1. Clasificación y características**

Comúnmente los compuestos usados en la coloración de materiales (fibras, papel, plásticos, pinturas) se clasifican como colorantes y pigmentos con base en su solubilidad y

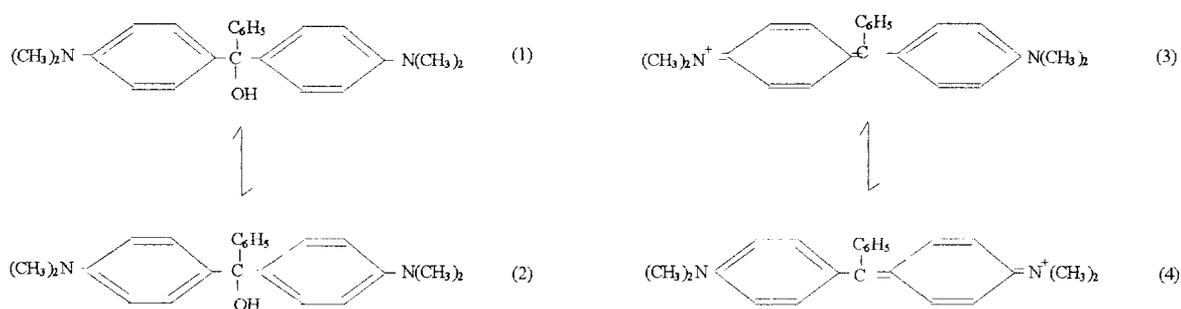
mecanismo de enlace al material. Los primeros son generalmente solubles en agua y tienen alta afinidad por el material que colorean, los pigmentos se consideran insolubles en el medio en el cual se usan y requieren de mordentes para fijarse a los materiales. Un compuesto puede actuar como colorante o pigmento dependiendo de la estructura química ya que la insolubilidad de los compuestos puede conseguirse formando compuestos orgánicos insolubles.

Los colorantes a su vez pueden clasificarse por su estructura química, por el método de aplicación o por su utilización. La clasificación en base a su utilización en la industria está dada por sus propiedades y como se muestra en la Tabla 1.6 se dividen en cuatro grupos de características bien definidas (Trutman, 1990). La clasificación según su estructura química se fundamenta en las teorías clásicas del color y en el concepto de grupo cromóforo; en el Colour Index (1971) son divididos en 29 grupos, de los cuales se seleccionaron a los de tipo azo y trifenilmetano como modelo de estudio para el presente trabajo.

**Tabla 1.6. Clasificación de los colorantes y propiedades**

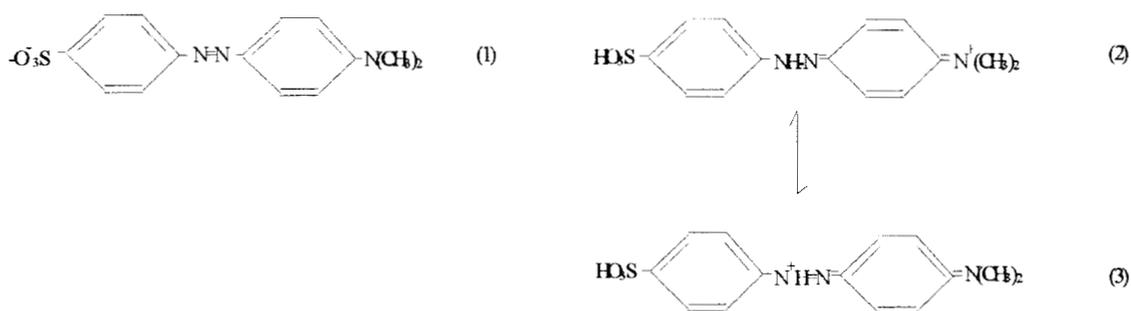
<b>Tipo</b>	<b>Propiedades</b>	<b>Aplicaciones</b>
Ácido	Aniónicos y solubles en agua debido a la presencia de grupos hidroxilo  Grupo cromóforo característico -SO <sub>3</sub> H  Incluyen colorantes de tipo azo	Tinción de lana, nylon, piel y acrilanes modificados  Usados en menor proporción en cosméticos y alimentos
Básico	Catiónicos y solubles en agua.  Poseen grupos amino que les dan un carácter catiónico en solución ácida diluida  Incluyen derivados de difenilmetano y trifenilmetano principalmente	Tinción de acrilicos, nylon y poliester modificado, aunque se usan poco en la industria textil
Directo	Aniónicos e hidrosolubles debido a la presencia de grupos sulfónicos  Casi todos son de tipo azo	Tinción de algodón, celulosa, papel, piel y fibras como lino, cáñamo, seda, lana
Disperso	No aniónicos e insolubles en agua  Incluyen derivados de antroquinona y de tipo azo	Tinción poliester, nylon, acetato de celulosa fibras acrílicas

**Color y constitución química.** Los colorantes dan color a los materiales porque retienen selectivamente algunas longitudes de onda que inciden en la superficie del material y que son reflejados como un color visible. Aunque todos los compuestos orgánicos absorben radiación, sólo los llamados cromóforos (nitro, nitroso, azo o quinonoides entre otros) tienen bandas de absorción dentro del rango de radiación al cual es sensible el ojo humano. La mayoría de los colorantes se presentan como estructuras resonantes con una distribución de valencia dentro de las moléculas, que determina si la estructura sea colorida. La base del verde de malaquita es incolora porque la resonancia es restringida a la distribución de valencias dentro del anillo bencénico (Figura 1.1) involucrando pequeños cambios en la estructura. En medio ácido el ion libre del colorante trifenilmetano es capaz de presentarse en dos formas resonantes que involucran una redistribución electrónica mayor, acompañada por la aparición del color característico del verde de malaquita.



**Figura 1.1. Estructuras de resonancia del verde de malaquita.**

En el caso de los colorantes azo, específicamente del naranja de metilo, en solución básica existe en la forma (1), que se muestra en la Figura 1.2, en la cual la resonancia es restringida a los cambios de valencia dentro del anillo bencénico. La adición de ácido permite un exceso de iones hidrógeno que convierten a la molécula en la estructura (2), que es altamente coloreada a causa de la resonancia entre (2) y (3) que permite una redistribución de valencias más significativa (Trutman, 1990).



**Figura 1.2. Estructuras de resonancia del naranja de metilo.**

**Factores que afectan el espectro de absorción de los colorantes.** El color es el resultado directo del espectro de absorción visible, que está estrechamente relacionado a la estructura molecular, grado de agregación y efecto del medio ambiente. El espectro de un colorante es afectado por interacciones electrónicas con cualquier otra molécula con la que puede estar asociado por enlaces de hidrógeno, interacciones dipolares, efecto dieléctrico (particularmente con colorantes iónicos), efecto estérico o cristalización (Graham, 1975).

*Agregación.* La adición de coloides lipofílicos (particularmente gelatina) a soluciones de colorantes de cianina produce un espectro similar al de los colorantes con un alto estado de agregación, es decir, se produce un efecto de polimerización en la solución acuosa. Se ha encontrado que colorantes iónicos (azul de metileno, azul de toluidina, tionina y cloruro de pianocianol) son absorbidos en núcleos ácidos como cationes monoméricos pero forman agregados en agar.

*Efecto de disolventes.* Los disolventes polares interactúan electrostáticamente con los cromóforos polares y tienden a estabilizar los estados electrónicos básicos y excitados desplazando las bandas de absorción. En el caso de un colorante fuertemente polar la longitud de onda de máxima absorción cambia a una longitud de onda menor al incrementarse la polaridad del solvente y lo contrario ocurre con un colorante ligeramente polar. Este efecto ha sido atribuido a la formación de una zona dipolar alrededor de los átomos polares de la molécula de colorante.

**Colorantes azo.** Se caracterizan por tener como cromóforo al grupo azo ( $-\text{N}=\text{N}-$ ) usualmente asociado a grupos hidroxilo o amino auxocrómicos. Estos compuestos son subclasificados en base al número y arreglo de los grupos azo presentes.

Comprenden una lista de colorantes de muy amplia aplicación: colorantes para fibras naturales y sintéticas; para pigmentos y disolventes e incluso para aplicación en fármacos, alimentos y cosméticos. Incluyen colorantes de tipo ácido, mordentes y directos con matices que típicamente van del amarillo verdoso al rojo, azul y verde.

**Colorantes trifenilmetano.** Tienen como cromóforo al grupo quinonoide ( $C=Ar=NH$  o  $C=Ar=O$ ), que se completa con dos grupos arilo unidos al átomo de carbono del metano y por la introducción de dos o tres grupos auxocrómicos usualmente en posición *para* con respecto a este átomo de carbono. La introducción de un grupo carboxilo en posición *orto* con respecto al -OH les confiere propiedades mordentes mientras que un grupo sulfónico los convierte de colorantes ácidos a básicos.

Pueden subdividirse en amino y triamino, aminohidroxi e hidroxi derivados de trifenilmetano. Usualmente poseen una coloración roja, violeta, azul y verde, caracterizados por tener un alto poder de tinción y matices brillantes, pero sólo presentan moderada firmeza a la luz. En esta clase se incluyen colorantes ácidos, básicos, directos y disolventes; para uso en cosméticos y textiles.

### **1.3.2. Importancia ambiental**

Como desecho industrial los colorantes se encuentran en las aguas superficiales dando coloraciones que usualmente van desde el amarillo pálido hasta el café amarillento o café oscuro; la coloración se debe a sustancias solubles que permanecen después de eliminar la materia suspendida.

#### **1.3.2.1. Tratamientos fisico-químicos**

Debido a que los colorantes están formulados para ser resistentes a la degradación bajo condiciones oxidantes y a que las estructuras no son comunes en la naturaleza, no es sorprendente que la eliminación de color sea difícil en un sistema aerobio (Castillo y col., 1993). A nivel industrial el tratamiento de efluentes de la industria textil, se realiza por

métodos físico-químicos, los procesos comúnmente empleados son: coagulación y precipitación, osmosis inversa, ultrafiltración, tratamiento por electrólisis, ozono y cloración (Castillo y col., 1993). A continuación se presenta una breve descripción de los procesos así como sus características más importantes.

*Coagulación y precipitación.* El agua a tratar se pasa a través de celdas electroquímicas en las cuales se generan especies coagulantes que absorben y precipitan los contaminantes. Se han demostrado eficiencias de eliminación de color mayores al 90% para diferentes tipos de colorantes.

*Osmosis inversa y ultrafiltración.* Es efectiva en la eliminación de color de un 95 a 100% y altamente eficiente en el tratamiento de colorantes básicos, ácidos, directos, dispersos y reactivos.

*Tratamiento por electrólisis.* Utiliza electrodos que generan especies altamente oxidadas que disminuyen, vía oxidación, todas las sustancias hasta CO<sub>2</sub>, agua y óxidos de los elementos. Ofrece eficiencias de eliminación hasta del 96% y decoloración total.

*Tratamiento con ozono.* Es una oxidación casi dos veces mayor a la que produce el cloro, es muy eficaz con colorantes básicos, ácidos y directos, con colorantes reactivos se toleran concentraciones de hasta 1 g/l. Para colorantes azo la combinación con carbón activado mejora notablemente la eliminación de color.

*Tratamiento con cloro.* Es uno de los métodos más utilizados para la eliminación de color por oxidación de los colorantes, en general el tratamiento es muy eficiente para colorantes solubles alcanzando valores de hasta 90%.

En general estos tratamientos tienen la desventaja de producir lodos relativamente hidrofílicos, que deben ser sometidos a filtración o centrifugación para eliminar el exceso de agua (Degremont, 1979).

### **1.3.2.2. Tratamientos biológicos**

La resistencia de los colorantes a la degradación microbiana ha generado el interés de buscar microorganismos y condiciones de operación en las cuales puedan ser eliminados. Se han identificado diversos microorganismos (Tabla 1.7) que incluyen bacterias, actinomicetos

y hongos de la pudrición blanca, capaces de causar la decoloración ya sea por una simple transformación del grupo cromóforo o por la degradación de la molécula.

**Tabla 1.7. Microorganismos capaces de degradar colorantes.**

<u>Colorante</u>	<u>Microorganismo</u>	<u>Referencia</u>
Poliméricos	<i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>P. chrysosporium</i>	Platt y col., 1985
Azo	<i>Flavobacterium sp.</i> , <i>Frankia sp.</i> <i>Streptomyces sp.</i> <i>P. chrysosporium</i>	Cao y col., 1993  Paszczyński y col., 1991; Chao y Lee 1994; Spadaro y col., 1992; Pasti y col., 1992; Paszczyński y col., 1992; Goszczyński y col., 1994
Reactivos	<i>Streptomyces sp.</i>	Zhou y Zimmermann, 1993
Heterocíclicos	<i>P. chrysosporium</i>	Ollikka y col., 1993
Trifenilmetano	<i>P. chrysosporium</i>	Bumpus y Brook 1988.

Algunas bacterias son capaces de degradar los colorantes azo mediante el rompimiento reductivo del enlace; los productos reducidos pueden ser oxidados vía desaminación y/o hidroxilación. En el caso de *Flavobacterium* la decoloración es atribuida a una peroxidasa, que muestra una alta especificidad por los colorantes (Cao y col., 1993), característica en general mostrada por casi todas las bacterias estudiadas; por ejemplo la degradación total del Amarillo mordente 3 sólo se ha logrado por consorcios bacterianos, alternando una fase areobia y una anaerobia (Haug y col., 1991). Bajo condiciones anaerobias los enlaces azo son reducidos hasta aminas aromáticas incoloras que pueden ser tóxicas o carcinógenas. (Cripps y col., 1990).

En el caso de los actinomicetos la decoloración se atribuye a peroxidases similares a la MnP, aunque la adsorción de colorante en el micelio contribuye notablemente a la eliminación (Zhou y Zimmermann, 1993). La degradación depende en gran manera de la estructura y se ha observado una alta especificidad por el sustrato que puede mejorarse por la introducción de grupos químicos en la molécula del colorante (Paszczyński y col., 1992).

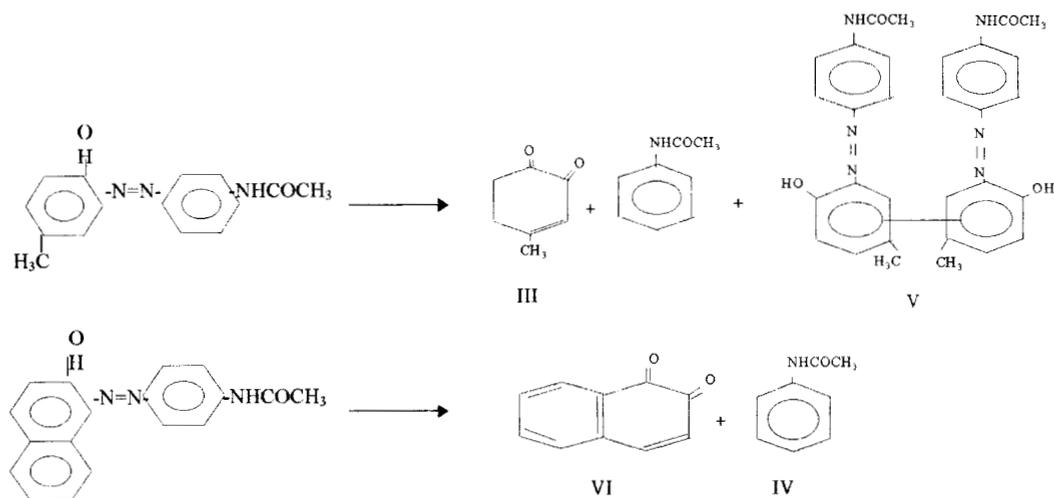
La capacidad de decoloración de *P. chrysosporium* fue demostrada inicialmente con colorantes azo poliméricos utilizados como sustrato modelo para la determinación de la actividad ligninolítica (Glenn y Gold, 1983). Estudios posteriores con Poly-azul sugirieron que la actividad ligninolítica era la responsable de la decoloración en el cultivo y que esta habilidad se desarrollaba independientemente de la presencia del colorante. Esos estudios aunado al conocimiento de la capacidad de *P. chrysosporium* para degradar diversos compuestos orgánicos, fijaron la base para el desarrollo de numerosas investigaciones en la biodegradación de colorantes. Cripps y col. (1990) demostraron la degradación del Naranja II, Tropaeolin O, Rojo Congo y Azul B en presencia de *P. chrysosporium* y con extractos crudos en ausencia del microorganismo.

*Factores que afectan la degradación de colorantes por P. chrysosporium.* Los grupos químicos presentes en el anillo aromático de los colorantes afectan el nivel de degradación de los colorantes, Paszczyński y col. (1992) encontraron que colorantes con grupos hidroxilo en posición 1 y 2 son degradados rápidamente. Además se sabe (Paszczyński y col., 1991) que la degradación puede mejorarse con la introducción de ciertos grupos que se encuentran naturalmente en la lignina.

Paszczyński y Crawford (1991) encontraron que el alcohol veratrílico está involucrado en la oxidación de colorantes azo por la LiP, ya que permite completar el ciclo catalítico de la enzima.

*Mecanismos de degradación de los colorantes.* Se han realizado algunos trabajos con el fin de establecer las rutas metabólicas y las reacciones implicadas en la degradación de los colorantes. Spadaro y Renganathan (1994) demostraron que la degradación del 1-(4'-acetamidofenilazo)-2-naftol (II), análogo del Amarillo disperso 3, inicia con una oxidación por dos electrones para formar un carbanion que es susceptible de un ataque nucleofílico por agua, reacción en la que se forman intermediarios inestables que finalmente dan lugar a la formación de acetanilida y diacetamidobifenilo. En el caso del Amarillo disperso 3 (I) (Figura 1.3) se han identificado el 4-metil-1,2-acetanilida (II), acetanilida (III) y un dimero del colorante (IV). Los productos de reacción encontrados en los ensayos con extractos

enzimáticos y en el cultivo de *P. chrysosporium* son similares, lo que indica que la LiP y la MnP están involucradas en la degradación de los colorantes.



**Figura 1.3. Productos de reacción identificados en la oxidación de Amarillo disperso 3 (I) y del 1-(4'-acetamidofenilazo)-2-naftol (II).**

De manera similar Goszczynski y col. (1994) encontraron que las enzimas convierten a los colorantes azo sulfonados en radicales catiónicos susceptibles de un ataque nucleofílico por agua. La reacción inicia con el rompimiento asimétrico o simétrico del enlace azo, formándose en el primer caso quinonas y derivados de diazono; en el rompimiento simétrico se forman quinonas monoaminas y compuestos nitroso derivados (Figura 1.4). Los compuestos intermediarios pueden experimentar oxidaciones y transformaciones hidrolíticas para formar finalmente diversos compuestos orgánicos y amonio.

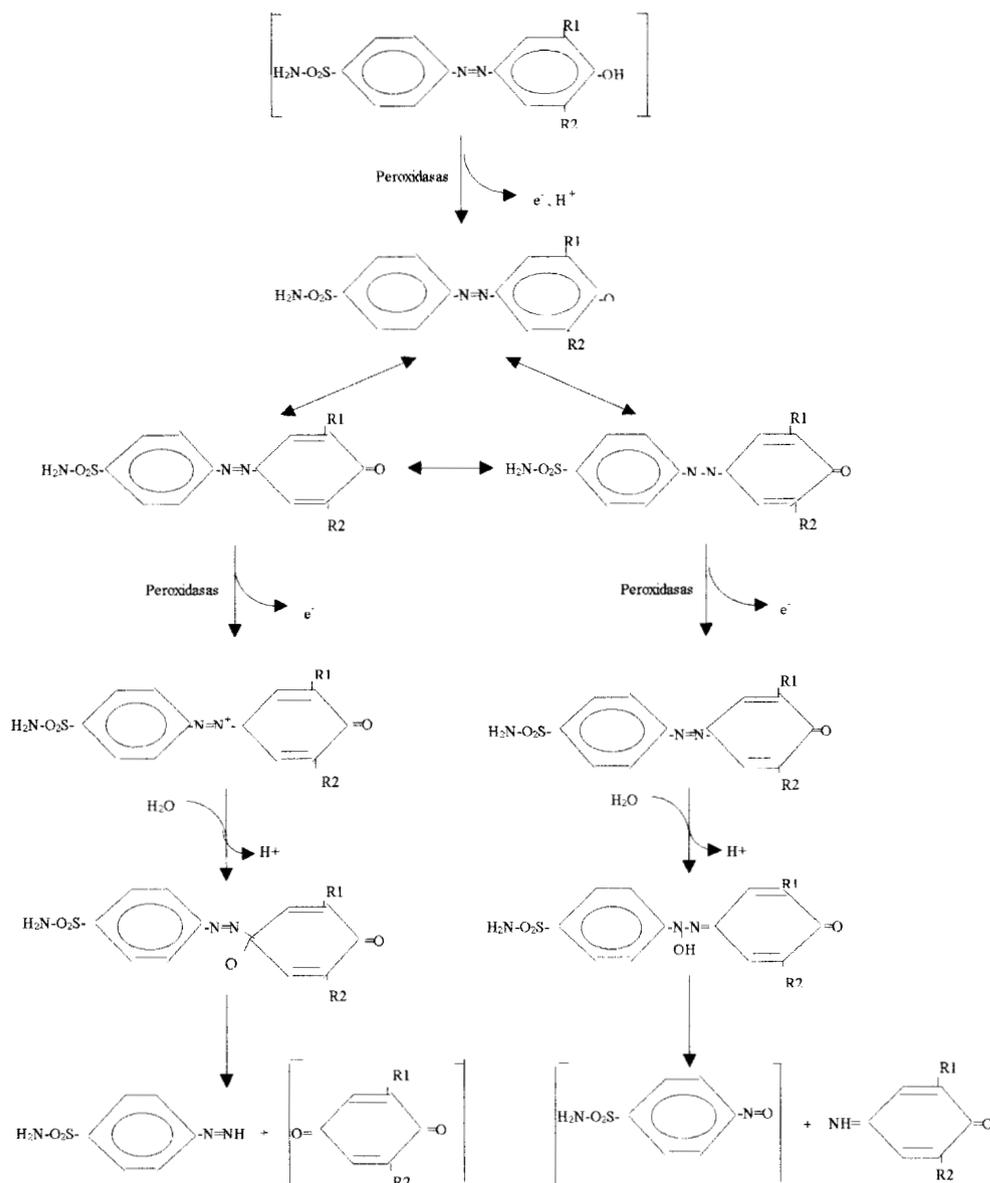


Figura 1.4. Mecanismo propuesto para el rompimiento simétrico y asimétrico de los colorantes azo sulfonados por *P. Chryso sporium*. Para el colorante azo 1, R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub> y para el colorante azo 2, R<sub>1</sub> = H y R<sub>2</sub> = OCH<sub>3</sub>.

Bumpus y Brock (1988) demostraron que la degradación de colorantes de tipo trifenilmetano (cristal violeta, pararosalina, rojo cresol, azul de bromofenol, verde de etilo, verde de malaquita y verde brillante) procede vía reacciones de desmetilación, e incluso se identificaron los mismos metabolitos cuando se incubó con fluido extracelular o si los colorantes se adicionan al cultivo de *P. chryso sporium*.

## **1.4. *Phanerochaete chrysosporium***

### **1.4.1. Descripción y características**

*Phanerochaete chrysosporium* es un basidiomiceto que pertenece a los hongos de la pudrición blanca de la madera, es capaz de degradar la celulosa, hemicelulosa y lignina. Al igual que otros hongos invade el lumen de la pared celular donde secreta sus enzimas provocando que la madera se transforme en una masa esponjosa ligeramente coloreada y dispuesta en forma de franjas separadas por áreas de madera firme (Agrios, 1978). A estos hongos se les puede localizar en praderas y bosques sobre árboles vivos (causando la pudrición) o en madera de construcción en climas templados y húmedos.

*P. chrysosporium* posee hifas multinucleadas de pared delgada, con un diámetro de 3 a 7  $\mu\text{m}$ , septadas y poco ramificadas; usualmente el primer septo se encuentra a 1 mm de la punta (Burdsall y Esllyn, 1974).

Generalmente, *P. chrysosporium*, se propaga por esporas asexuales (conidias) pero también puede ser inducido a un ciclo sexual en el que se producen basidiosporas (Dhawale y Kessler, 1993). La formación de cuerpos fructíferos depende de la fuente de carbono, la glucosa la reprime en presencia de niveles fisiológicos de nitrógeno, pero la celulosa la induce (Gold y Cheng, 1979).

*P. chrysosporium* forma conidias que sólo se encuentran en hifas aéreas, preferentemente terminales, poseen una forma que va de ovalada a elíptica y se encuentran unidas a un conidioforo pobremente diferenciado. Puede también presentar clamidiosporas terminales o intercaladas (Burdsall y Esllyn, 1974), que son esporas rodeadas por una pared delgada formadas por la doble septación de la hifa y son liberadas al fragmentarse.

La capacidad de *P. chrysosporium* para degradar la lignina hasta  $\text{CO}_2$  se debe a su sistema ligninolítico extracelular compuesto de dos peroxidasas llamadas lignina peroxidasa (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP), además de otras enzimas productoras de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Estas peroxidasas catalizan reacciones de oxidación por medio de radicales libres que causan la despolimerización de la lignina y por esos mismos sucede la oxidación de compuestos xenobióticos (Aust, 1988). En la Figura 1.5 se muestra una representación esquemática de

las reacciones y mecanismos del sistema enzimático (Field y col., 1993), donde se observa como la acción conjunta del sistema permite la degradación de lignina.

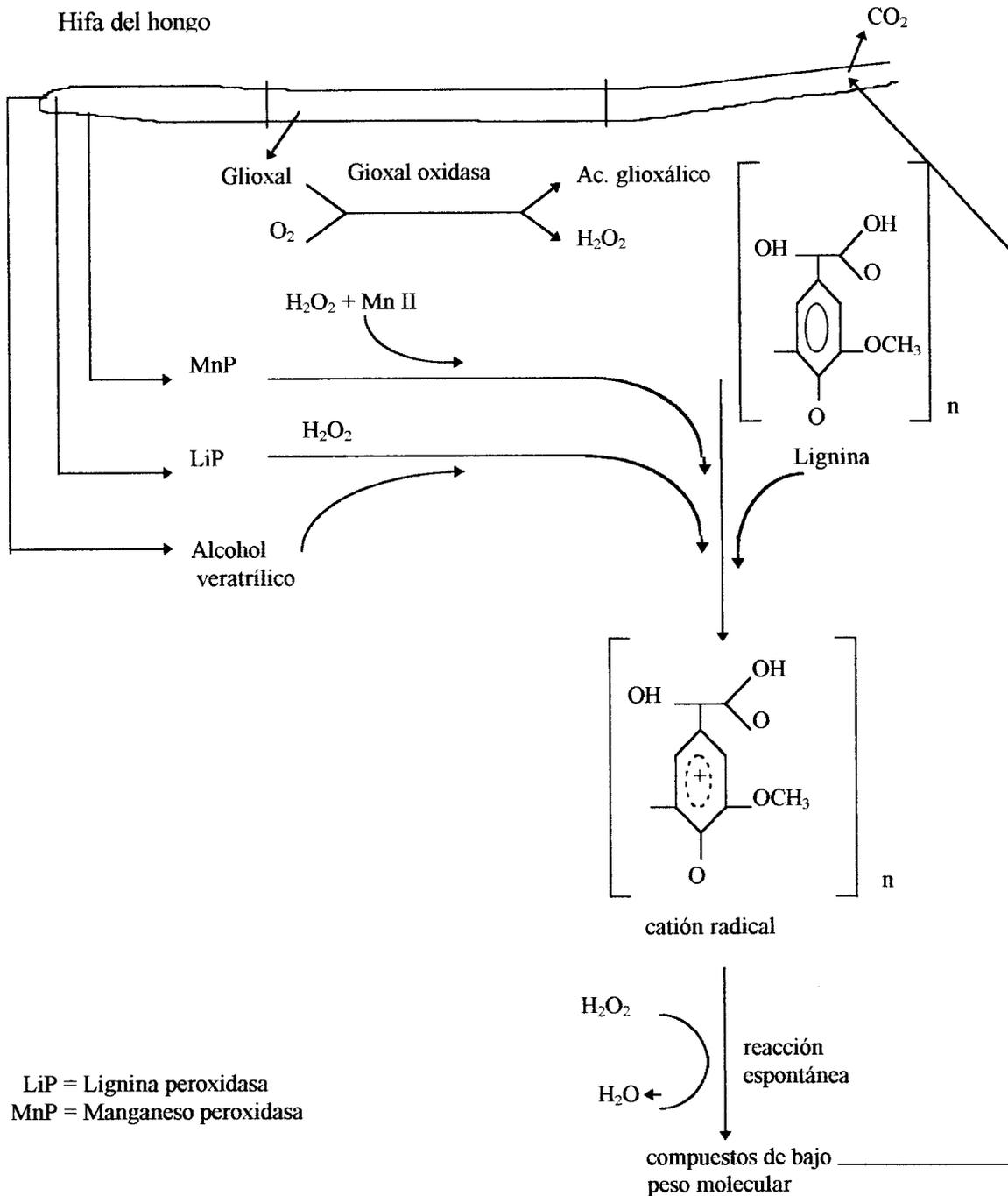


Figura 1.5. Esquema de las enzimas y mecanismos de acción que constituyen el sistema enzimático ligninolítico de *P. chrysosporium*.

### 1.4.2. Lignina peroxidasa

La LiP es una hemoproteína glicosilada con un peso molecular de 38 a 43 kDa que existe en múltiples formas (isoenzimas) asignadas como H1, H2, H6, H7, H8 y H10 de acuerdo al orden de separación en cromatografía de intercambio aniónico (Odier y Artaud, 1992). El balance y la naturaleza de las isoenzimas está determinado por las composición del medio de cultivo (por ejemplo, limitación de la fuente de carbono o nitrógeno), tipo de cultivo e incluso por la cepa (Glumoff y col., 1990).

Se ha demostrado que cada isoenzima posee diferentes características cinéticas así como estabilidad a pH y temperatura. Para las seis isoenzimas se ha determinado una constante de afinidad ( $K_m$ ) por el  $H_2O_2$  entre 13 y 77  $\mu M$  y de 83 a 250  $\mu M$  para el alcohol veratrílico (Farrel y col., 1989). El pH para máxima actividad se encuentra entre 2.3 y 3.5, aunque generalmente a pH de 2.5 son muy inestables (Tien y Kirk, 1988).

La LiP, al igual que otras peroxidases, posee dos estados de mayor oxidación denominados LiP I y LiP II que están involucrados en el ciclo catalítico; la enzima LiP I se convierte en LiP II y subsecuentemente en la enzima nativa mediante reducciones sucesivas por su sustrato. En el esquema de reacción propuesto (Figura 1.6) la enzima es oxidada a LiP I por un equivalente de  $H_2O_2$ ; LiP I cataliza entonces la oxidación del compuesto RH (sustratos de lignina o compuestos modelo) para producir LiP II y un catión radical. El catión radical formado puede experimentar una variedad de reacciones no enzimáticas y la LiP II regresa al estado nativo por la oxidación de un segundo sustrato (Boominathan y Reddy, 1992).

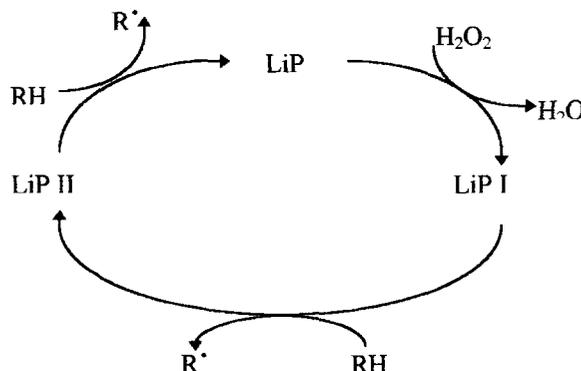


Figura 1.6. Ciclo catalítico de la lignina peroxidasa indicando los estados de oxidación implicados.

La LiP cataliza la oxidación de compuestos aromáticos monocíclicos que contienen uno o más grupos donadores de electrones; esos sustratos en presencia de LiP pueden experimentar reacciones de la degradación de lignina: rompimiento de enlaces entre C $\alpha$  y C $\beta$  de las subunidades de lignina, hidroxilaciones, dimerización de fenoles y desmetilaciones. La reacción más ampliamente estudiada es la oxidación del alcohol veratrílico (alcohol 3,4-dimetoxibencílico), que es el sustrato empleado en la determinación de actividad enzimática lignina peroxidasa. En esta reacción, la enzima oxidada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reacciona con el alcohol veratrílico para formar veratraldehído. La enzima regresa a su estado nativo por un exceso de alcohol veratrílico y el veratraldehído formado se difunde para oxidar a otros compuestos.

La LiP presenta una inhibición por sustrato por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que es competitiva con respecto al alcohol veratrílico en concentraciones superiores al K<sub>m</sub>; los estudios cinéticos han demostrado que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede reaccionar con LiP I (de igual manera que el alcohol veratrílico) para formar LiP II. En ausencia de un sustrato reductor, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede inhibir irreversiblemente a la LiP.

Los compuestos que típicamente compiten con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como el fluoruro y la azida, son inhibidores de la LiP. En el caso de los fluoruros se trata de una inhibición competitiva, en cambio con la azida sucede una inhibición no competitiva. Se han reportado otros compuestos que inhiben de manera no competitiva a la LiP, entre ellos se encuentran el ácido  $\alpha$ -ceto- $\gamma$ -metil butírico, tiourea y KCN (Tien, 1987).

### **1.4.3. Manganeso peroxidasa**

La MnP también es una hemoproteína glicosilada con un peso molecular de aproximadamente 46 kDa (Odier y Artaud, 1992) que se presenta como isoenzimas codificadas por diferentes genes y diferencialmente reguladas en respuesta a las condiciones ambientales (Pease y Tien, 1992). Las isoenzimas MnP, al igual que las LiP, muestran

diferentes propiedades cinéticas, para el  $H_2O_2$  se ha determinado un  $K_m$  entre 57 y 59  $\mu M$  y para manganeso de aproximadamente 36  $\mu M$  (Aitken y Irvine, 1990).

El ciclo catalítico de la MnP es similar al de la LiP, pero se requiere Mn(II) para completar el ciclo catalítico. El Mn(II) es oxidado a Mn(III) por la enzima y forma un complejo con  $\alpha$ -hidroxi-ácidos (tartrato, lactato, malato y citratos), que estabiliza al Mn(III) sin disminuir su poder reductor (Aitken y Irvine, 1990). Como se muestra en la Figura 1.7, la enzima es oxidada por  $H_2O_2$  a MnP I y rápidamente convertida a MnP II por reacción con un equivalente de Mn(II), dando lugar a la formación de Mn(III). En la reacción siguiente el Mn(II) reduce a MnP II a la forma nativa y el Mn(III) formado puede oxidar a los sustratos fenólicos identificados como AH, en la Figura 1.4. (Gold y Glenn, 1988).

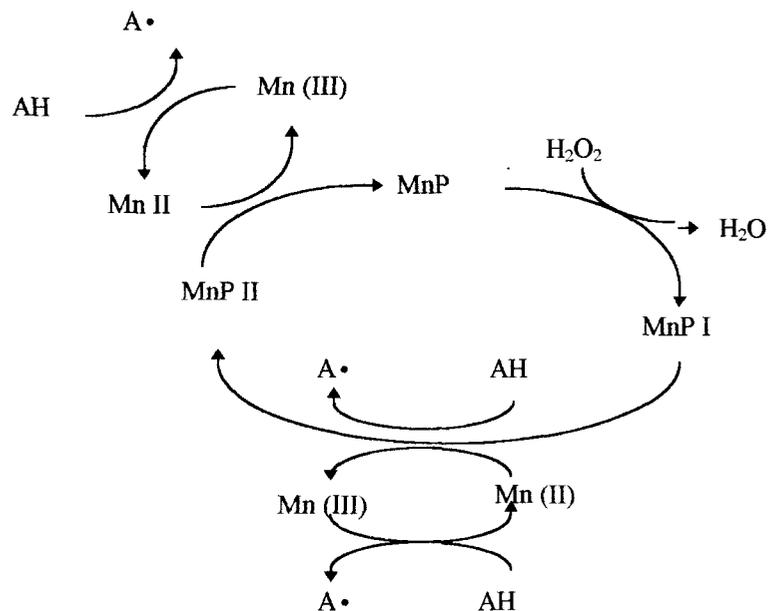


Figura 1.7. Ciclo catalítico de la manganeso peroxidasa de *P. chrysosporium* indicando los estados de oxidación implicados.

Algunas de las reacciones catalizadas por la MnP incluyen la oxidación de colorantes poliméricos y fenoles, descarboxilación y desmetilación de sustratos aromáticos y rompimiento oxidativo de modelos diméricos de ligninas fenólicas. La oxidación dependiente de Mn de estos compuestos se inhibe por iones metálicos ( $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  y

Fe<sup>3+</sup>), pero no se reporta efecto sobre la formación del complejo Mn(III) (Paszczynski y col., 1986).

#### **1.4.4. Enzimas productoras de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

En la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se han identificado varias enzimas, una de ellas es la glucosa-1-oxidasa cuya actividad aparece sólo en cultivos ligninolíticos. También se ha demostrado la presencia de una enzima glioxal-oxidasa (Glox), que tiene como sustratos al metilglioxal, glioxal y otros compuestos dicarbonílicos (Kirk, 1988). La Glox es una glicoproteína de aproximadamente 68 kDa (Kurek y Kersten, 1995), al igual que LiP y MnP su producción es afectada por la concentración de carbono o nitrógeno y se ha encontrado una relación estrecha entre la transcripción de Glox y LiP (Kelley y Reddy, 1986), sugiriendo que la actividad de la Glox es importante para el desarrollo de la actividad ligninolítica.

#### **1.4.5. Aspectos fisiológicos de la actividad ligninolítica**

Se ha demostrado que el sistema enzimático se sintetiza en ausencia de lignina cuando el hongo crece en forma miceliar asociada a un cultivo no agitado, al agotarse la fuente de nitrógeno, carbono o azufre, ocurre la transición al metabolismo secundario con la subsecuente producción de metabolitos secundarios y del sistema ligninolítico (Kirk y col., 1978). Condiciones ambientales tales como presión parcial de oxígeno, agitación, edad del cultivo y composición del medio afectan el nivel de actividad (Faison y Kirk, 1985; Dosoretz y col., 1990c). No existe evidencia de la inducción de las enzimas por la lignina.

En cultivo líquido la acumulación de RNAm de LiP y MnP depende de la limitación de nitrógeno o carbono y en el caso del RNAm de MnP la acumulación se incrementa en respuesta a la concentración de manganeso y de “shock” térmico. Se ha demostrado que la expresión de genes de LiP y MnP inicia simultáneamente en el área central de colonias de tres días de cultivo (Moukha y col., 1993).

Un metabolito secundario de especial interés en la actividad ligninolítica es el alcohol veratrílico, que se sintetiza a la par de la LiP, que puede funcionar protegiendo a la LiP de la desactivación por  $H_2O_2$  además de participar en la oxidación de moléculas que son inaccesibles a la enzima. El alcohol veratrílico es sintetizado a partir de la fenilalanina que es transformada a ácido cinámico el cual es escindido a benzoato, benzaldehído o a algún compuesto relacionado, que puede servir como sustrato para la hidroxilación y metilación con la formación de alcohol veratrílico (Jensen y col., 1994).

Al incrementarse la concentración de alcohol veratrílico en el medio se observa un aumento de la actividad LiP, sin embargo, puede tratarse de un efecto de inducción parcial ya que la actividad MnP no se afecta por la adición de alcohol veratrílico (Cancel y col., 1993).

Los elementos traza son importantes en la composición del sistema ligninolítico, en ausencia de Mn(II) predominan las isoenzimas de LiP mientras que en presencia de 11.5 ppm de Mn(II) son dominantes las isoenzimas de MnP (Bonnarme y Jeffries, 1990). El magnesio influye fuertemente en el crecimiento y la degradación de la lignina, como nivel óptimo se ha determinado 0.044 g/l adicionado como  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  (Jeffries y col., 1981).

En cultivos ligninolíticos de *P. chrysosporium* se ha encontrado una correlación entre el caída de la actividad LiP y el aumento en la actividad proteolítica durante la última fase del metabolismo secundario, (Dosoretz y col., 1990a). Durante la fase de crecimiento también se ha detectado actividad proteolítica que podría estar involucrada en la formación de aglomerados ó “pellets” o en el crecimiento del micelio en la FmL (Dosoretz y col. 1990b).

## 2. OBJETIVOS

A partir de la información bibliográfica consultada, es claro que las propuestas de aplicación de *P. chrysosporium* en la degradación de compuestos xenobióticos han sido orientadas a la producción de extractos enzimáticos por cultivo en FmL, a pesar de los diversos problemas asociados al crecimiento del microorganismo y al manejo de los reactores. Así, como una alternativa, que también ha sido propuesta por otros investigadores, se decidió utilizar la FMS para la degradación de colorantes como modelo experimental.

Se eligieron colorantes de tipo azo (Rojo 40, Amarillo ácido 9 y Tropaeolin O) porque son ampliamente usados en la industria sea textil, alimentaria o de cosméticos; se incluyó uno de tipo trifenilmetano que es de uso común en la producción de cosméticos, pues se pretende dar una alternativa para la eliminación de estos compuestos.

Debido a la poca información sobre el crecimiento de *P. chrysosporium* en FMS el trabajo se inició con estudios en cultivo superficial (CS) para establecer las bases para el cultivo en FMS.

Como objetivos particulares para el CS se plantearon:

- ◆ Conocer la estabilidad de los colorantes seleccionados como modelo de estudio a luz, temperatura y pH
- ◆ Caracterizar el crecimiento de *P. chrysosporium* y la capacidad de decoloración con colorantes azo y trifenilmetano.
- ◆ Determinar el efecto de la relación carbono-nitrógeno sobre la decoloración por *P. chrysosporium*.
- ◆ Determinar si los colorantes son incorporados a la biomasa como fuente de carbono y/o nitrógeno

Para la FMS se establecieron los siguientes objetivos particulares:

- ◆ Determinar las condiciones de reacción para los ensayos de actividad enzimática LiP y MnP de los extractos producidos.
- ◆ Conocer la estabilidad de la actividad enzimática de los extractos crudos.

- ◆ Probar el efecto de la relación carbono-nitrógeno y de la tasa de aireación sobre la producción de actividad LiP y MnP
- ◆ Probar la decoloración que ocurre con extractos enzimáticos bajo las condiciones de reacción definidas para cada actividad enzimática.
- ◆ Determinar la capacidad de decoloración de *P. chrysosporium* con colorantes azo y trifenilmetano en FMS.

### 3. HIPÓTESIS

Como hipótesis fundamental de este trabajo se planteó que si *P. chrysosporium* era capaz de crecer y decolorar compuestos azo y trifenilmetano en CS, podría ser factible esperar una respuesta similar para la FMS, debido a las similitudes fisiológicas que se han observado entre esos cultivos con otros hongos filamentosos.

En lo que respecta al CS se plantearon las siguientes hipótesis:

H1: Los colorantes son fuente de carbono y/o nitrógeno para el crecimiento de *P. chrysosporium*.

H2: La adsorción de colorante en el micelio no implica que el colorante se incorpore a la biomasa en forma de fuente de carbono y/o nitrógeno.

H3: La decoloración es debida a la actividad enzimática ligninolítica de *P. chrysosporium*.

Para los estudios en FMS se plantearon las siguientes hipótesis:

H4: la actividad de decoloración puede mejorarse en la FMS, ya que se pueden producir enzimas con diferentes propiedades cinéticas a las que se obtienen por FMS.

H5: El nivel de actividad LiP y MnP puede mejorarse por efecto de la tasa de aireación y limitación de carbono o nitrógeno.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Reactivos

Para la preparación de los medios de cultivo se emplearon los siguientes reactivos de grado analítico:

Baker Analyzed:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{CoSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Glucosa, ácido acético y acetato de sodio.

Merck:  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4$

Productos Químicos Monterrey:  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2$

Técnica Química:  $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Química Dinámica:  $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Bioxon: Agar bacteriológico y Papa Dextrosa Agar

Aldrich: Alcohol veratrílico y veratraldehído

Sigma: Guayacol

Los colorantes de grado analítico de marca Sigma que se utilizaron fueron:

Amarillo ácido 9, Colour Index (C.I.) 13015, (sal monosódica del ácido 4-amino-1-1'azobenceno-3,4' disulfónico)

Tropaeolin O, C.I. 14270, (sal monosódica del ácido 4-[(2,4-dihidroxifenil)azo] bencensulfónico)

Azul 1, C.I. 42090, (sal disódica de 4-[4-(N-etil-p-sulfobencilamino)-fenil]-(2 sulfoniofenil)-metileno]-[1-(N-etil-N-p-sulfobencil)- $\Delta^{2,5}$ -ciclohexadienimina]). Se usó un colorante de grado industrial, el Rojo 40, C.I. 16035, (sal disódica del ácido 6-hidróxi-5-[(2-metoxi-5-metil-4-sulfofenil)azo]-2-naftalensulfónico), comercializado por Aceites y Esencias, S.A.

### 4.2. Medio de cultivo

Para el cultivo superficial se empleó el medio de Kirk (Kirk y col., 1978) modificado. La composición del medio (en g/l) fue:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0.05;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2;  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.05;  $\text{CaCl}_2$ , 0.01; glucosa, 10; 1 ml de solución mineral y 0.25 ml de una solución de vitaminas. El pH del medio fue 4.5. La composición de la solución mineral (en g/l):  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 3;  $\text{NaCl}$ , 1;  $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1;  $\text{CaCl}_2$ , 0.1;  $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1;  $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.01;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.01 y  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.01. La composición de la solución de vitaminas (en mg/l) fue la siguiente: Tiamina  $\cdot \text{HCl}$ , 20; Piridoxina  $\cdot \text{HCl}$ , 10 y Ciancobalamina, 0.5. La solución de vitaminas se esterilizó por filtración con

una membrana Millipore (0.22  $\mu\text{m}$ ) y fue adicionada al medio previamente esterilizado (120 psi durante 15 min),

El medio de cultivo para la FMS es una modificación del descrito anteriormente (Kirk y col., 1978), la composición (en g/l) fue: de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0.05;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.15;  $\text{CaCl}_2$ , 0.15; glucosa, 10; solución mineral 3 ml y 0.75 ml de la solución de vitaminas citada anteriormente. En condiciones limitadas de carbono se adicionaron 5g/l glucosa y 0.2g/l de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . La solución de vitaminas fue esterilizada por filtración con una membrana Millipore (0.22  $\mu\text{m}$ ) y adicionada al medio estéril frío.

### **4.3. Microorganismos**

Se emplearon dos cepas del hongo ligninolítico *Phanerochaete chrysosporium*, la cepa H-298 (CDBB) adquirida en la Colección de Cultivos Microbianos del CINVESTAV-IPN y *P. chrysosporium* A-594 proveniente del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Alcalá de Henares, España.

#### **4.3.1. Conservación de las cepas**

Para garantizar la pureza de las cepas se hicieron tres resiembras por estría en un medio de Papa Dextrosa y Agar (PDA) incubado a 35°C por tres días, al final de esta serie de resiembras se seleccionó una colonia a partir de la cual se produjo una suspensión de esporas que se conservó en congelación a -20°C en viales con glicerol al 10% (Smith, 1974).

#### **4.3.2. Producción del inóculo**

Durante todo el desarrollo experimental el inóculo se produjo a partir de una suspensión de esporas propagando en tubos inclinados con PDA incubados durante cinco días a 35°C y conservados en refrigeración hasta por seis semanas. De estos tubos se obtuvo una suspensión de esporas con una solución de Tween 80 al 0.1% (v/v) para inocular con 0.1 ml en matraces con 30 ml de PDA que se incubaron durante cinco días a 35°C.

Las esporas se cosecharon con 30 ml de solución de Tween 80 al 0.1% (v/v) y el conteo se realizó en cámara de Neubauer a una dilución adecuada para contar entre 25 y 50 esporas por cuadro.

#### **4.4. Condiciones de cultivo**

##### **4.4.1. Cultivo superficial**

El microorganismo se desarrollo en cajas de Petri desechables (10 x 100 mm) con 25 ml de medio Kirk, descrito en la sección 4.2., los colorantes se adicionaron al medio antes de esterilizar. Previamente se comprobó que las espectros de absorción de los colorantes no se modifican por efecto de la esterilización, comparando los espectros de absorción obtenidos antes y después de esterilizar las soluciones de colorante.

Cada placa de medio de cultivo fue inoculada por espatulado con 0.1 ml de una suspensión con  $10^6$  a  $10^7$  esporas/ml y los cultivos fueron incubados a 35°C durante 8 días. Para verificar que no ocurría decoloración abiótica se corrió como control una placa sin inóculo incubada en las mismas condiciones

##### **4.4.2. Fermentación en medio sólido**

Para la FMS se utilizó la metodología desarrollada para el cultivo de hongos filamentosos (Raimbault y Alazard, 1980). Como soporte se empleó bagazo de caña impregnado con el medio de cultivo. Para eliminar azúcares solubles y materiales indeseables el bagazo de caña se tamizó entre malla 8 y 35, se lavó con agua a 65°C y se secó a temperatura ambiente.

Para tener un buen control del pH del medio, se adicionó una solución amortiguadora de ácido acético-acetato de sodio 0.1M (pH 4.5), que ha sido utilizada en cultivo superficial sin que afecte negativamente la actividad enzimática ligninolítica (Austin y col., 1991).

El soporte y medio de cultivo se esterilizaron en autoclave a 120°C durante 15 minutos y las columnas se empacaron en condiciones asépticas a una densidad de 0.25 g/cm<sup>3</sup>, inoculando, en todos los casos, con  $2 \times 10^7$  esporas por gramo de bagazo seco.

##### **4.4.2.1. Producción de extractos enzimáticos**

La producción de extractos enzimáticos por FMS se realizó en columnas de vidrio (3.6 x 25 cm) empacadas con 30 g de bagazo impregnado con el medio de cultivo, por la entrada inferior de la columna (Figura 4.1) se alimentó aire húmedo con un flujo de 10.66, 5.33 o 2.66 ml de aire /g de materia seca por minuto (vgm) y fueron incubadas en un baño de agua con temperatura controlada a 35°C.

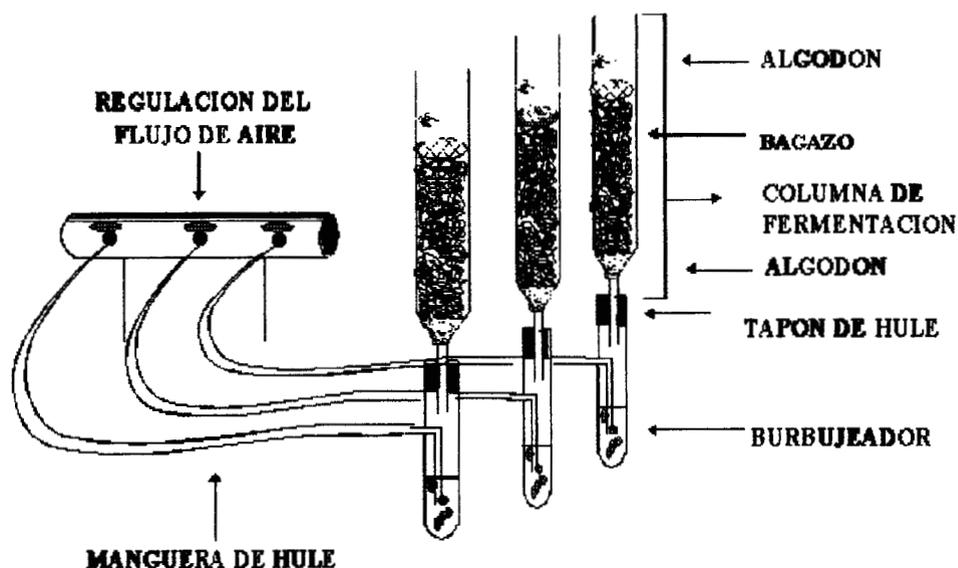


Figura. 4.1. Representación esquemática del sistema para Fermentación en medio sólido.

#### 4.4.2.2. Cinéticas de decoloración

Las cinéticas de decoloración en FMS se corrieron en columnas de vidrio (2.5 x 15 cm) empacadas con 15 g de bagazo impregnado con el medio de cultivo, los colorantes fueron adicionados al medio de cultivo antes de mezclar con el bagazo. Las columnas se incubaron en baño de agua con temperatura controlada a 35°C, alimentando aire húmedo con un flujo de 10.66 vgm. Las columnas control se esterilizaron a 120°C durante 20 minutos y fueron incubadas bajo las mismas condiciones.

### 4.5. Técnicas analíticas

#### 4.5.1. Cultivo superficial

##### 4.5.1.1. Determinación de biomasa

La placa de Agar se fundió en 150 ml de agua destilada en un horno de microondas (Kelvinator) calentando, al 100% de potencia, durante dos minutos, el medio fundido se filtró a vacío con papel Wathman No. 41 y la biomasa se lavó con 200 ml de agua destilada a 70°C. La biomasa se secó a 65°C durante 12 horas y el filtrado se utilizó para cuantificar el colorante residual. Previamente se

comprobó que el espectro de absorción de los colorantes no cambia después de someter una solución a ebullición durante dos minutos en el horno de microondas.

#### **4.5.1.2. Determinación de colorante residual**

El filtrado se aforó a 500 ml con agua destilada y se tomó una alícuota de 5 ml para cuantificar los colorantes por espectrofotometría, con un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A, en la longitud de onda de máxima absorción previamente determinada: para el Amarillo ácido 9, 385 nm; Tropaeolin O, 430 nm; Rojo 40, 497 nm y Azul 1, 630 nm. La decoloración se reportó como la disminución de absorbancia con respecto al testigo o como colorante residual estimado con una curva estándar. Sólo en el caso del Tropaeolin O al filtrado se adicionó 1 ml de solución 0.1 N de NaOH, antes de aforar a 500 ml, para tener un pH cercano a 9.

#### **4.5.2. Fermentación en medio sólido**

##### **4.5.2.1. Tratamiento de muestras**

El contenido de la columna se mezcló con agua destilada en una proporción 1:1 (p/p) y se prensó a 1500 psi en una prensa hidráulica. El extracto obtenido se centrifugó a 4500 rpm durante 10 minutos y se filtró a través de Papel Wathman No. 41.

##### **4.5.2.2. Determinación de pH**

El pH se midió con un electrodo de vidrio (Conductronic pH 20) en una suspensión de 1 g de muestra en 9 ml de agua destilada después de agitar durante 10 minutos.

##### **4.5.2.3. Determinación de humedad**

La humedad se determinó por gravimetría, secando 2 g de muestra a 65°C durante 12 horas.

##### **4.5.2.4. Ensayos enzimáticos**

Los ensayos de actividad peroxidasa fueron realizados siguiendo una modificación de los métodos previamente descritos, la mezcla de reacción para la lignina peroxidasa (Tien y Kirk, 1988) contenía 0.6 ml de una solución amortiguadora de ácido tartárico-tartrato de sodio 100 mM

(pH 3.5), 0.2 ml de solución 4 mM de alcohol veratrílico, 1.8 ml de extracto enzimático fresco y 0.2 ml de  $H_2O_2$  0.4 mM. La reacción se inició por adición del peróxido de hidrógeno y se incubó a temperatura ambiente durante 20 min. La absorbancia se leyó a 310 nm comparando contra un blanco en el que se sustituyó el alcohol veratrílico por agua. Una unidad de actividad se definió como los micromoles de veratraldehído formados por minuto en las condiciones de reacción indicadas y la actividad se reportó por gramo de materia seca (U/g m.s).

La mezcla de reacción para la manganoso peroxidasa (Gold y Glenn, 1988) contenía 0.5 ml de una solución amortiguadora de ácido tartárico-tartrato de sodio 100 mM (pH 4.5), 0.5 ml de solución 100  $\mu$ M de  $MnSO_4$ , 0.5 ml de solución 1 mM de guayacol, 1 ml de extracto enzimático fresco y 0.2 ml de  $H_2O_2$  1 mM. La reacción se inició por adición del peróxido de hidrógeno y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min, la absorbancia se leyó a 465 nm contra un blanco en el que se sustituyó el guayacol por agua destilada. Una unidad de actividad se definió como el cambio en una unidad de absorbancia por minuto y se reportó por gramo de materia seca (U/g m.s).

Las soluciones de guayacol, alcohol veratrílico y peróxido de hidrógeno se prepararon al momento de utilizarse y rutinariamente el peróxido de hidrógeno fue valorado con  $KMnO_4$  0.1N - siguiendo el procedimiento descrito en la sección 2.5.3.

#### **4.5.2.5. Ensayos de decoloración con extractos enzimáticos**

La decoloración con los extractos crudos producidos por FMS se efectuó en las mezclas de reacción descritas en la sección anterior, las soluciones de alcohol veratrílico y guayacol se sustituyeron por soluciones 0.1 mM de colorantes. La reacción se inició por adición de peróxido de hidrógeno y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min, la decoloración se determinó en la longitud de onda de máxima absorción comparando contra la absorbancia del control. Para el control, el extracto enzimático se calentó durante 2 min en horno de microondas (Kelvinator) al 100% de potencia.

#### **4.5.2.6. Determinación de colorante residual**

Al término de la FMS las muestras se trataron como se indicó en la sección 4.5.2.1. y el extracto obtenido se diluyó con agua destilada para leer la absorbancia en la longitud de onda de máxima

absorción, el colorante se cuantificó por medio de una curva estándar. La decoloración se reportó como miligramos de colorante residual por gramo de materia seca (mg/g m.s).

#### **4.5.3. Valoración del peróxido de hidrógeno**

El reactivo de peróxido de hidrógeno fue valorado semanalmente con solución de permanganato de potasio valorada con oxalato de sodio (Kolthff y Sandell, 1969) como a continuación se describe:

La solución de  $\text{KMnO}_4$  0.1 N recién preparada se calentó a ebullición durante 1 hora, se dejó reposar por 12 horas y se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado.

La solución se valoró con una mezcla 0.2g de oxalato de sodio disueltos en 60 ml de agua y 15 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  diluido (1:8 v/v). El punto final de la titulación fue indicado por la aparición de un color rosa permanente, en ese punto la temperatura era de aproximadamente 60°C.

Una vez valorada la solución de  $\text{KMnO}_4$  se preparó una solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  que contenía 2 ml del reactivo aforados a 250 ml con agua destilada. Se tomaron 10 ml de la solución para mezclarse con 10 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  diluido (1:5 v/v), se tituló con la solución de  $\text{KMnO}_4$  hasta un vire a rosa permanente.

#### **4.5.4. Curva estándar de veratraldehído**

En la reacción enzimática del extracto crudo con actividad lignina peroxidasa el veratraldehído formado se estimó con una curva estándar. Se preparó una solución de 105  $\mu\text{mol/l}$  de veratraldehído en agua destilada y se hizo una serie de diluciones entre 0 y 105  $\mu\text{mol}$  para leer la absorbancia a 310 nm.

#### **4.5.5. Curvas estándar de colorante**

Las soluciones estándar se prepararon en agua destilada, por litro de solución se adicionaron 20 mg de Amarillo ácido 9, 25 mg de Rojo 40 o 10 mg de Azul 1. A partir de estas soluciones se hicieron diluciones con agua destilada para tener concentraciones entre cero y el valor indicado

arriba. La absorbancia se determinó en la longitud de onda de máxima absorción. Para el Tropaeolin O la solución estándar se preparó con 40 mg en solución amortiguadora de carbonato 0.1 M (pH 9), las diluciones se hicieron con la misma solución amortiguadora para tener concentraciones entre 1 y 20 mg/l de colorante.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 5. ESTABILIDAD DE LOS COLORANTES A FACTORES ABIÓTICOS

En general los colorantes son altamente estables a la oxidación, pero por efecto de pH, luz o temperatura pueden experimentar ciertos cambios en el grupo cromóforo con la consecuente pérdida de color o cambio en la coloración. Con el fin de conocer la estabilidad de los colorantes seleccionados como modelo de estudio, se hizo una serie de pruebas del efecto de pH, luz y componentes del medio de cultivo sobre el espectro de absorción de los colorantes considerando que estos eran los factores abióticos de mayor importancia ya que podrían causar estimaciones equivocadas en los estudios posteriores.

En el presente capítulo se presentan algunas características físico-químicas de los colorantes (*Colour Index*, 1971), que son de particular interés para este trabajo. En la segunda parte se presentan los resultados de estabilidad de los colorantes a los factores anteriormente citados.

### 5.1. Características físico-químicas de los colorantes

#### *Amarillo ácido 9*

Peso molecular: 379.3

Fórmula condensada:  $C_{12}H_{10}N_3O_6S_2Na_2$

Solubilidad: Soluble en agua y ligeramente soluble en etanol.

Características: Colorante ácido de tipo azo; en solución ácida presenta una coloración rojo-naranja que cambia a amarillo-verdoso en solución básica. Es usado comúnmente en alimentos.

#### *Tropaeolin O*

Peso molecular: 316.3

Fórmula condensada:  $C_{12}H_9N_2O_5SNa$

Solubilidad: Soluble en agua, etanol y acetona, pero insoluble en otros solventes orgánicos.

Características: Colorante ácido de tipo azo de uso común en la industria textil.

*Rojo 40*

222250

Peso molecular: 446.4

Fórmula condensada:  $C_{18}H_{14}N_2O_8S_2Na_2$

Solubilidad: Muy soluble en agua, poco soluble en glicerina y propilen glicol; y ligeramente soluble en etanol.

Características: Colorante ácido de tipo azo. Usado comúnmente en la industria de cosméticos, alimentos y farmacéutica.

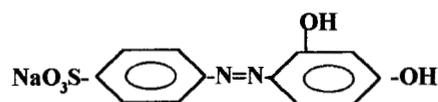
*Azul 1.*

Peso molecular: 792.85

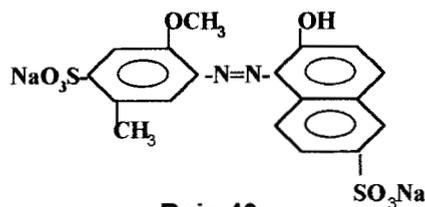
Fórmula condensada:  $C_{37}H_{34}N_2O_9S_3Na_2$

Solubilidad: Muy soluble en agua, glicerina y propilen glicol; pero ligeramente soluble en etanol.

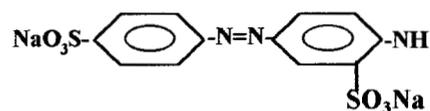
Características: Colorante de tipo trifenilmetano. Usado comúnmente en la industria de cosméticos (excluyendo los que se aplican en los ojos), alimentos y farmacéutica. Se considera potencialmente tóxico (Sax y Lewis, 1989).



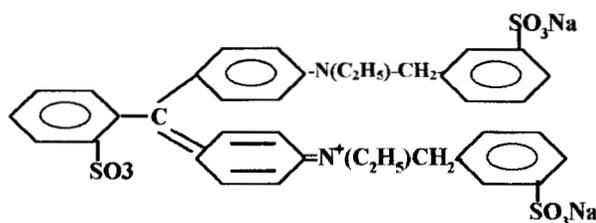
**Tropaeolin O**



**Rojo 40**



**Amarillo ácido 9**



**Azul 1**

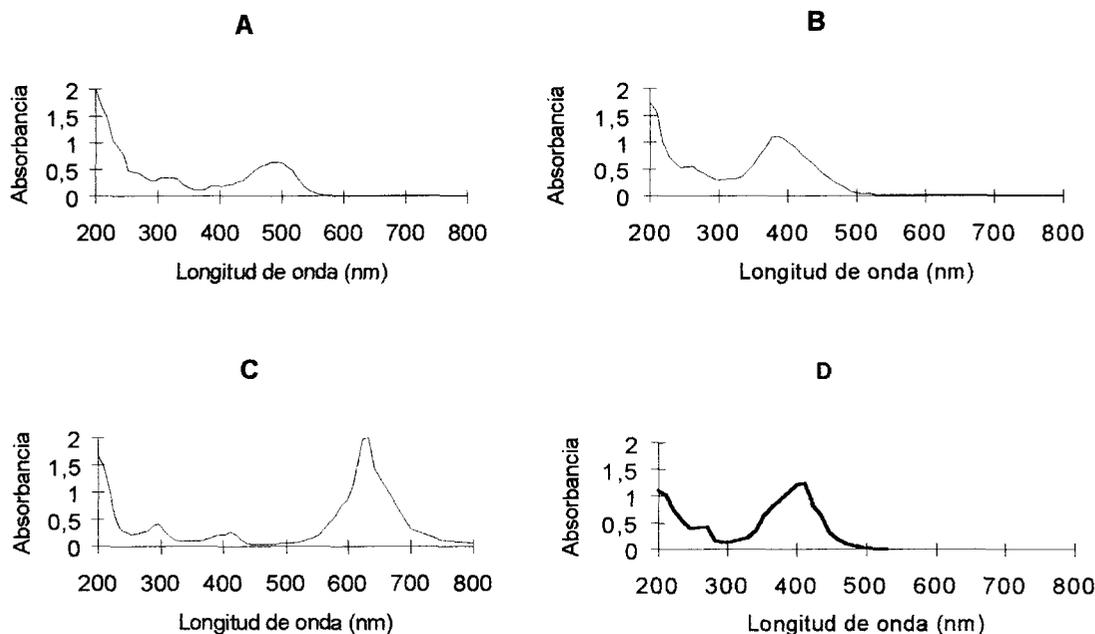
Figura 5.1. Estructura de los colorantes empleados en el estudio.

## 5.2. Determinación de la longitud de onda de máxima absorción de los colorantes

Una de las técnicas más usadas para la cuantificación de los colorantes es la espectrofotometría en una longitud de onda. Para determinar la longitud de onda de máxima absorción se obtuvo un espectro de absorción de soluciones de 20 mg/l de colorante en agua.

En la Figura 5.2. se muestran los espectros de absorción UV-visible de los colorantes, como se observa todos muestran picos en la región ultravioleta y en la visible, pero es mayor la absorbancia en esta última. Los picos de máxima absorción fueron: Amarillo ácido 9; 385 nm; Tropaeolin O, 430 nm; Rojo 40, 497 nm y Azul 1, 630 nm.

La longitud de onda a la cual la absorbancia fue máxima fue en la que se siguieron los cambios ocurridos durante la decoloración en los estudios posteriores.



**Figura 5.2. Espectros de absorción UV-visible de los colorantes Rojo 40 (A), Amarillo ácido 9 (B), Azul 1 (C) y Tropaeolin O (D).**

## 5.3. Estabilidad de los colorantes

Con el fin de conocer la estabilidad de los colorantes y asegurar que los cambios no eran debido a factores abióticos los colorantes se mantuvieron en condiciones ambientales de luz y temperatura

a diferentes valores de pH, posteriormente se estudió el efecto de los componentes del medio de cultivo sobre la estabilidad.

### 5.3.1. Efecto de temperatura y luz ambiental

Para descartar la posibilidad de que la decoloración fuera ocasionada por factores abióticos se probó el efecto de la temperatura y luz ambiental (tanto artificial como natural) sobre la estabilidad de los colorantes, se incluyeron tres valores de pH de acuerdo a los cambios observados durante fermentaciones preliminares.

Se prepararon soluciones de colorante de 20 mg/l en solución amortiguadora de citratos 0.1 M. (pH 4.5, 5.5 y 6.5) y se conservaron a luz y temperatura ambiental durante 5 días en tubos sellados con una película de parafilm. Las absorbancias inicial y final fueron determinadas en la longitud de onda de máxima absorción.

En la Tabla 5.1 se presentan las absorbancias de las soluciones de cada colorante a pH 4.5, 5.5 y 6.5 al tiempo inicial y final. Para los cuatro colorantes se observó que a un valor de pH dado los cambios de absorbancia no fueron superiores a 0.1 unidades después de conservar las soluciones durante 120 h a temperatura y luz ambiental. En el caso del Tropaeolin O la absorbancia fue modificada por efecto del pH, cambio que no se presentó o fue mínimo con los otros colorantes.

**Tabla 5.1. Estabilidad de las soluciones de colorantes a temperatura y luz ambiente en diferentes valores de pH**

Colorante	pH 4.5		pH 5.5		pH 6.5	
	Absorbancia		Absorbancia		Absorbancia	
	Inicial	a las 120 h	Inicial	a las 120 h	Inicial	a las 120 h
Amarillo ácido 9	1.23	1.25	1.31	1.31	0.97	0.96
Tropaeolin O0	0.746	0.746	0.57	0.59	0.93	0.93
Rojo 40	0.79	0.73	0.72	0.74	0.73	0.72
Azul 1	1.32	1.40	1.38	1.46	1.31	1.37

Los resultados obtenidos demostraron que los colorantes fueron estables bajo las condiciones estudiadas, pero los cambios observados en la absorbancia del Tropaeolin O sugirieron que el pH

ocasionó alguna alteración en el espectro de absorción, debido a esto se decidió estudiar el efecto del pH sobre el espectro de absorción de los colorantes.

### 5.3.2. Efecto del pH

Para asegurar que la decoloración no fuera función del cambio de pH del medio de cultivo, se estudió el efecto de este parámetro sobre el espectro de absorción en un intervalo de 4.5 a 10. Las soluciones de colorantes se prepararon en solución amortiguadora de carbonatos o citratos 0.1 M del pH correspondiente y se hizo un barrido entre 200 y 800 nm.

En la Figura 5.3 se muestran los cambios de la longitud de onda de máxima absorción ( $\lambda_{max}$ ), se observa que la  $\lambda_{max}$  del Rojo 40, Amarillo ácido 9 y Azul 1 no fue afectada por el pH en el intervalo estudiado. En el caso del Tropaeolin O se observó un efecto, entre 4.5 y 7 la  $\lambda_{max}$  se incrementó directamente al aumentar el pH y a partir de este punto la variación fue mínima.

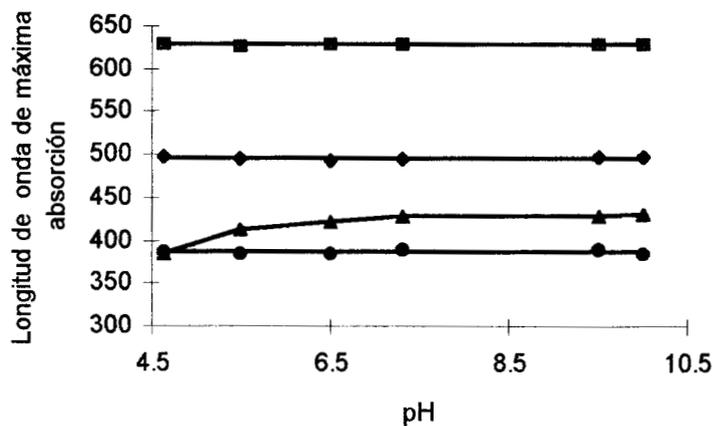


Figura 5.3. Efecto del pH sobre la absorción de los colorantes : Amarillo ácido 9 (●), Tropaeolin O (▲), Rojo 40 (◆) y Azul 1(■).

Cripps y col. (1990) al estudiar el efecto del pH sobre la absorción encontraron que el espectro del Tropaeolin O no era afectado por el pH en el intervalo de 3.5 a 5, pero la solución de colorante se preparó en solución amortiguadora de dimetilsuccinato. Los cambios observados en este trabajo quizá sean también por efecto de la solución amortiguadora usada y además el intervalo fue más amplio.

Se comprobó que los cambios en la absorbancia del Tropaeolin O por efecto del pH fueron reversibles (datos no mostrados), es decir, si el pH de una solución de colorante se modifica por adición de un ácido o una base la absorbancia leída en cada caso es proporcional a la dilución.

Si la adición de ácido o base causó un cambio en la absorbancia del Tropaeolin O probablemente otros compuestos, incluidos en el medio de cultivo, también podrían haber modificado el grupo cromóforo de los colorantes, por lo que se decidió estudiar el efecto de los componentes del medio de cultivo sobre la  $\lambda_{max}$ .

### 5.3.3. Efecto del medio de cultivo

Con el fin de determinar si los componentes del medio de cultivo modificaban el espectro de absorción de los colorantes o podrían de alguna forma causar una decoloración, se realizaron espectros de absorción con soluciones de colorante preparadas en medio fresco y con muestras obtenidas después de tres días de incubación en presencia de *P. chrysosporium*.

Como se muestra en la Tabla 5.2 las absorbancias leídas en la  $\lambda_{max}$  de soluciones de medio fresco y soluciones acuosas fueron similares, cabe aclarar que no hubo ningún desplazamiento en la  $\lambda_{max}$ . En el caso del Troapeolin O, sin realizar el ajuste de pH indicado en la sección 2.45., sí se observó una disminución en la absorbancia, que puede adjudicarse al efecto del pH sobre la  $\lambda_{max}$  (según se demostró anteriormente) y no a los componentes del medio de cultivo.

**Tabla 3.2 Efecto de los componentes del medio de cultivo sobre la absorbancia y la  $\lambda_{max}$ .**

Colorante	Medio fresco		Solución acuosa	
	Abs	$\lambda_{max}$	Abs	$\lambda_{max}$
Amarillo ácido 9	1.31	385	1.27	386
Rojo 40	0.89	499	0.83	495
Tropaeolin O	0.88	386	1.24	426
Azul 1	0.99	629	0.99	629

## 6. SELECCIÓN DE LA CEPA DE *Phanerochaete chrysosporium*

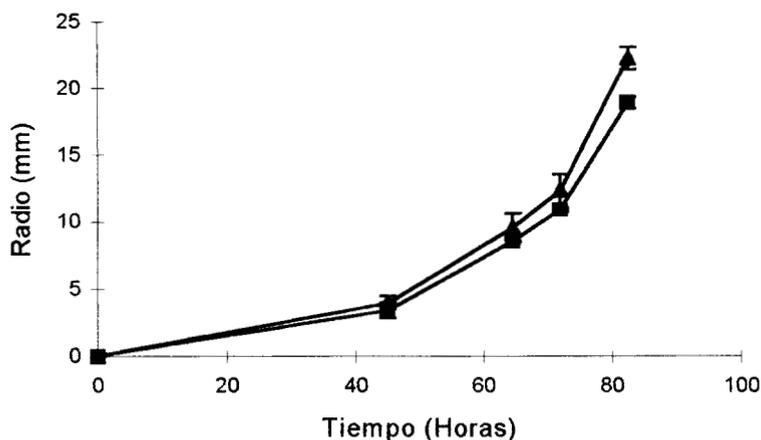
Para este estudio se disponía de dos cepas de *P. chrysosporium* (H 298 y A594) que podrían poseer diferente nivel de actividad ligninolítica. Para seleccionar una se consideraron dos criterios, que fueron un buen crecimiento en cultivo superficial (CS) en caja de Petri y una alta capacidad de decoloración, esta última variable es la de mayor importancia para los estudios siguientes, ya que se planteó como hipótesis que si la cepa era capaz de decolorar en CS también lo sería en la FMS.

El crecimiento se evaluó por medio de la velocidad radial (extensión radial de una colonia fúngica) y la biomasa final (determinada como peso seco), estos estudios permitieron establecer los requerimientos nutricionales y conocer el efecto de los colorantes sobre el crecimiento.

### 6.1. Caracterización del crecimiento en cultivo superficial

Para evaluar el crecimiento en CS se seleccionó la velocidad radial de crecimiento como variable de respuesta, parámetro que ha sido utilizado para determinar el efecto de las condiciones de cultivo sobre el crecimiento de hongos filamentosos (Inch y Trinci, 1987). Las dos cepas A-594 y H-298 se desarrollaron en el medio limitado en nitrógeno descrito en Materiales y Métodos (Sección 4.2); para determinar los requerimientos nutricionales de ambas cepas la solución de vitaminas se sustituyó por extracto de levadura (0.5 g/l) y se corrió como control un medio en el que se eliminó el extracto de levadura. Los cultivos se inocularon por piquete con una suspensión de  $10^7$  esporas/ml y se incubó a 35°C durante 4 días midiendo el radio de las colonias a diferentes tiempos.

En la Figura 6.1 se muestra el aumento del radio de las colonias de *P. chrysosporium*, A-594 y H-298, en función del tiempo, cada resultado representa la media de cuatro datos. Ambas cepas muestran el mismo perfil: un crecimiento relativamente lento hasta antes de las 50 h seguido por un crecimiento rápido de velocidad constante. La velocidad radial ( $V_r$ ) se estimó como la pendiente de la curva entre las 54 y 80 h, para ambas cepas se obtuvieron valores muy similares, de 0.39 mm/h para la cepa H-298 y de 0.33 mm/h para la cepa A-594.



**Figura 6.1** Velocidad de crecimiento radial de *P. chrysosporium* (■) H-298 y (▲) A-549 en medio limitado en nitrógeno adicionado con 0.5g/l de extracto de levadura.

La fase de adaptación observada en ambas cepas fue muy larga, de cerca de 50 h, que es muy alta comparada con la de hongos de rápido crecimiento que es de aproximadamente 10 h (Smith y Berry, 1975).

En el medio sin extracto de levadura el crecimiento de ambas cepas fue apenas visible, debido probablemente a los requerimientos complejos de este microorganismo, esto sugirió la importancia de incluir en el medio una fuente compleja de nutrientes y el extracto de levadura fue sustituido por una solución definida de vitaminas (véase Materiales y Métodos, sección 4.2), debido a que el extracto de levadura puede también ser utilizado como fuente de carbono y nitrógeno y por tanto podría introducir errores en los experimentos posteriores.

Se comprobó que ambas cepas tienen un crecimiento muy similar (estimado por la  $V_r$ ) en CS y que los requerimientos nutricionales son también muy similares, de aquí que para seleccionar la cepa más adecuada la capacidad de decoloración fue el criterio más importante.

## 6.2. Caracterización de la capacidad de decoloración de las cepas

Para la selección de la cepa se eligió su capacidad de decoloración como variable de respuesta. En esta parte del trabajo se probaron dos colorantes azo en medio limitado en nitrógeno,

adicionado de fenilalanina, nutriente que se ha utilizado (Paszczynski y col., 1991) para acelerar el crecimiento sin inhibir la degradación de los colorantes, además de que es el primer precursor de la ruta biosintética del alcohol veratrilico (Jensen y col., 1994). Se utilizó el medio descrito en Materiales y Métodos (Sección 4.2) adicionado de 350 mg/l de Amarillo ácido 9 y Tropaeolin O. Los cultivos se desarrollaron por duplicado y se incubaron durante 8 días para la cuantificación de la biomasa y colorante residual. Los análisis estadísticos correspondientes se muestran en el anexo.

En la Figura 6.2 se muestra la biomasa obtenida a los 8 días de incubación, se observó que la fenilalanina no tuvo un efecto definido sobre su producción. En los medios control la fenilalanina no afectó la producción de biomasa de la cepa H 298, pero si con la cepa A 594 ( $\alpha = 0.01$ ).

En los medios con colorante la respuesta fue diferente para cada uno, con Tropaeolin O (para ambas cepas) no hubo efecto de la fenilalanina sobre el crecimiento. En el medio con Amarillo ácido 9 la fenilalanina no afectó la producción de biomasa de la cepa A 594, pero si la de la cepa H 298 ( $\alpha = 0.01$ ).

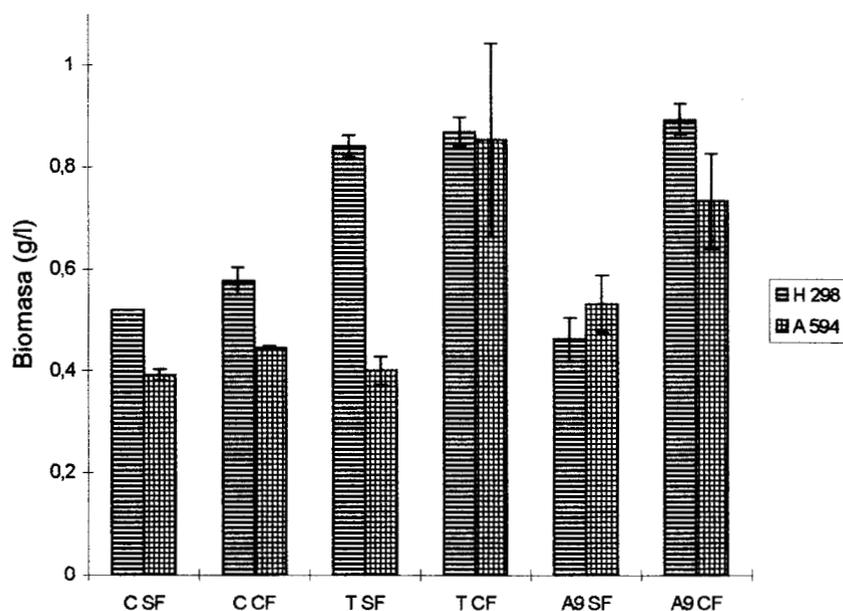
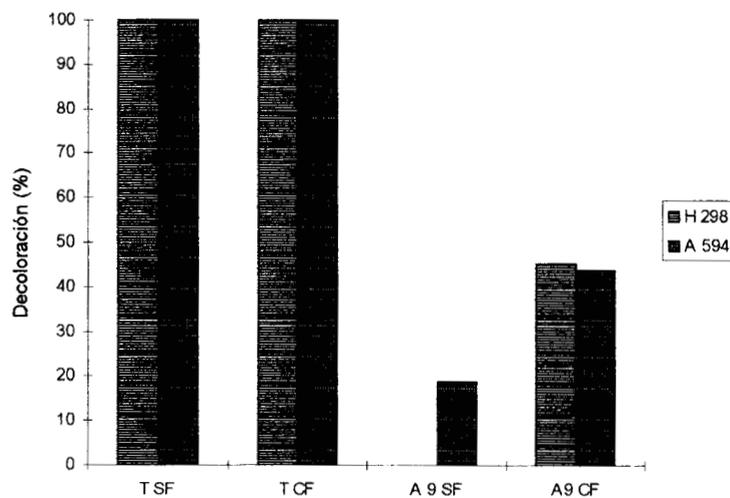


Figura 6.2. Biomasa final de *P. chrysosporium* a los 8 días de incubación en medio limitado en nitrógeno. Como control, medio sin fenilalanina y sin colorante (C SF) y con fenilalanina con colorante (C CF). Medio con Tropaeolin O sin fenilalanina (T SF), con fenilalanina (T CF); con Amarillo ácido 9 sin fenilalanina (A9 SF), con fenilalanina (A9 CF).

La decoloración final se muestra en la Figura 6.3, se observa que la respuesta fue diferente para cada colorante. El Tropaeolin O se decoloró en un 100 % con ambas cepas, independientemente de la presencia de fenilalanina. En el caso del Amarillo ácido 9 la decoloración fue mayor en el medio con fenilalanina, aproximadamente de 50 % con ambas cepas; en el medio sin fenilalanina no ocurrió eliminación de colorante con la cepa H-298 y con la cepa A-594 fue de un 25 %.

En los testigos (medio con colorante y sin inocular) incubados en las mismas condiciones no se observó decoloración por lo que ésta fue atribuida a la acción de *P. chrysosporium*.



**Figura 6.3. Decoloración en presencia de *P. chrysosporium* durante 8 días crecimiento en medio limitado en nitrógeno: Tropaeolin O sin fenilalanina (T SF), con fenilalanina (T CF); medio con Amarillo ácido 9 sin fenilalanina (A9 SF), con fenilalanina (A9 CF),**

Las diferencias observadas en la decoloración final del Tropaeolin O y Amarillo ácido 9 pueden ser explicadas en base a la estructura química de los colorantes, se ha comprobado que en los colorantes azo la presencia de sustituyentes hidroxilo en el anillo favorece la decoloración (Spadaro y col., 1992 y Pasti y col., 1992). El Tropaeolin O posee ese grupo en su estructura, en tanto que el Amarillo ácido 9 no lo presenta.

Si se compara la producción de biomasa y la decoloración se puede observar que aparentemente existe una correlación entre ambas con el Amarillo ácido 9, es decir, podría ser fuente de carbono y/o nitrógeno o bien inhibir ligeramente el crecimiento del microorganismo.

## **7. BIODECOLORACIÓN EN CULTIVO SUPERFICIAL**

Debido a que la cepa A 594 fue la que presentó mejor capacidad de decoloración con el Amarillo ácido 9 (que parece ser el colorante de más difícil degradación) se eligió para los estudios posteriores, en los que se probó la capacidad de decoloración con otros colorantes en condiciones limitadas de nitrógeno.

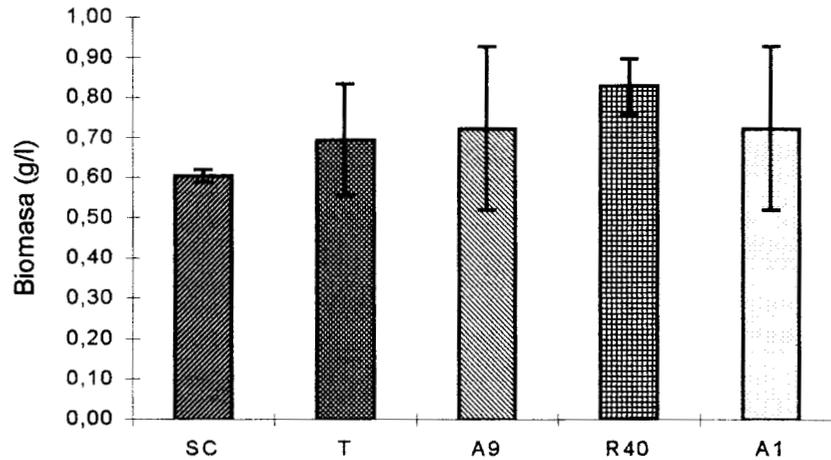
En los resultados mostrados en la sección anterior aparentemente se presentó una relación entre el nivel de decoloración y la biomasa producida, así para comprobar si eran utilizados como fuente de nitrógeno y/o carbono para el crecimiento se estudió el efecto de la relación carbono-nitrógeno (C/N). Se esperaba que esas condiciones además de favorecer la actividad enzimática de *P. chrysosporium* estimularan la asimilación de los colorantes.

### **7.1. Biodecoloración**

El objetivo de esta sección fue probar la capacidad de decoloración de la cepa A-594. El microorganismo se desarrolló en condiciones limitadas de nitrógeno, en el medio descrito en Materiales y Métodos (Sección 4.3), adicionado con 350 mg/l de Rojo 40, Tropaeolin O, Amarillo ácido 9 y Azul 1. Los experimentos se realizaron por duplicado y se incubó durante ocho días para determinación de biomasa y colorante residual; como testigo se corrió un medio sin colorante. Los resultados de los análisis se presentan en el anexo.

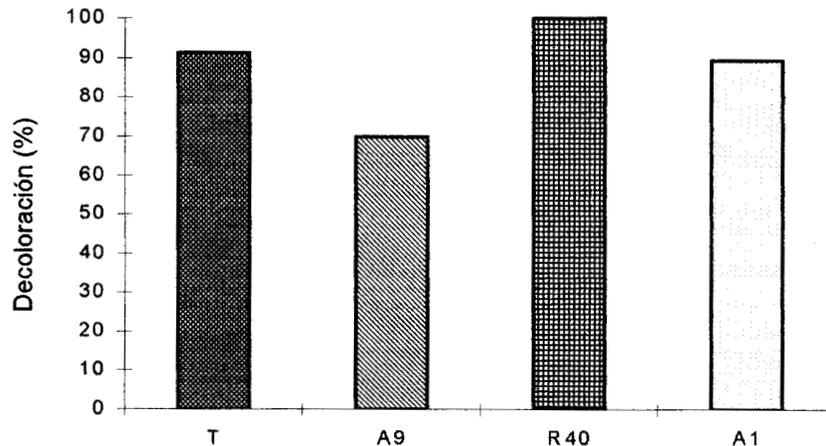
La producción de biomasa no fue afectada ( $\alpha = 0.01$ ) por la adición de colorantes, según se muestra en la Figura 7.1; esto también indica que los colorantes no tiene efecto inhibitorio sobre el crecimiento.

222250



**Figura 7.1. Biomasa final de *P. chrysosporium* A-594 en medio limitado en nitrógeno a los 8 días de incubación. Las leyendas corresponde al medio sin colorante (SC), adicionado de Tropaeolin O (T), Amarillo ácido 9 (A9), Rojo 40 (R40) o Azul 1 (A1).**

Los resultados de la decoloración se muestran en la Figura 7.1, en la que se observa que la cepa A-594 de *P. chrysosporium* fue capaz de decolorar los cuatro colorantes en condiciones limitadas de nitrógeno. Tal como se presentó en la sección anterior, el Amarillo ácido 9 fue decolorado en menor proporción que el Tropaeolin O, en un 69 y 90 % respectivamente. El Rojo 40 fue degradado casi en un 100 %. En todos los casos se observó adsorción de colorante en el micelio, que no fue cuantificado porque la cantidad de biomasa obtenida era muy pequeña y dificultaba el manejo de la muestra



**Figura 7.2. Decoloración en presencia de *P. chrysosporium* A-594 durante ocho días de incubación en medio limitado en nitrógeno. Las leyendas corresponde al medio adicionado con Tropaeolin O (T), Amarillo ácido 9 (A9), Rojo 40 (R40) o Azul 1 (A1).**

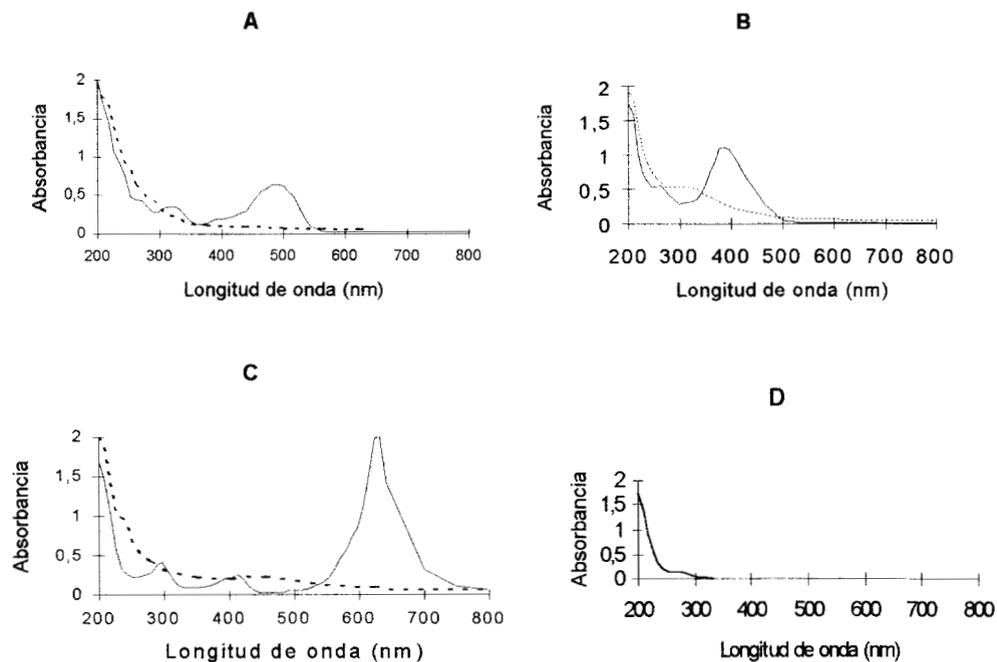
Estos resultados demuestran que no existe una relación entre el nivel de biomasa producida y la decoloración, sino que en todo caso las diferencias son consecuencia de los diferentes grupos químicos presentes en cada colorante tal como ha sido demostrado por varios autores (Spadaro y col., 1992 y Paszczyński y col., 1992).

Los porcentajes de decoloración obtenidos con los colorantes azo son comparables a los reportados en FmL por Pasti y col (1992) y Cripps y col. (1990). Con Azul 1 se obtuvo una decoloración del 90 % que también es comparable a la que se reportan Bumpus y Brock, (1988) para colorantes trifenilmetano en condiciones limitadas de nitrógeno en FmL.

La adsorción de colorante en el micelio no puede considerarse como la causa principal de decoloración, debido a los bajos niveles de biomasa que se produjeron.

Durante la decoloración de Amarillo ácido 9 y Azul 1 se produjo una coloración café -oscura que se incrementó en el curso de la fermentación. En los espectros de absorción de las muestras del séptimo día, que se presentan en la Figura 7.3, se registró un pico no bien definido a 300 nm para Amarillo ácido 9 y a 243 nm para Azul 1, que no se presentaron en las soluciones iniciales. Probablemente esos picos corresponden a un producto colorido formado durante el metabolismo del colorante por *P. chrysosporium*. Se debe notar que ese pico no se produjo en el medio sin colorante por lo que debe ser consecuencia de la modificación del grupo cromóforo y no a la presencia de metabolitos generados por *P. chrysosporium*. En el caso del Rojo 40 no se produjo ningún intermediario colorido durante la fermentación y por tanto en el espectro sólo se observó el pico de máxima absorción.

Probablemente si el tiempo de incubación se hubiera prolongado en este estudio los productos coloridos hubieran desaparecido como sucede en la mineralización de ácido sulfanílico, en la que se forma un producto café oscuro que desaparece después de 14 días de incubación (Paszczyński y col., 1992).

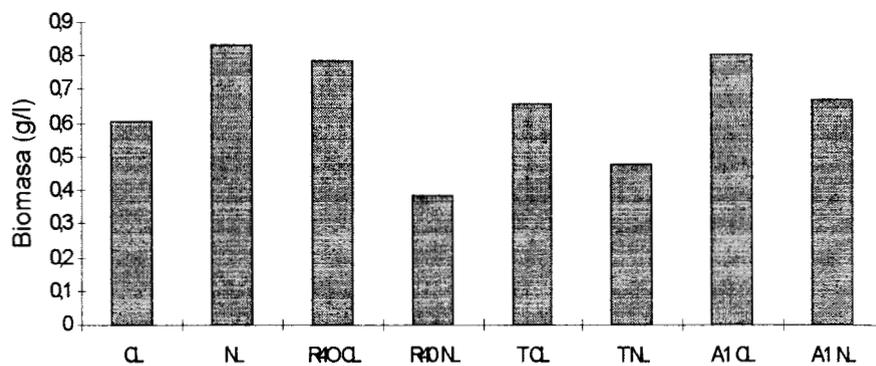


**Figura 7.3. Espectros de absorción UV-visible de los colorantes usados como sustrato en la decoloración en presencia de *P. chrysosporium*. Los gráficos corresponden a Rojo 40 (A), Amarillo ácido 9 (B), Azul 1 (C) y medio sin colorante (D). Los espectros corresponden a las soluciones iniciales( — ) y a los obtenidos después de 7 días de incubación (.....).**

## 7.2. Efecto de la relación carbono-nitrógeno

Se sabe que la lignina no es utilizada como única fuente de carbono, ya que su degradación oxidativa no produce suficiente energía para el crecimiento (Kirk y col., 1978). Los colorantes seleccionados poseen una estructura química más sencilla y la degradación podría entonces implicar su incorporación a la biomasa. Para determinar si los colorantes eran utilizados como fuente de carbono o nitrógeno se empleó una modificación del medio basal descrito (Sección 4.3.1), incrementándose las concentraciones de micronutrientes para garantizar que la producción de biomasa no fuera limitada por éstos; la nueva composición (en g/l) fue:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.15;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.05 y  $\text{CaCl}_2$ , 0.05; en el medio limitado en nitrógeno se adicionaron 30 g/l de glucosa y 0.05g/l de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , y en el limitado en carbono 3 g/l de cada uno. Se adicionaron 2 g/l de Rojo 40, Tropaeolin O y Azul I, como control se inocularon medios sin colorante incubados bajo las mismas condiciones durante siete días.

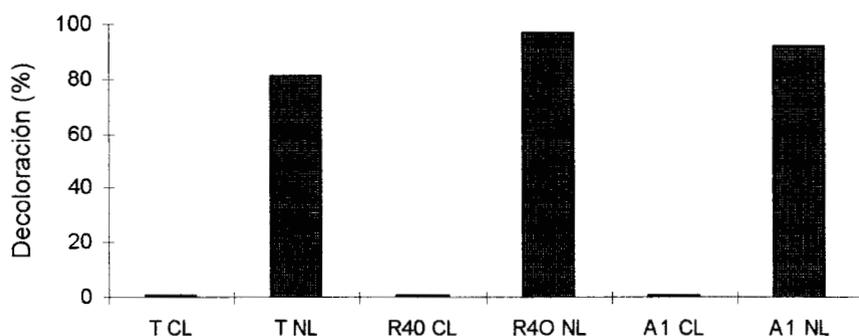
La producción de biomasa fue mayor en condiciones limitadas de carbono, como se muestra en la Figura 7.4., la máxima producción (0.82 g/l) se obtuvo en el medio limitado en carbono sin colorante. En presencia de los colorantes la biomasa producida fue menor a la del control correspondiente, en el caso del Rojo 40 en medio limitado en nitrógeno la biomasa estuvo muy por debajo del valor esperado (véase los resultados de la sección anterior), además que la fuente de nitrógeno es suficiente para soportar el crecimiento (Jeffries y col., 1981) y no es probable que el Rojo 40 haya inhibido el crecimiento, ya que en el medio limitado en carbono la biomasa fue ligeramente menor a la del control.



**Figura 7.4. Biomasa final de *P. chrysosporium* A-594 a los siete días de incubación en medio limitado en carbono (CL) o nitrógeno (NL). Los colorantes que se probaron fueron: Rojo 40 (R40), Tropaeolin O (T) y Azul 1 (A1).**

Es importante mencionar que con el Rojo 40 se obtuvo la menor biomasa, pero la máxima decoloración, lo que parece indicar que el nivel de actividad de decoloración no está asociada a la cantidad de biomasa producida y que la decoloración no implica la incorporación de los colorantes a la biomasa como fuente de carbono o nitrógeno. En el medio limitado en carbono la glucosa adicionada fue suficiente para soportar un mayor crecimiento, si se considera un  $Y_{x/s} = 0.37$  g biomasa/g glucosa, (Ulmer y col., 1983) y hay nitrógeno suficiente, razones que explican el mayor crecimiento con respecto al medio limitado en nitrógeno. El nivel de glucosa también puede ser la causa de la baja decoloración en el medio limitado en carbono, ya que en un medio suficiente en nitrógeno la actividad enzimática ligninolítica inicia cuando se agota la fuente de carbono (Ulmer y col., 1983).

En la Figura 7.5 se observa que la decoloración en presencia de *P. chrysosporium* fue favorecida en condiciones limitadas de nitrógeno, en el medio con Rojo 40 la decoloración fue del 97 %, con Tropaeolin O del 82 % y con Azul 1 del 92 % al cabo de siete días de incubación, resultados que coinciden con la información mostrada en la sección anterior. La mayor decoloración obtenida con Rojo 40 se explica al igual que en la sección anterior por los grupos hidroxilo presentes en el anillo.



**Figura 7.5. Decoloración en presencia de *P. chrysosporium* durante siete días de incubación en condiciones limitadas de nitrógeno (NL) o de carbono (CL). Los colorantes que se estudiaron fueron: Rojo 40 (R40), Tropaeolin O (T) y Azul 1 (A1).**

En el medio limitado en carbono la decoloración fue menor al 5 % que puede ser atribuido a la adsorción de colorante en el micelio, por tanto, en el medio limitado en nitrógeno la causa principal de decoloración debe ser la acción de *P. chrysosporium*. En este caso tampoco hubo decoloración abiótica en los controles (medio con colorante y sin inóculo).

La mineralización de colorantes azo de tipo disperso (Spadaro y col., 1992) ocurre más rápidamente en medio limitado en nitrógeno, tal como sucedió en este estudio, incluso se ha demostrado que la actividad ligninolítica es también favorecida en condiciones limitadas de nitrógeno.

La menor producción de biomasa en los medios adicionados de colorantes permitió confirmar que no son utilizados como fuente de carbono o nitrógeno para la producción biomasa, aunque en cultivos más prolongados si se incorpora del 1 al 5 % del carbono del colorante a la biomasa (Pasti y col., 1992).

## 8. BIODECOLORACIÓN POR FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos de los estudios con *P. chrysosporium* en FMS, la primera parte corresponde a la producción de extractos enzimáticos para establecer el efecto de la concentración de  $H_2O_2$  y pH sobre la actividad LiP y MnP y fijar las condiciones de reacción para los ensayos de actividad enzimática.

En la segunda parte se estudió el efecto de las condiciones de cultivo (la relación C/N y aireación) en la actividad ligninolítica durante la FMS, con el fin de determinar las condiciones más adecuadas para la producción de extractos enzimáticos que habrían de utilizarse en los ensayos de decoloración *in vitro*.

Finalmente se presentan los resultados de decoloración por FMS *in situ* en condiciones limitadas de nitrógeno, esto es, la eliminación de colorante en las columnas de fermentación en presencia de *P. chrysosporium* A-594, cuando los colorantes fueron adicionados al medio de cultivo al tiempo inicial.

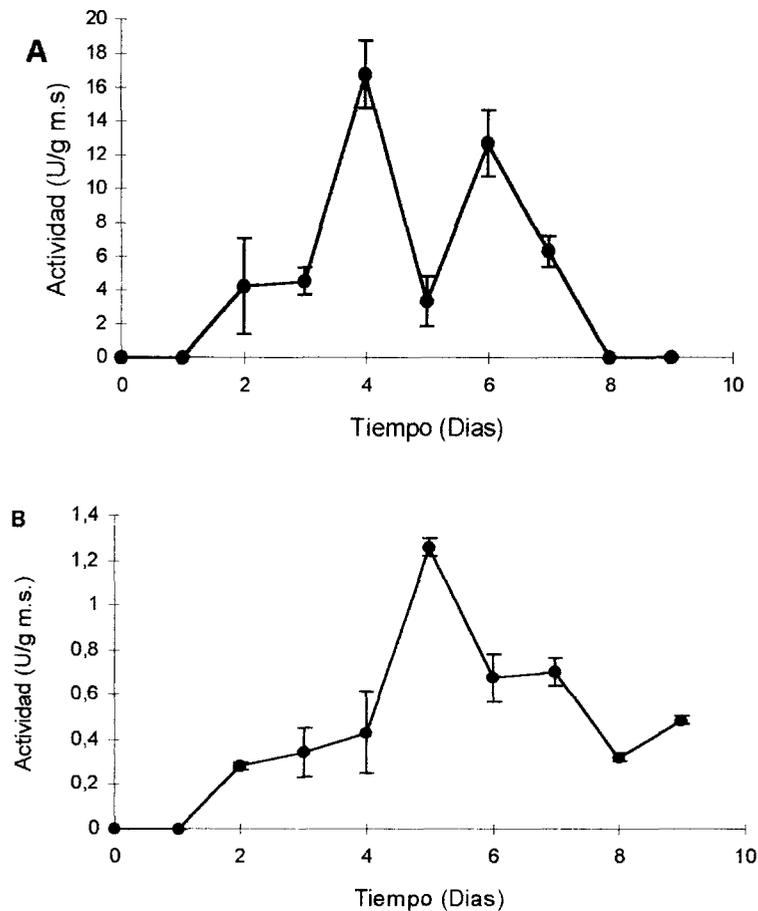
### 8.1. Estudios de producción de actividad LiP y MnP

Antes de estudiar el efecto de las condiciones de reacción sobre la actividad ligninolítica, se realizó una cinética para la determinación de actividad enzimática LiP y MnP para conocer el punto de máxima actividad y fijar el tiempo de toma de muestras para probar efecto de la concentración de  $H_2O_2$  y pH sobre la actividad enzimática y realizar los ensayos de decoloración.

#### 8.1.1. Cinéticas de producción de extractos enzimáticos

Debido a que la actividad LiP y MnP se favorece en condiciones limitadas de nitrógeno en cultivos por FmL (Faison y Kirk, 1985 y Pease y Tien, 1992), se decidió probar el medio limitado en nitrógeno descrito en Materiales y Métodos (sección 4.5.2.4), con una tasa de aireación específica de 5.33 vgm. Se incubó durante ocho días para tomar muestras cada 24 horas y la actividad enzimática se ensayo según se indicó en la sección 4.4.2.4. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

En la Figura 8.1-A se muestra que la producción de actividad LiP inició entre el primero y segundo día para alcanzar el máximo al cuarto día con 16 U/ g m.s., a partir de ese punto la actividad decrece y deja de detectarse al octavo día. El pico de actividad máxima no se presentó muy pronunciado, como habitualmente se registra en la FmL (Faison y Kirk, 1985 y Faison y col., 1986).



**Figura 8.1. Actividad LiP ( A) y MnP ( B) de *P. chrysosporium* en medio limitado en nitrógeno con una tasa de aireación específica de 5.33 vgm.**

Para la actividad MnP se obtuvo un perfil similar al de la LiP, que se muestra en la Figura 8.1-B, la actividad inició casi al mismo tiempo que la LiP y la máxima se registró el día cinco con 1.2 U/ g m.s. A partir de ese punto la actividad decrece lentamente pero aún el día 9 se detectó actividad.

La manera alternada en que se presentan los picos de actividad LiP y MnP, corresponden a lo reportado en FmL (Faison y Kirk, 1985) y puede justificarse por las diferentes reacciones de oxidación que catalizan, las cuales permiten que los productos de reacción obtenidos con una enzima puedan funcionar como sustratos de la otra y que desempeñen por tanto un papel fisiológico también diferente.

Se debe mencionar que en FmL el decaimiento de la actividad LiP está asociado a la presencia de proteasas (Dosoretz y col., 1990a), que también han sido detectadas en la FMS (Datta, 1992), y a su desactivación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Jensen y col., 1994). En este caso es muy probable que esas mismas causas sean las que provocan el decaimiento de actividad. La actividad MnP no ha sido asociada a la actividad proteolítica, pero debe existir una relación, ya que la actividad proteolítica permite a *P. chrysosporium* recircular las fuentes de nitrógeno (Ulmer y col., 1983) a partir del micelio o de las enzimas que se excretan al medio.

Los resultados obtenidos en esta parte sugirieron una pobre estabilidad de la actividad de los extractos enzimáticos, por lo que se decidió estudiar la estabilidad de los extractos después de conservarlos en refrigeración con el fin de evitar interpretaciones erróneas en los estudios subsecuentes.

### **8.1.2. Estabilidad de la actividad enzimática de los extractos**

Para determinar la estabilidad de los extractos enzimáticos conservados en refrigeración se realizó una fermentación en condiciones limitadas de nitrógeno y una tasa de aireación de 5.33 vgm. Se tomaron muestras al cuarto y quinto día para la determinación de actividad enzimática LiP y MnP, respectivamente.

Se encontró que si las columnas de fermentación se refrigeraban (4° C) antes de obtener el extracto se perdía la actividad enzimática LiP, en tanto que no se observa ningún efecto sobre la actividad MnP. Los resultados de actividad enzimática después de conservar en refrigeración los extractos se muestran en la Tabla 8.1, donde se aprecia que al cuarto día de refrigeración ya no se detecta actividad LiP. En contraste, la actividad MnP se conservó en los extractos aún después de 7 días en refrigeración. Probablemente la pérdida de actividad

LiP fue ocasionada por proteólisis o desnaturalización. Estos resultados reiteraron la importancia de realizar las determinaciones de actividad enzimática en cuanto se toman las muestras.

**Tabla. 8.1 Estabilidad de la actividad enzimática LiP y MnP de extractos crudos conservados en refrigeración.**

TIEMPO (Días)	LiP (U/g m.s)	MnP (U/g m.s)
0	0.40	0.20
4	0	0.25
7	0	0.15

Los ensayos de actividad se realizaron en las condiciones reportadas para las enzimas producidas por FmL, pero quizá para los extractos producidos por FMS se requirieran otras condiciones de reacción, por esto se consideró necesario establecer las condiciones para el ensayo de actividad enzimática.

### 8.1.3. Efecto de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y pH en la actividad LiP y MnP

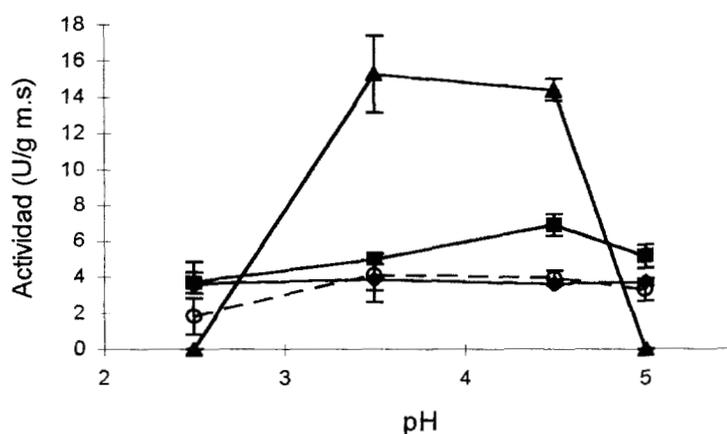
Las propiedades cinéticas de extractos purificados (Tusiel y col., 1990; Farrel y col., 1989 y Pease y Tien, 1992) y crudos (Hu y col., 1993) producidos por FmL han sido ampliamente estudiadas, pero se desconocen las características de enzimas ligninolíticas producidas por FMS, que pueden ser diferentes. Esto motivó el interés de determinar el efecto del pH y la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la actividad LiP y MnP, variables que se eligieron porque inciden de manera directa sobre la actividad, ocasionando la desnaturalización de la enzima o inhibición de la actividad.

La fermentación se realizó en condiciones limitadas de nitrógeno y una tasa de aireación de 5.33 vgm. Se tomaron muestras el día cuatro para el ensayo de actividad LiP y el día cinco para el de actividad MnP. Los tiempos de muestreo se definieron con base en las cinéticas mostradas en la sección 8.1. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

El efecto de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y del pH sobre la actividad LiP se muestra en la Figura 8.2. La actividad fue máxima con 0.4 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y pH 3.5, produciendo 16.44 U/g

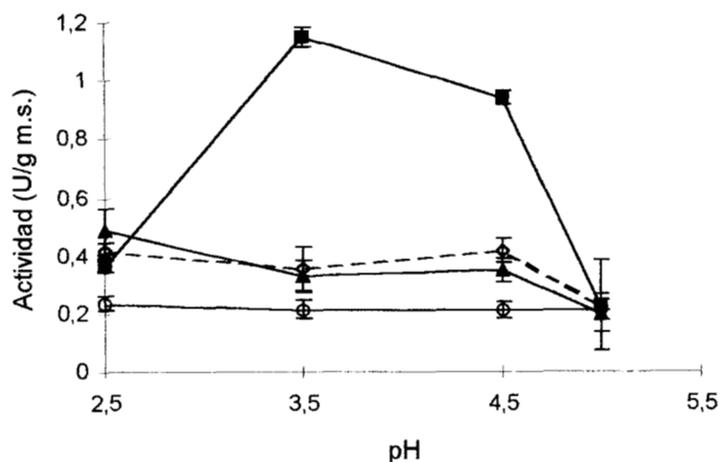
m.s., al incrementarse el pH la actividad descendió ligeramente y se perdió por completo a pH 5. Los perfiles obtenidos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.2 y 0.5 mM son similares y sólo se presentó una ligera disminución de actividad a pH 2.5. En presencia de 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el máximo se desplazó a 4.5 y sólo se observó un leve descenso a valores de pH diferentes. La baja actividad LiP en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM probablemente sea consecuencia de la oxidación de la enzima a un estado inactivo (Glumoff y col., 1990).

Las isoenzimas LiP muestran diferente estabilidad a pH, como óptimo se reporta de 2 a 2.5 (Glumoff y col., 1990), en el presente estudio se registró en 3.5. A valores de pH menores a 3.5 y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.4 mM la actividad disminuye bruscamente. A valores de pH superiores la disminución de actividad puede ser resultado de una disminución de la velocidad de reacción entre el alcohol veratrílico y la enzima oxidada (Odiar y Artaud, 1992).



**Figura. 8.2.** Efecto de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y pH sobre la actividad enzimática lignina peroxidasa. Las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ensayadas en la mezcla de reacción fueron : 0.02 (○), 0.05 (◆), 0.4 (▲) y 1 mM (■).

El perfil de actividad MnP se muestra en la Figura 8.3, se observa que es similar al de la LiP, la actividad máxima se encontró con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM y pH 3.5 produciendo una actividad de 1.1 U/g m.s., aunque a pH 4.5 la actividad fue ligeramente menor (0.94 U/g m.s.). En concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inferiores a 0.4 mM la actividad fue tres veces menor y se modificó sólo ligeramente dentro del intervalo de pH estudiado, a diferencia de los cambios bruscos que se observaron con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM y valores de pH menores a 3.5 o mayores a 4.5.



**Figura. 8.3.** Efecto de la concentración de  $H_2O_2$  y pH sobre la actividad enzimática manganeso peroxidasa. Las concentraciones de  $H_2O_2$  ensayadas en la mezcla de reacción fueron: 0.02 (○), 0.05 (◆), 0.4 (▲) y 1 mM (■).

El mínimo efecto de pH sobre la actividad MnP en presencia de  $H_2O_2$  0.05 mM puede ser consecuencia de la limitación de peróxido, para isoenzimas MnP purificadas se ha encontrado (Aitken e Irvine, 1990; Pease y Tien, 1992) un  $K_s$  entre 20 y 57  $\mu M$ . El descenso de actividad a valores de pH menores a 3.5 también puede ser debido a la desnaturalización como en el caso de la LiP.

En FmL la formación óptima de Mn (II) sucede a pH 4.5 y es también el pH al que se realizan las determinaciones de actividad enzimática (Aitken e Irvine, 1990), por lo que se retomó este valor para los estudios posteriores de actividad enzimática.

## **8.2. Efecto de la relación carbono nitrógeno y de la aireación sobre la producción de actividad LiP y MnP**

En la FmL los factores que afectan principalmente la actividad ligninolítica son la transferencia de oxígeno y la limitación de carbono o nitrógeno. Con el fin de conocer si en la FMS se producen efectos similares se decidió estudiar el efecto de la aireación y la limitación de esos nutrientes sobre la actividad LiP y MnP. La fermentación se realizó en el

medio descrito en Materiales y Métodos (Sección 4.2) con tasas de aireación de 10.66 y 5.33 vgm.

La cinética de la actividad LiP se muestra en la Figura 8.4-A, se observa que sí hubo efecto de las condiciones de cultivo, aunque en las cuatro condiciones estudiadas el máximo se registró el día cinco. La mayor actividad (37.4 U/g m.s) se presentó en condiciones limitadas de nitrógeno y una tasa de aireación de 5.33 vgm, en los demás casos la actividad fue menor a 4 U/ g m.s. Los picos de máxima actividad LiP, tal como sucede en la FmL, presentaron una caída brusca después de alcanzar el máximo.

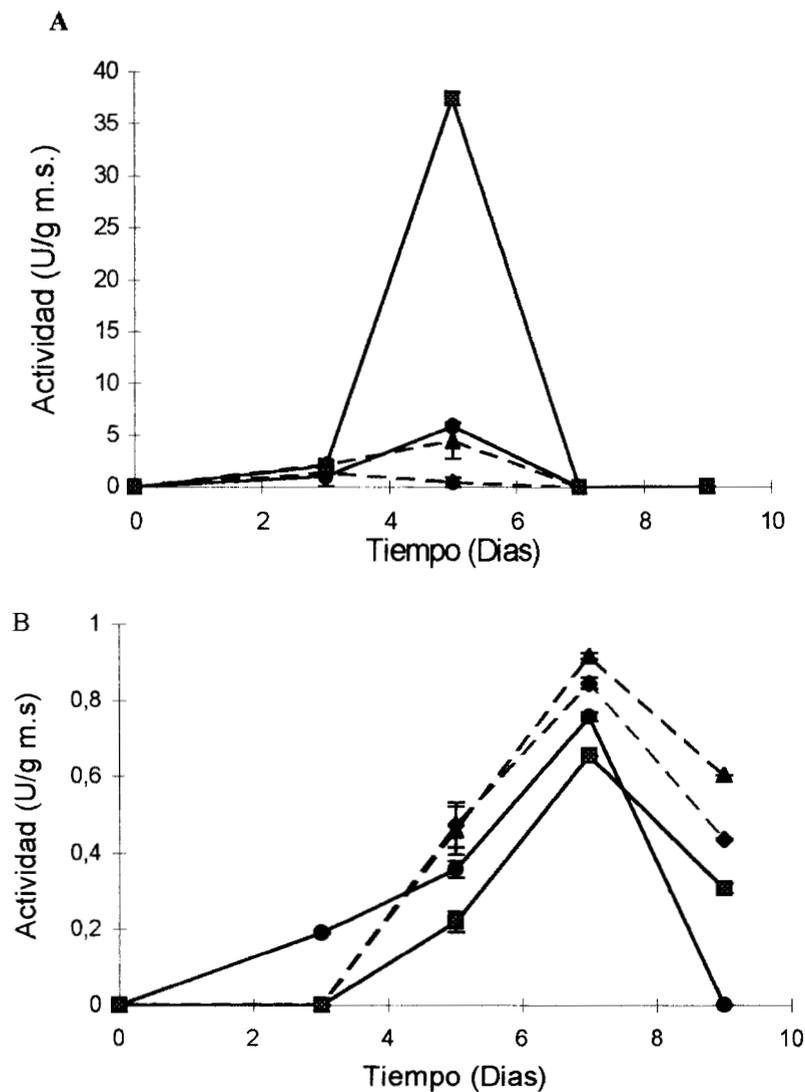


Figura 8.4. Efecto de las condiciones de cultivo en la actividad (A) LiP y (B) MnP de *P. chrysosporium*, en un medio limitado en nitrógeno con 5.3 vgm (■) y 10.66 vgm (▲); o en medio limitado en carbono con 5.33 vgm (●) y 10.66 vgm (◆).

La cinética de la actividad MnP se muestra en la Figura 8.4-B, se observa que inició después que la LiP (entre el tercer y cuarto día), a excepción del medio limitado en carbono y una tasa de aireación de 10.66 vgm en el que comenzó antes. Al igual que en la cinética anterior los máximos se presentaron al mismo tiempo e incluso registraron valores muy similares, el valor más alto (0.92 U/g m.s) se presentó en el medio limitado en carbono y 10.66 vgm. En esta cinética la caída de actividad después del punto máximo no fue tan brusca y se detectó actividad aún al noveno día, a excepción del medio limitado en carbono.

Los perfiles de las cinéticas de actividad LiP fueron similares a los reportados para la FmL. La actividad LiP se favoreció en medio limitado en nitrógeno, tal como lo reportan Faison y Kirk (1985) para la FmL, pero el máximo no se alcanzó primero en condiciones limitadas de carbono. La producción de MnP fue también favorecida en medio limitado en nitrógeno de manera similar a lo reportado por Pease y Tien (1992). Una posible explicación a las diferencias observadas es el hecho de que las propiedades cinéticas de las enzimas producidas por FMS y FmL son diferentes (Acuña y col., 1995), efecto que también se ha observado en las propiedades físico químicas de las proteasas producidas por *P. chrysosporium* por FMS y FmL (Datta, 1992).

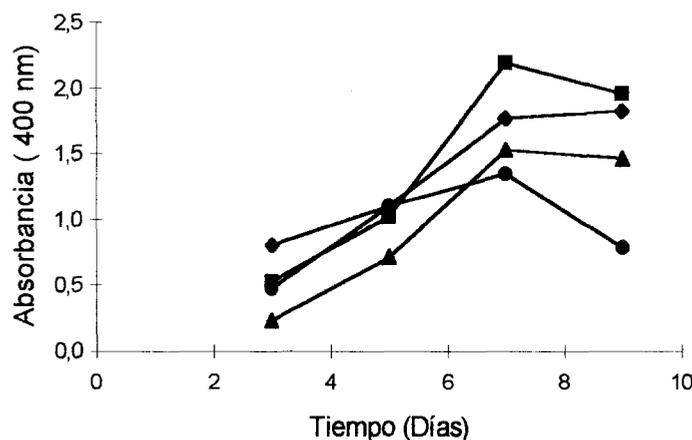
En FmL típicamente la actividad MnP se presenta antes que la LiP (Cancel y col., 1993), en este trabajo ocurrió lo contrario, pero es importante mencionar que los picos de ambas coinciden con los de actividad peroxidasa encontrados en FMS sobre la pulpa de madera de álamo (Datta y col., 1991).

Tanto la actividad LiP como la MnP son menores a las que se han obtenido en FmL, pero la producción podría mejorarse optimizando la composición del medio de cultivo; se debe considerar también que las enzimas podrían estar ligadas a la lignina del bagazo de caña como lo sugieren Datta y col. (1991) para la pulpa de madera de álamo, por lo que mejorar el método de extracción puede ser una buena opción.

En estudios previos se observó que el bagazo adquiría una coloración naranja durante la FMS, que aparentemente estaba asociada al crecimiento de *P. chrysosporium*, este cambio se registró leyendo la absorbancia a 450 nm. Los cambios en la absorbancia en el curso de la fermentación se muestran en la Figura 8.5, se observa que el máximo se registró el día siete,

en las cuatro condiciones estudiadas, al mismo tiempo al que se registra la máxima actividad MnP. Es importante hacer notar que la absorbancia más alta se presentó en el medio limitado en nitrógeno y 5.33 vgm, condición en la que también la actividad LiP fue mayor. Durante la FMS con pulpa de madera de álamo se reporta (Datta y col., 1991) un cambio en la coloración del material debido al ataque fúngico, la absorbancia a 400 nm tiende a incrementarse, aunque no se presenta un descenso como en este estudio.

Las observaciones antes mencionadas sugirieron que el cambio en la coloración del bagazo está asociado a la actividad enzimática más que al crecimiento y que puede tomarse como una medida cualitativa de la actividad enzimática ligninolítica



**Figura. 8.5.** Absorbancia del extracto crudo durante la fermentación con *P. chrysosporium*, en medio limitado en nitrógeno con 5.3 vgm ( ■ ) y 10.66 vgm ( ▲ ); o en medio limitado en carbono con 10.66 ( ● ) y 5.33 vgm ( ◆ ).

Durante esta fermentación también se determinaron la humedad y el pH, con el fin de conocer si el cambio de estos parámetros podría afectar la actividad enzimática ligninolítica. En la Figura 8.6 se muestra el cambio en la humedad del bagazo durante la fermentación, se observa que se mantuvo entre 77 y 80%, que en promedio se encuentra en el intervalo reportado por Zadrazil y Brunnert (1982) como adecuado para la degradación de lignina.

La cinética de pH se muestra en la Figura 8.7, se observa que se incrementó ligeramente para llegar al máximo al día cinco, con un valor de 5.5, tiempo al cual se detectó la máxima actividad LiP. A partir de ese punto desciende lentamente hasta alcanzar su valor inicial.

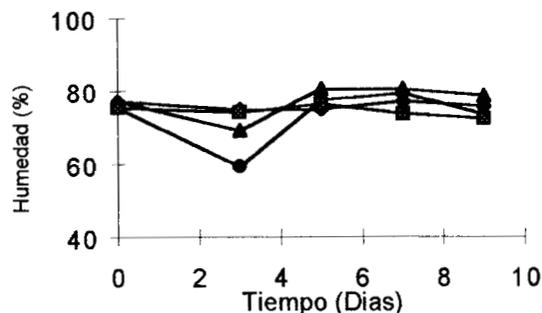


Figura 8.6. Cinética de humedad durante la fermentación con *P. chrysosporium* en medio limitado en nitrógeno con 5.33 vgm (■) o 10.66 vgm (▲); o en medio limitado en carbono con 5.33 (◆) y 10.66 vgm (●).

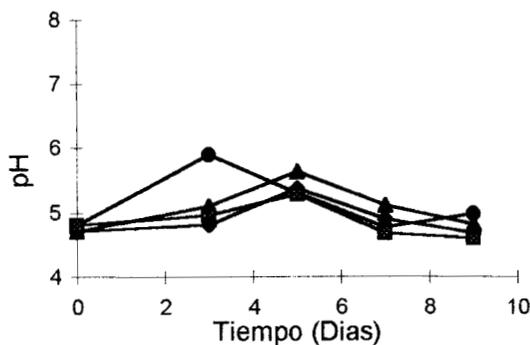


Figura 8.7. Cinética de pH durante la fermentación con *P. chrysosporium* en medio limitado en nitrógeno con 5.33 (■) y 10.66 vgm (▲); o en medio limitado en carbono con 5.33 (◆) y 10.66 vgm (●).

En esta parte se determinaron las condiciones en las cuales la producción de actividad LiP y MnP se favorece, así como el punto de actividad máxima, esta información se retomó para fijar las condiciones en las cuales se produjo un extracto para ensayar la decoloración *in vitro*.

### 8.3. Decoloración *in vitro* con extractos enzimáticos producidos por FMS

Son diversos los estudios de decoloración con extractos producidos por FmL, pero no existe algún estudio con extractos obtenidos por FMS. Fue esto lo que motivó el interés en estudiar la decoloración en las condiciones de reacción ya determinadas, con extractos enzimáticos crudos producidos por FMS. La fermentación se corrió en medio limitado en nitrógeno con una aireación de 10.66 vgm (humedad inicial del 71%), se tomaron muestras los días cinco y siete para ensayar la actividad enzimática y la decoloración en las mezclas de reacción para LiP y MnP con soluciones 0.1 y 1 mM de Rojo 40, Amarillo ácido 9 y Azul 1, como se describe en Materiales y Métodos (sección 4.5.2.4 y 4.5.2.5). Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

En los ensayos con las soluciones 1 mM de colorante no se registraron cambios en la absorbancia en ninguna de las condiciones de reacción probadas, por tanto sólo se reportan los resultados obtenidos con soluciones 0.1 mM. En la Tabla 8.2 se muestra la decoloración

en condiciones de reacción para la LiP y para la MnP, se observa que ésta fue diferente para cada colorante, el Rojo 40 se decoloró con los extractos enzimáticos del día cinco y siete en un porcentaje similar en condiciones de reacción para LiP; mientras que en condiciones de reacción de la MnP la decoloración disminuyó en casi un 50 % con el extracto del día siete.

El Amarillo ácido 9 fue el que se decoloró en mayor proporción, con las muestras del día cinco se alcanzó un 45 % de decoloración para ambas actividades, sin embargo, con la muestra del día siete el porcentaje de decoloración disminuyó considerablemente. Con el Azul 1 se obtuvo una respuesta similar a la del Amarillo ácido 9, pero la decoloración registrada el día cinco fue menor, del 28 y 20 % para LiP y MnP, respectivamente.

**Tabla 8.2. Decoloración con extractos enzimáticos producidos por *P. chrysosporium* en FMS.**

Colorante	Absorbancia máxima (nm)	Decoloración con extractos del día 5 (%)		Decoloración con extractos del día 7 (%)	
		LiP	MnP	LiP	MnP
Amarillo ácido 9	385	45	44.8	9.19	10
Rojo 40	495	27.9	20	26.1	12.6
Azul 1	629	28	20	6.9	4.7

En la Tabla 8.3 se muestran los resultados de actividad enzimática de los extractos, se observa que el nivel de actividad MnP concuerda con los resultados de la cinética mostrada en la sección 8.1.1, manteniéndose casi constante en 2 U/g m.s. La actividad LiP fue menor que la obtenida en la cinética e incluso nula al día siete.

**Tabla 8.3 Actividad enzimática de los extractos producidos por *P. chrysosporium* en FMS.**

Día	LiP (U /g m.s.)	MnP (U /g m.s.)
5	0.002	2.0
7	0	2.4

Es probable que en la decoloración del Amarillo ácido 9 estén implicadas otras reacciones (oxidación por la membrana celular o reacciones alternas de LiP y MnP), como sucede con el Rojo Congo, que no es decolorado por extractos purificados con actividad LiP producidos en medio limitado en nitrógeno, pero si en presencia de *P. chrysosporium* crecido en el mismo medio (Cripps y col., 1990), que es la respuesta observada en este trabajo (Véase las sección 7.2.). Paszczynski y Crawford (1991), encontraron que la adición de alcohol veratrílico favorece la oxidación de colorantes porque permite completar el ciclo catalítico, probablemente la adición de este compuesto podría favorecer también la decoloración con los extractos producidos por FMS.

El Rojo 40 fue decolorado en ambas condiciones de reacción, esto no es sorprendente porque en numerosos estudios se ha demostrado que los colorantes azo son oxidados por la LiP y la MnP (Paszczynski y col., 1991 y Ollikka y col., 1993).

Se ha demostrado (Bumpus y Brock, 1988) que el cristal violeta -colorante de tipo trifenilmetano- es degradado por extractos con actividad LiP, en nuestro caso el Azul 1 no fue decolorado en ninguna mezcla de reacción, probablemente la explicación sea la misma que se presentó para el Amarillo ácido 9.

Una vez que se comprobó que los extractos producidos por FMS mostraron actividad de decoloración, se hizo una comparación entre la decoloración *in vitro* y la decoloración en presencia de *P. chrysosporium* durante la FMS, ya que probablemente la presencia conjunta de las enzimas y del alcohol veratrílico podrían permitir una mayor eliminación de colorante.

#### **8.4. Decoloración por *P. chrysosporium* en FMS**

Uno de los objetivos principales de este trabajo fue determinar la capacidad de decoloración en FMS. Inicialmente se comprobó que *P. chrysosporium* A-594 es capaz de decolorar colorantes azo y trifenilmetano en CS en condiciones limitadas de nitrógeno lo que permitió suponer que en la FMS también ocurriría la eliminación de colorante. La fermentación se realizó en medio limitado de nitrógeno y una tasa de aireación de 10.66

vgm, la humedad inicial del bagazo fue del 70 % y se tomaron muestras diariamente para determinar el colorante residual. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Con los tres colorantes probados la decoloración fue evidente hasta el tercer día de incubación, aunque menos notoria con Azul 1. En la Figura 8.9 se muestran los perfiles de la decoloración, se observa que la eliminación de colorante fue más rápida entre el segundo y cuarto día, para después disminuir lentamente. Con los tres colorantes se alcanzó una decoloración final del 82 %.

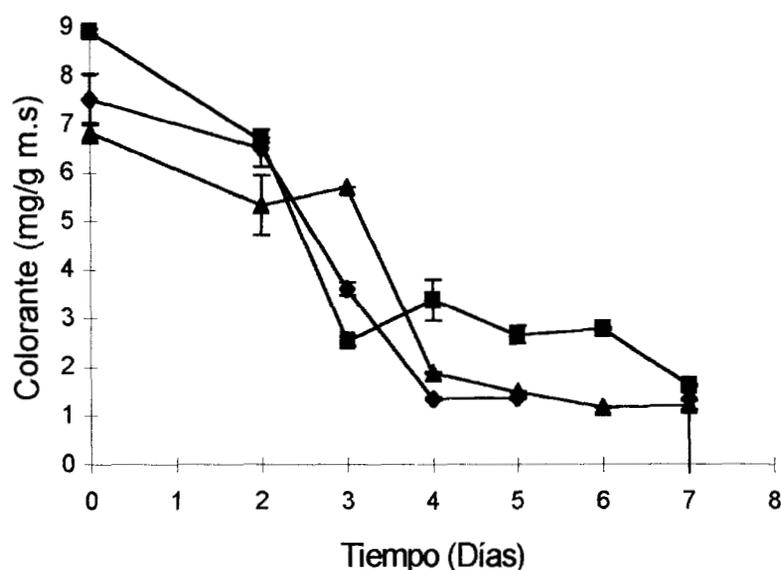


Figura 8.9. Decoloración de Amarillo ácido 9 ( ■ ), Rojo 40 ( ◆ ) y Azul 1 ( ▲ ) en condiciones limitadas de nitrógeno con *P. chrysosporium* en FMS.

La velocidad de decoloración (Vd) fue estimada como la pendiente de las curvas entre el tiempo cero y cuatro; la constante de reacción (decoloración) fue estimada por la ecuación:  $\ln(C_i/C_f) = K_d \cdot t$ , donde la  $K_d$  corresponde a la constante de reacción;  $C_i$  y  $C_f$  a la concentración inicial y final de colorante. Esta ecuación se ha empleado para calcular las constantes de degradación de otros compuestos por *P. chrysosporium*.

En la Tabla 8.4 se muestran la Vd para cada colorante, si bien, con los tres la mayor decoloración ocurrió en el mismo intervalo de tiempo, la Vd sí es diferente. La mayor Vd se

obtuvo con el Rojo 40, que también tienen la  $K_d$  más alta. La  $V_d$  del Amarillo ácido 9 es mayor que la del Azul 1, pero los valores de  $K_d$  son inversos, quizá el Amarillo ácido 9 tuvo un ligero efecto tóxico que fue la causa de la menor decoloración observada en CS y de que el colorante residual fuera mayor al sexto día de incubación.

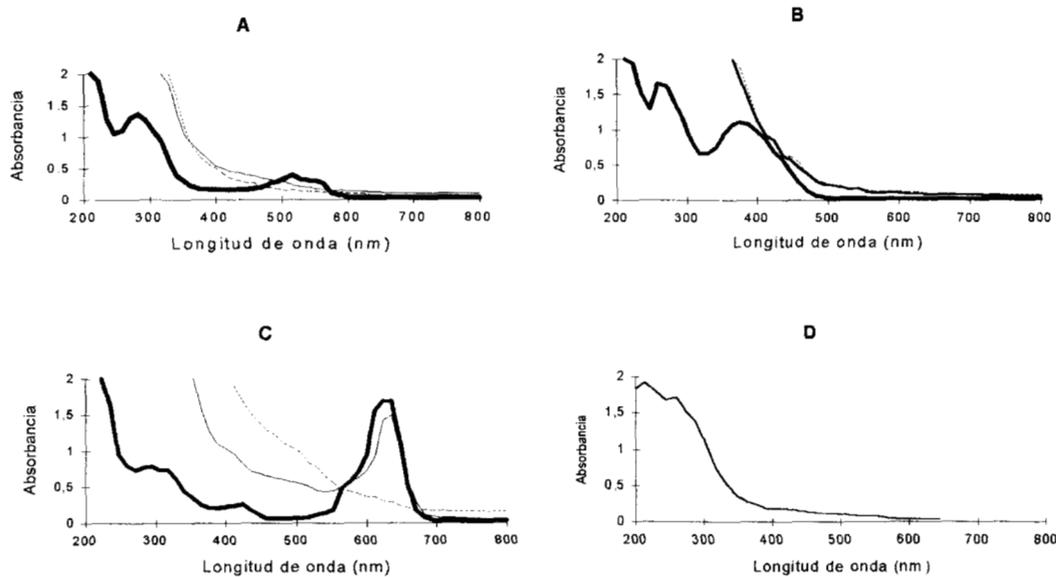
**Tabla 8.4 Velocidad de decoloración y Constante de decoloración**

<b>COLORANTE</b>	<b><math>V_d</math> (colorante/g m.s día)</b>	<b><math>K_d</math> (<math>t^{-1}</math>)</b>
Rojo 40	2.6	0.405
Amarillo ácido 9	1.6	0.237
Azul 1	0.4	0.302

Tal como lo reportan Pasti y col. (1992) para FmL la velocidad de fue mayor entre el segundo y tercer día. En los resultados de decoloración en CS mostrados anteriormente (sección 7.2.) la mayor eliminación de colorante ocurrió con Rojo 40 seguido del Azul 1 y de Amarillo ácido 9 con un porcentaje de decoloración muy similar.

La tonalidad naranja desarrollada en las columnas de fermentación en ausencia de colorante (véase sección 8.2) se presentó a partir del tercer día y en el caso del Amarillo ácido 9 interfería para apreciar visualmente la decoloración. La tonalidad café oscuro que se produjo durante la FMS con este colorante fue menos intensa que la del CS, en el espectro de absorción que se muestra en la Figura 8.9. se observa que apareció un pico no bien definido entre 300 y 500 nm a la vez que el pico de máxima absorción (385 nm) desapareció.

En la decoloración de Azul 1 también se produjo una coloración oscura, como sucedió en el CS y al igual que con el Amarillo ácido 9 sucedió la aparición de un pico no definido entre 300 y 500 nm, a la vez que también desaparecía el pico de máxima absorción.



**Figura 8.10. Espectros de absorción UV-visible de los extractos obtenido por FMS con (A) Rojo 40, (B) Amarillo ácido 9, (C) Azul 1 y (D) sin colorante en presencia de *P. chrysosporium*. Se muestran los espectros del extracto obtenido de una columna sin colorante (—), muestra del día 5 (---) y del día 7 (···).**

En el caso del Rojo 40, que sólo sucedió la desaparición de color, en el espectro de absorción se registró un pico (entre 200 y 350 nm) que ha sido observado en los extractos obtenidos en la FMS sin colorante y que se muestra en el espectro correspondiente. Aunque estos cambios indican una transformación del grupo cromóforo no se puede asegurar que haya ocurrido la completa degradación, pues en la FmL la mineralización ocurre en tiempos de incubación mayores.

# CONCLUSIONES GENERALES

## 9. CONCLUSIONES GENERALES

- ◆ Los colorantes estudiados fueron estables a la temperatura y luz ambientales en un intervalo de pH entre 4.5 y 6.5, por lo que la decoloración en el CS fue atribuida a la acción de *P. chrysosporium*.
- ◆ La mejor capacidad de decoloración la presentó la cepa A 594 por lo que fue elegida par realizar los estudios de decoloración en CS y FMS.
- ◆ Los colorantes Amarillo ácido 9, Tropaeolin O, Rojo 40 y Azul 1 no fueron utilizados como fuente de carbono y/o nitrógeno por *P. chrysosporium* A-594 y no presentan un efecto inhibitorio sobre el crecimiento en las concentraciones empleadas en este trabajo.
- ◆ La actividad de decoloración en CS fue favorecida en medio limitado en nitrógeno, tal como sucede con la actividad enzimática ligninolítica en FmL, incluso los niveles de decoloración obtenidos son comparables.
- ◆ Los efectos de pH y concentración de peróxido de hidrógeno en la actividad enzimática LiP y MnP de los extractos producidos por FMS fueron similares a los reportados para enzimas producidas por FmL.
- ◆ La actividad LiP de los extractos producidos por FMS fue más inestable que la MnP y se perdió antes de cuatro días en refrigeración.
- ◆ La tasa de aireación y limitación de carbono o nitrógeno afectó de manera diferente la actividad enzimática de los extractos producidos por FMS. La actividad LiP se favoreció en condiciones limitadas de nitrógeno y una tasa de aireación de 5.33 vgm, en tanto que la MnP no mostró cambios importantes frente a estas variables.
- ◆ En condiciones de reacción para LiP y MnP se logró decolorar el Amarillo ácido 9 y Rojo 40 con los extractos enzimáticos producidos por FMS.

- ◆ *P. chrysosporium* fue capaz de decolorar el Amarillo ácido 9, Rojo 40 y Azul 1 en FMS siguiendo una cinética parecida a la reportada para la FmL y los porcentajes de decoloración fueron similares a los encontrados para el CS.
- ◆ La FMS representa una alternativa interesante para la degradación de compuestos xenobióticos sea por la producción de extractos enzimáticos o en el propio sistema de fermentación, debido a la relativa facilidad del manejo del cultivo.

# RECOMENDACIONES

## 10. RECOMENDACIONES

- ◆ En base a los resultados experimentales obtenidos en este trabajo se pueden plantear ciertas recomendaciones que permitirían la aplicación práctica de la FMS en el tratamiento de compuestos xenobióticos, explicar de manera más profunda los eventos asociados actividad a la enzimática LiP y MnP en la FMS y la relación de estas actividades con la degradación de los compuestos xenobióticos. Las recomendaciones que se proponen son las siguientes:
- ◆ Para determinar el destino final de los colorantes o de cualquier otro compuesto se considera conveniente marcar radiactivamente con  $^{14}\text{C}$ , pero es necesario un tiempo de cultivo más prolongado.
- ◆ Para cualquier compuesto a degradar por vía fermentativa es importante la identificación de los compuestos finales y posibles intermediarios, con el fin de asegurar que no se obtendrán productos cuyo efecto pueda ser más nocivo que el del compuesto del cual derivan.
- ◆ Tratar de establecer una correlación entre la actividad ligninolítica y la degradación de compuestos durante la FMS con el fin de determinar si ésta es la responsable de la degradación o existen otras causas asociadas a la actividad fisiológica del microorganismo.
- ◆ Un factor importante en el decaimiento de la actividad LiP es la actividad proteasa, debido a esto se considera importante cuantificarla y tratar de minimizarla para prolongar la actividad ligninolítica.
- ◆ La optimización del medio de cultivo y condiciones de operación son una alternativa interesante para mejorar el nivel de actividad ligninolítica y la degradación de compuestos xenobióticos.
- ◆ La investigación básica es por demás importante para entender la fisiología de los microorganismos. Con respecto a *P. chrysosporium* poco se sabe sobre la actividad

enzimática ligninolítica en la FMS, así como de las propiedades cinéticas de las enzimas, por lo que pueden ser dos aspectos de investigación fundamental para la aplicación en el tratamiento de compuestos xenobióticos.

222250

# BIBLIOGRAFÍA

## BIBLIOGRAFIA

Acuña A.M., Gutiérrez R. M., Viniegra G.G. y Favela T.E. (1995). Production of properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* produced in solid-state fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 808-814.

Agrios N.G. (1978). *Plant Pathology*. Academic Press Inc, USA, pp. 82.

Aitken M.D. y Irvine R.L. (1990). Characterization of reactions catalyzed by Manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem Biophys.* 276(2): 405-414.

Aust S.D. (1988). Degradation of environmental pollutants by *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiol. Ecol.* 20: 197-209.

Austin H.C., Dosoretz G.C. y Grethlein H.E. (1991). Ligninase production by immobilized cultures of *Phanerochaete chrysosporium* under nitrogen sufficient conditions. *Enzyme Microb. Technol.* 13(5): 404-407.

Barr D.P. y Aust S.D. (1994). Mechanism white rot fungi use to degrade pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 28(2): 78A-87A.

Boonarme P. y Jeffries T.W. (1990). Mn(II) regulation of lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase from lignin-degrading white-rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(1): 210-217.

Boominathan K. y Reddy C. (1992). Fungal degradation of lignin: biotechnological applications. En *Handbook of Applied Microbiology and Fungal Biotechnology*, (Arora D.K., Elander R.P. y Mukerji K.G. Eds), Vol. 4, Marcel Dekker Inc. N.Y. pp.763-821.

Bumpus J.A. y Aust S.D. (1986). Biodegradation of environmental pollutants by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of the lignin degrading system. *BioEssays* 6: 166-170.

Bumpus J.A. y Brock B.J. (1988). Biodegradation of crystal violet by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(5): 1143-1150.

Bumpus J.A., Tien M., Wright D. y Aust S.D. (1985). Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science* 228: 1434-1436.

Burdsall H.H. y Eslin W.E. (1974). A new *Phanerochaete* with a *chrysosporium* imperfect state. *Mycotaxon* 1(2): 123-133.

- Cancel A., Orth A. y Tien M. (1993). Lignin and veratryl alcohol are not inducers of ligninolytic system of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(9): 2909-2913.
- Cao W., Mahadevan B., Crawford D. y Crawford R. (1993). Characterization of an extracellular azo-dye oxidizing peroxidase from *Flavobacterium sp.* ATCC 39723. *Enzyme Microb. Technol.* 15: 810- 817.
- Castillo H.Y., Jimenez A.H., Rivera A.M. y Rodríguez C.R. (1993). Tratamiento y reutilización de aguas residuales representativas de la industria textil". Tesis de Licenciatura, ESIT-IPN, pp. 23-30.
- Chao W.L. y Lee S.L. (1994). Decoloration of azo dyes by three white rot fungi: influence of carbon source. *World J. Microb. Biotech.* 10: 556-559.
- Colour Index (1971). Society of dyers and colourists, Bradford, Eng. and American Association of Textil Chemists and Colourists, Lowell, Mass. pp. 4009 y 4379.
- Cripps C., Bumpus J.A. y Aust S.D. (1990). Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(4): 1114-1118.
- Datta A. (1992). Purification and characterization of a novel protease from solid substrate cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biotechnol. Chem.* 267(2):728-736.
- Datta A., Betterman A. y Kirk T.K. (1991). Identification of a specific manganese peroxidase among ligninolytic enzymes secreted by *Phanerochaete chrysosporium*, during wood decay. *Enzyme Microb. Technol.* 57(5):1453-1460.
- Dhawale S. y Kessler K. (1993). Alternative methods for production and staining of *Phanerochaete chrysosporium* basidiospores. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(5): 1675-1677.
- Degremont (1979). *Water treatment Handbook*, John Wiley and Sons, Francia, pp. 829-831.
- Dosoretz C.G., Dass B., Reddy C.A. y Grethlein H. (1990a). Protease-mediated degradation of lignin peroxidase liquid cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(11): 3429-3434.
- Dosoretz C.G., Chen H. y Grethlein H.E. (1990b). Effect of environmental conditions on extracellular protease activity in ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(2):395-400.
- Dosoretz C.G., Chen H. y Grethlein H.E. (1990c). Effect of oxygenation conditions on submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34: 131-137.

Farrel R.L., Murtagh K.E., Tien M., Mozuch M.D. y Kirk T.K. (1989). Physical and enzymatic properties of lignin peroxydase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme. Microb. Technol.* 11: 322-328.

Faison B.D. y Kirk T.K. (1985). Factores involved in the regulation of ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49(2): 299-304.

Faison B.D., Kirk T.K. y Farrell R.L. (1986). Role of veratryl alcohol in regulating ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:299-304.

Feijoo G., Dosoretz C. y Lema J.M. (1994). Production of lignin peroxidase from *Phaerochaete chrysosporium* in a packed bed bioreactor with recycling. *Biotechnol. Techniques* 8(5): 363-368.

Feijoo G., Rothschild N., Dosoretz C. y Lema J.M. (1995). Effect of addition of extracellular culture fluid on ligninolytic enzyme formation in *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biotechnol.* 40: 21-29.

Fewson Ch. A. (1988). Biodegradation of xenobiotic and other persistent compounds: the causes of recalcitrance. *TIBTECH.* 6(7): 148-152.

Field J.A., Jong E., Feijoo G. y Bont J.A. (1993). Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *TIBTECH.* 11: 44-49.

Forrester I.T., Grabski A.C., Burgess R.R. y Leatham G.F. (1987). Manganese Mn-dependent peroxidases and the biodegradation of lignin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157: 992-999.

Glenn J.K. y Gold M.H. (1983). Decolorization of several polymeric dyes by the lignin degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1741-1747.

Glumoff T., Harvey P., Molinari S., Globe M. y Frank G. (1990). Lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Eur. J. Biochem.* 187: 515-520.

Gold M.H. y Gleen J.K. (1988). Manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods in Enzimology* 161: 238-249.

Gold M.H. y Cheng T.M. (1979). Conditions for fruit body formation in the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* 121: 37-41.

Goszczyński S., Paszczyński A., Pasti-Grigsby M.B., Crawford R.L. y Crawford D.L. (1994). New pathway for degradation of sulfonated azo dyes by microbial peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. *J. Bacteriol.* 176(5): 1339-1347.

Graham D. (1975). Color and chemical constitution of dyes. En The chemistry of synthetic dyes and pigments, (Lubs H.A. Eds.), Reinhold publishing corporation, USA, pp. 663-677.

Gutiérrez Rojas M. (1995). Contribución al modelamiento de matemático de la fermentación sólida de hongos filamentosos en soportes inertes. Tesis de Doctorado, UAM-I., pp. 2-4.

Haug W., Schmidt A., Nortemann B., Hempel D.C., Stoltz A.Y. y Knackmuss H. (1991). Mineralization of the sulfonated azo dyes mordant yellow 3 by a-6-aminonaphthalene-2-sulfonate-degrading bacterial consortium. Appl. Environ. Microbiol. 57: 3144-3149.

Hu Z.C., Korus R.A., VenKataramu C.R. y Crawford R.L. (1993). Deactivation kinetics of lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Enzyme Microb. Technol. 15: 567-574.

Inch J.M. y Trinci A.P. (1987). Effects of water activity on growth and sporulation of *Paecilomyces farinosus* in liquid and solid media", J. Gen. Microb. 133: 247-252.

Illman D.L. y Washington C. (1993). Hazardous waste treatment using fungus enters marketplace. Science and Technology, July, 26-29

Jeffries T.W., Choi S. y Kirk T.K. (1981). Nutritional regulation of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 42(2): 290-296.

Jensen K.A., Evans K.M., Kirk K. y Hemmel K.E. (1994). Biosynthetic pathway of veratryl alcohol in the ligninolytic fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 60(2): 709-714.

Katagiri N., Tsutsumi Y. y Nishida T. (1995). Correlation of birghtening with cumulative enzyme activity related to lignin biodegradation during biobleaching of kraft pulp by white rot fungi in the solid state fermentation system. Appl. Environ. Microbiol. 61(2): 617-622.

Kelley R.L. y Reddy C.A. (1986). Identification of glucose oxidase activity as the primary source of hydrogen peroxide production in ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Microbiol. 144: 248-253.

Kerem Z., Friesem D. y Hadar Y. (1992). Lignocellulose degradation during solid state fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 58: 1121-1127.

Kirk K. (1988). Biochemistry of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. En Biochemistry and genetics of cellulose degradation: Proceedings of the Federation of Microbiological Societies Symposium no. 43, (Aubert J.P. Beguin P. Millet J. Eds.), Academic Press Inc. pp. 315-332.

- Kirk T.K., Schultz E., Connors W.J., Lorenz L.F. y Zeikus J.G. (1978). Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Microbiol. 117: 277-285.
- Kolthoff I.M. Sandell E.B. (1969). Quantative chemical analysis. MacMillan Company, USA. pp. 825-827 y 834-835.
- Kurek B. y Kersten P. (1995). Physiological regulation of glyoxal oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* by peroxidase systems. Enzyme Microb. Technol. 17: 751-756.
- Leahy M.C. y Brown R. A (1994). Modelling and mapping are critical, while air sparging and soil vapor extraction have become strong allies. Chem. Eng. May 108-116.
- Leisola M., Ulmer D. y Fiechter A. (1983). Problem of oxygen transfer during degradation of liginin by *Phanerochaete chrysosporium*. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 17: 113-116.
- Lema J.M. (1995). Producción y empleo de enzimas ligninolíticas para la degradación de compuestos xenobióticos. Memorias del XX Congreso de Bioquímica, Santiago de Chile, pp.1-11.
- Levonen-Muñoz E. y Bone D.H. (1985). Effect of different gas environments on bench scale solid state fermentation of oat straw by white-rot fungi. Biotechnol. Bioeng. 22: 382-387.
- Martin B.V.M. y Nicoli J.R. (1987). Influence of spore and mycelium inoculation of *Phanerochate chrysosporium* on solid state fermentation of Napier Grass (*Pennisetum purpureum shumaker*) residue. Rev. Microbiol., Sao Paulo, 18(1): 58-66.
- Mitchell D.A. y Lonsane B.K. (1992). Definition characteristics and potencial. En Solid substrate cultivation (Doelle H.W., Mitchel D.A. y Rolz C.E. Eds.), Elsevier Science Published LTD, Gran Bretaña, pp. 1-10.
- Morgan P., Lewis S.T. y Watkinson R.J. (1991). Comparison of abilities of white-rot fungi to mineralize selected xenobiotic compounds. Appl. Microbiol. Technol. 34: 693-696
- Moukha S.E., Wosten H.A., Mylius E. Asther M. y Wessels J.G. (1993). Spatial and temporal accumulation of mRNAs encoding two common lignin peroxidases in *Phanerochaete chrysosporium*. J. Bacteriol. 175(11):3672-3678.
- Odier E. y Artaud I. (1992). Degradation of lignin. En Microbial Degradation of Natural Products. (Winkelmann G. Eds), VCH, Alemania. pp. 161-191.
- Ollikka P., Alhonmaki K. y Leppanen V. (1993). Decolorization of azo, triphenylmethane, heterocyclic and polymeric dyes by lignin peroxidase isozymes from *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 59(12): 4010-4016.

Pasti M.B., Paszczynski A., Goszczynski S. y Crawford D.L. (1992). Influence of aromatic substitution patterns on azo dyes degradability by *Streptomyces spp.* and *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 58(11): 3605-3613.

Paszczynski A. y Crawford R.L. (1991). Degradation of azo compounds by ligninase from *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of veratryl alcohol. Biochem. Biophys. Res. Commun. 178(3):1056-1063.

Paszczynski A., Huynh V. y Crawford R.L. (1986). Comparison of ligninase-I and peroxidase-M2 from the white rot-fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Biochem. Biophys. 244(2): 750-765.

Paszczynski A., Pasti M.B., Goszczynski S.L., Crawford D.L. y Crawford R.L. (1991). New approach to improve degradation of recalcitrant azo dyes by *Streptomyces spp.* and *Phanerochaete chrysosporium*. Enzyme Microb. Technol. 13: 378-384.

Paszczynski A., Pasti M.B., Goszczynski S.L., Crawford R.L. y Crawford D.L. (1992). Mineralization of sulfonated azo dyes and sulfanilic acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. Appl. Environ. Microbiol. 58(11): 3598-3604.

Pease E. y Tien M. (1992). Heterogeneity and regulation of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. J. Bacteriol. 174(11): 3532-3540.

Platt M.W., Hadar Y. y Chet Y. (1985). The decolorization of the polymeric dye poly-blue (polyvinylamine sulfonate-anthraquinone) by lignin degrading fungi. Appl. Microbiol. Biotechnol. 21: 394-396.

Puniya A.K., Zadrazil F. y Singh K. (1994). Influence of gaseous phases on lignocellulose degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. Bioresource Technology 47: 141-143.

Raimbault M. Alazard D. (1980). Culture method to study fungal growth in solid fermentation. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 9:199-209.

Sax N.J. y Lewis R.J. (1989). Dangerous properties of industrial materials. Vol. I, II y III Printed by Nostrand USA.

Smith D. (1974). Maintenance of fungi. En Maintenance of microorganisms (Kirsop B.E. y Snell J.J.S. Eds.), Academic Press Inc. USA, pp. 90

Smith J.E. y Berry D.R. (1975). The filamentous fungi. Vol I. Edward Arnold, London, pp.96-98

Singleton I. (1994). Microbial metabolism of xenobiotics fundamental and applied research. J. Chem Tech. Biotechnol. 59: 9-23.

Spadaro J.T., Gold M. y Renaganathan V. (1992). Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 58(8): 2397-2401.

Spadaro J.T. y Renaganathan V. (1994). Peroxidase-catalyzed oxidations of azo dyes: mechanism of disperse yellow 3 degradation. Arch. Biochem. Biophys. 312(1):301-307.

Tien M. (1987). Properties of ligninase from *Phanerochaete chrysosporium* and their possible applications. CRC Crit. Rev. Microbiol. 5(2). 141-168.

Tien M. y Kirk T.K. (1988). Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. Methods in Enzymology. Vol. 61, pp. 238-249.

Trutmant E.R. (1990). Dyeing and chemical technology of textil fibers. Edward Arnold, Gran Bretaña, pp. 323-338 y 353-441.

Tusiel H., Sinclair R. Bumpus J.A. (1990). Lignin peroxidase H<sub>2</sub> from *Phanerochaete chrysosporium* purification, characterization and stability to temperatur and pH. Arch. Biochem. Biophys. 279(1):158-166.

Ulmer D., Leisola M., Puhakka J. y Feichter A. (1983). *Phanerochaete chrysosporium*: growth pattern and lignin degradation. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 18: 153-157.

Valmaseda M., Martínez M.J. y Martínez A.T. (1991). Kinetics of wheat straw solid-state fermentation with *Trametes versicolor* y *Pleurotus ostreatus*: lignin and polysaccharide alteration and production of related enzymatic activities. Appl. Microbiol. Biotechnol. 35: 817-823.

Zadrazil F. y Brunnert H. (1981). Investigation of physical parameters important for the solid-state-fermentation of straw by white-rot fungi. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 11: 183-188.

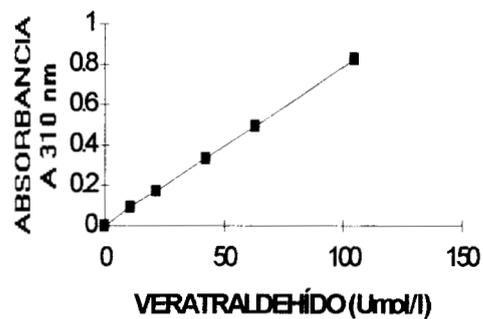
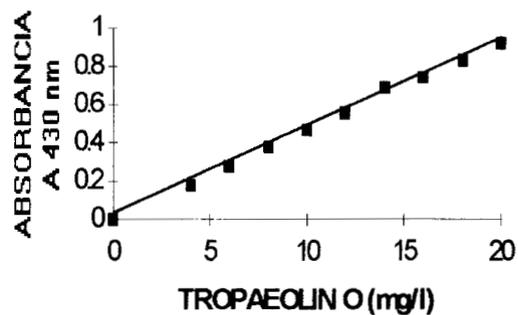
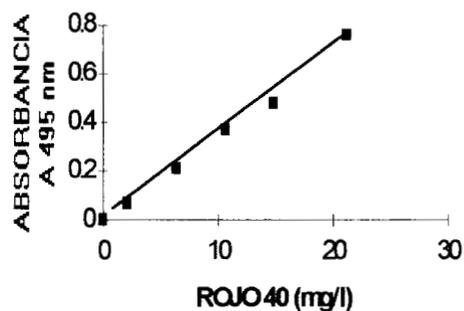
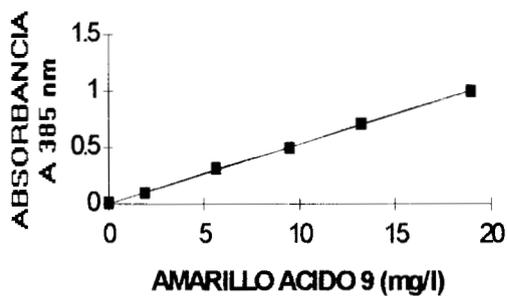
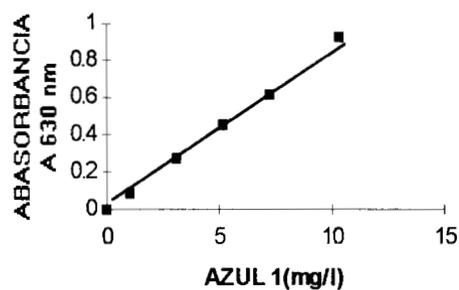
Zadrazil F. y Brunnert H. (1982). Solid state fermentation of lignocellulose containing plant residues with *Sporotrichum pulverulentum* Nov. and *Dichomitus squalens* (kast) Ried. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 16: 45-51.

Zhou W. y Zimmermann W. (1993). Decolorization of industrial effluents containing reactivates dyes by actinomycetes. FEMS Microbiol. Lett. 107: 157-162.

# ANEXOS

## ANEXO

### A. Curvas estándar de colorantes y veratraldehído.



	Azul 1	Amarillo ácido 9	Rojo 40	Tropaeolin O	Veratraldehído
Pendiente	0.087	0.052	0.035	0.046	$7.779 \times 10^{-3}$
Intercepto	-0.003	0.003	-0.011	$-2.1 \times 10^{-3}$	$53.78 \times 10^{-3}$
Coefficiente de regresión	0.994	0.999	0.986	0.998	0.997

los parámetros fueron obtenidos por un análisis de regresión lineal de los datos con Statgraphics.

## B. Análisis de varianza de los resultados de la sección 6.2

B.1. Comparación entre la biomasa promedio (BIOM) producida por cada cepa para los diferentes tratamientos que se identificaron como: grupo 1 = SF, grupo 2 = CF, grupo 3 = T SF, grupo 4 = TCF, grupo 5 = A9 FS y grupo 6 = A9 CF (según la leyenda de la figura 6.2).

### GRUPO 1

Variable dependiente: BIOM

Fuente	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Valor de F	Pr > F
Modelo	1	0.01849600	0.01849600	99999.99	0.0001
Error	2	0.00000000	0.00000000		
Total corregido	3	0.01849600			

#### Prueba T (LSD) para variable: BIOM

Alpha= 0.05 GL= 2 MSE= 0

Agrupamiento T	Media
A	0.5200
B	0.3840

(En todos los casos letras iguales indican que no son significativamente diferentes)

### GRUPO 2

Variable dependiente: BIOM

Fuente	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Valor de F	Pr > F
Modelo	1	0.01742400	0.01742400	53.12	0.0183
Error	2	0.00065600	0.00032800		
Total corregido	3	0.01808000			

#### Prueba T (LSD) para variable: BIOM

Alpha= 0.05 GL= 2 MSE= 0.000328

Agrupamiento T	Media
A	0.57800
B	0.44600

### GRUPO 3.

Variable dependiente: BIOM

Fuente	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Valor de F	Pr > F
Modelo	1	0.19580625	0.19580625	277.25	0.0036
Error	2	0.00141250	0.00070625		
Total corregido	3	0.19721875			

#### Prueba T (LSD) para variable: BIOM

Alpha= 0.05 GL= 2 MSE= 0.000706

Agrupamiento T	Media
A	0.84250
B	0.40000

**GRUPO 4**

Variable dependiente: BIOM

Fuente	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Valor de F	Pr > F
Modelo	1	0.00025600	0.00025600	0.01	0.9168
Error	2	0.03671200	0.01835600		
Total corregido	3	0.03696800			

Prueba T (LSD) para variable: BIOM

Alpha= 0.05 GL= 2 MSE= 0.018356

Agrupamiento T	Media
A	0.8700
A	0.8540

**GRUPO 5**

Variable dependiente: BIOM

Fuente	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Valor de F	Pr > F
Modelo	1	0.00504100	0.00504100	1.97	0.2957
Error	2	0.00512200	0.00256100		
Total corregido	3	0.01016300			

Prueba T (LSD) para variable: BIOM

Alpha= 0.05 GL= 2 MSE= 0.002561

Agrupamiento T	Media
A	0.53200
A	0.46100

**GRUPO 6**

Variable dependiente: BIOM

Fuente	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Valor de F	Pr > F
Modelo	1	0.02528100	0.02528100	5.18	0.1507
Error	2	0.00977000	0.00488500		
Total corregido	3	0.03505100			

Prueba T (LSD) para variable: BIOM

Alpha= 0.05 GL= 2 MSE= 0.004885

Agrupamiento T	Media
A	0.89300
A	0.73400

B.2. Efecto de la adición de fenilalanina en la producción de biomasa (BIOM) en los tratamientos identificados como : grupo 1 = SF, grupo 2 = CF, grupo 3 = T SF, grupo 4 = TCF, grupo 5 = A9 FS y grupo 6 = A9 CF (según la leyenda de la figura 6.2).

### GRUPO 1

Variable dependiente: BIOM

Fuente	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Valor de F	Pr > F
Modelo	1	0.00462400	0.00462400	10.91	0.0807
Error	2	0.00084800	0.00042400		
Total corregido	3	0.00547200			

#### Prueba T (LSD) para variable: BIOM

Alpha= 0.05 GL= 2 MSE= 0.000424

Agrupamiento T	Media
A	0.57800
A	0.51000

### GRUPO 2

Variable dependiente: BIOM

Fuente	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Valor de F	Pr > F
Modelo	1	0.00319225	0.00319225	49.68	0.0195
Error	2	0.00012850	0.00006425		
Total corregido	3	0.00332075			

#### Prueba T (LSD) para variable: BIOM

Alpha= 0.05 GL= 2 MSE= 0.000064

Agrupamiento T	Media
A	0.448500
B	0.392000

### GRUPO 3

Variable dependiente: BIOM

Fuente	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Valor de F	Pr > F
Modelo	1	0.00280900	0.00280900	6.87	0.1200
Error	2	0.00081800	0.00040900		
Total corregido	3	0.00362700			

#### Prueba T (LSD) para variable: BIOM

Alpha= 0.05 GL= 2 MSE= 0.000409

Agrupamiento T	Media
A	0.86000
A	0.80700

**GRUPO 4**

Variable dependiente: BIOM

Fuente	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Valor de F	Pr > F
Modelo	1	0.19802500	0.19802500	10.95	0.0804
Error	2	0.03615400	0.01807700		
Total corregido	3	0.23417900			

Prueba T (LSD) para variable: BIOM

Alpha= 0.05 GL= 2 MSE= 0.018077

Agrupamiento T	Media
A	0.8540
A	0.4090

**GRUPO 5**

Variable dependiente: BIOM

Fuente	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Valor de F	Pr > F
Modelo	1	0.18662400	0.18662400	134.84	0.0073
Error	2	0.00276800	0.00138400		
Total corregido	3	0.18939200			

Prueba T (LSD) para variable: BIOM

Alpha= 0.05 GL= 2 MSE= 0.001384

Agrupamiento T	Media
A	0.89400
B	0.46200

**GRUPO 6**

Variable dependiente: BIOM

Fuente	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Valor de F	Pr > F
Modelo	1	0.04080400	0.04080400	6.85	0.1202
Error	2	0.01191200	0.00595600		
Total corregido	3	0.05271600			

Prueba T (LSD) para variable: BIOM

Alpha= 0.05 GL= 2 MSE= 0.005956

Agrupamiento T	Media
A	0.73400
A	0.53200

C. Análisis de varianza de los resultados de la sección 7.1

Efecto de la adición de colorate sobre la producción de biomasa (BIOM) de *P. chrysosporium* A 594.

Variable dependiente: BIOM

Fuente	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Valor de F	Pr > F
Modelo	4	0.04690840	0.01172710	0.55	0.7100
Error	5	0.10698050	0.02139610		
Total corregido	9	0.15388890			

Prueba T (LSD) para variable: BIOM

Alpha= 0.05 GL= 5 MSE= 0.021396

Agrupamiento T	Media
A	0.8280
A	0.7240
A	0.7240
A	0.6940
A	0.6145