

**Decolorización del licor negro del pulpeo
Organosolv del bagazo de la caña de
azúcar por *Phanerochaete chrysosporium*:
influencia de los requerimientos
nutricionales**
**Black liquor decolorization from
Organosolv pulping of sugar cane bagasse
by *Phanerochaete chrysosporium*: influ-
ence of nutritional requirements**

Xavier Gabarrell Durany,² Leyanis Mesa Garriga^{1*}, Erenio González Suárez¹, Gloria Caminal², Miguel Ramos Leal³.

¹ Centro de Análisis de Procesos. Facultad de Química-Farmacia. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas (Villa Clara). Cuba.

² Departamento de Ingeniería Química. Escuela Técnica Superior de Ingeniería. Universidad Autónoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, España.

³ Departamento de Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de La Habana, La Habana, Cuba.

Resumen

El licor negro generado del proceso Organosolv del bagazo de la caña de azúcar fue tratado con el hongo de podredumbre blanca *Phanerochaete chrysosporium*, para la realización de estudios preliminares de evaluación de la disminución del color, compuestos aromáticos y demanda química de oxígeno (DQO). Los estudios se realizaron en erlenmeyers. Se evaluaron diferentes condiciones de temperatura y requerimientos nutricionales. Los mejores resultados fueron obtenidos a 37°C y en condiciones de limitación de nitrógeno con 38 % de disminución de color y 12 % de disminución de la DQO. En el transcurso del experimento no fueron detectadas las actividades de la lignina peroxidasa ni manganeso peroxidasa, sin embargo este hongo es capaz de producir estas enzimas. A partir de los resultados obtenidos, se puede concluir que existen otros factores independientes de la presencia de las actividades enzimáticas que provocan estos resultados.

Palabras clave: *Phanerochaete chrysosporium*, licor negro, pulpeo Organosolv.

Abstract

The generated black liquor of Organosolv process from sugarcane bagasse was treated with white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*, for the realization of preliminary studies of evaluation of the decrease of the color, compound aromatic and demand oxygen chemistry (DQO). The studies were carried out in erlenmeyers. Different conditions of temperature and nutritional requirements were evaluated. The best results were obtained at 37°C and under conditions of nitrogen limitation with 38% of color decrease and 12% of decrease of the DQO. In the course of the experiment the activities of the lignin peroxidase neither manganese peroxidase were not detected, however this fungus is able to produce these enzymes. Starting from the obtained results, you can conclude that other independent factors of the presence of the enzymatic activities that cause these results exist.

Key words: *Phanerochaete chrysosporium*, black liquor, Organosolv pulping.

Introducción

La situación por la que actualmente atraviesa la industria de pulpa y papel a nivel mundial es compleja, por ser uno de los sectores industriales que más contribuye a la contaminación ambiental y por lo general carecer de un sistema de tratamiento efectivo de sus residuales. Por este motivo, en muchos casos, vierten sus efluentes al ambiente sin tratamiento previo provocando el deterioro del mismo. Las legislaciones en materia ambiental son cada vez más severas, es por ello que esta industria está obligada a hacer eficientes sus procesos para optimizar el aprovechamiento y la protección de los recursos naturales.

Durante la producción de pulpa a través del pulpeo con etanol (proceso Organosolv), el agua residual conocida como licor negro posee valores de demanda química de oxígeno (DQO) superiores a lo establecido por la norma cubana.³ Este licor negro contiene en gran medida un biopolímero aromático, heterogéneo y complejo llamado lignina que juega un rol estructural muy importante. La biodegradabilidad anaerobia de este licor negro es baja, debido a la presencia de ligninas y sus derivados.⁶ La baja biodegradabilidad unida a la toxicidad de este residual sugieren que un pretratamiento previo a la digestión anaerobia es necesario para detoxificar y facilitar su posterior degradación.

Los hongos de podredumbre blanca, degradadores de la madera, parecen ser los microorganismos más promisorios para detoxificar estos efluentes, ya que son capaces de degradar tanto la lignina como otros compuestos fenólicos, por lo que presuntamente deben permitir detoxificar estos efluentes aumentando su biodegradabilidad por el fraccionamiento de compuestos de alto peso molecular.

Se conoce que el *P. chrysosporium* es el hongo modelo de la mayoría de los estudios ligninolíticos, y *T. versicolor* muestra selectividad en la degradación del polímero. Este hongo posee un sistema enzimático no específico que es capaz de degradar un amplio rango de compuestos recalcitrantes incluyendo la lignina. Hay varios reportes que describen la degradación óptima en medios que contienen limitada, suficiente y excesiva cantidad de nitrógeno. Sin embargo, el sistema que degrada la lignina es activado comúnmente cuando el nitrógeno o la fuente de carbono asimilable se encuentran en limitación.

Teniendo en cuenta lo anterior el objetivo fundamental del trabajo fue establecer las condiciones adecuadas de trabajo en cuanto a temperatura y requerimientos del medio para *P. chrysosporium*, determinando los parámetros de respuesta (color, compuestos aromáticos y DQO del licor negro), a esas condiciones y además evaluar la influencia de las enzimas ligninolíticas LiP y MnP sobre los parámetros respuestas estudiados.

Materiales y Métodos

Microorganismo y condiciones de cultivo

El microorganismo utilizado en este estudio fue el *Phanerochaete chrysosporium* CECT 2777, mantenidas a 23 °C en placas de Petri en medio agar con extracto de malta 2 % y sembradas periódicamente.

Producción del inóculo

El medio de crecimiento utilizado en el caso de *Phanerochaete chrysosporium* es el propuesto por Kirk *et al* (1978). La concentración de glucosa y de nitrógeno varía en dependencia del medio limitante.

Todas las muestras fueron preparadas por triplicado y se esterelizaron durante 20 min a 120 °C en auto-clave.

Obtención del inóculo

El micelio de *Phanerochaete chrysosporium* se obtuvo a partir de la inoculación de sus esporas en erlenmeyers de 500 mL con un volumen de medio de 100 mL de malta al 2 %, con una concentración final de esporas del orden de 10^5 esporas.mL⁻¹. Se incubó a 25 °C y agitación orbital (135 r.min⁻¹). Después de 5 días la densa capa de micelio formada, se separó del medio y trituró con un homogenizador Polytron hasta obtener un medio homogeneizado. A la suspensión resultante se añadió el mismo volumen de solución salina (NaCl 0,8 %). Todas las muestras fueron esterilizadas a 120°C durante 15 minutos.

Se añadieron 10 mL de la suspensión de micelio obtenida en 90 mL de medio (25 % licor negro). Los erlenmeyers fueron dejados a una temperatura de 25°C y 37°C y una agitación de 135 r.min⁻¹, durante 5 días.

Temperatura y composición del medio

Se estudia en primer lugar la temperatura que favorecía en mayor medida la decolorización y detoxificación del licor negro por el *Phanerochaete chrysosporium*. Se realizaron estudios a dos temperaturas diferentes: 25 °C porque correspondía aproximadamente a la temperatura ambiente del laboratorio y además era una temperatura referenciada en algunos trabajos para otros hongos de podredumbre blanca, y 37 °C porque era la más referenciada en la bibliografía y la óptima para el crecimiento del hongo.

Al mismo tiempo se estudió el efecto de la concentración de la fuente de carbono, realizándose los experimentos a 25°C y 37°C en medio limitante de glucosa (experimentos 1 y 3) y medio limitante de nitrógeno (experimento 2 y 4) (Figura 1).

Con el objetivo de decidir las mejores condiciones de operación el *Phanerochaete chrysosporium* fue incubado durante seis días, en erlenmeyers de 500 mL con 90 mL de licor negro diluido al 25 %.

Phanerochaete chrysosporium

CECT 2777

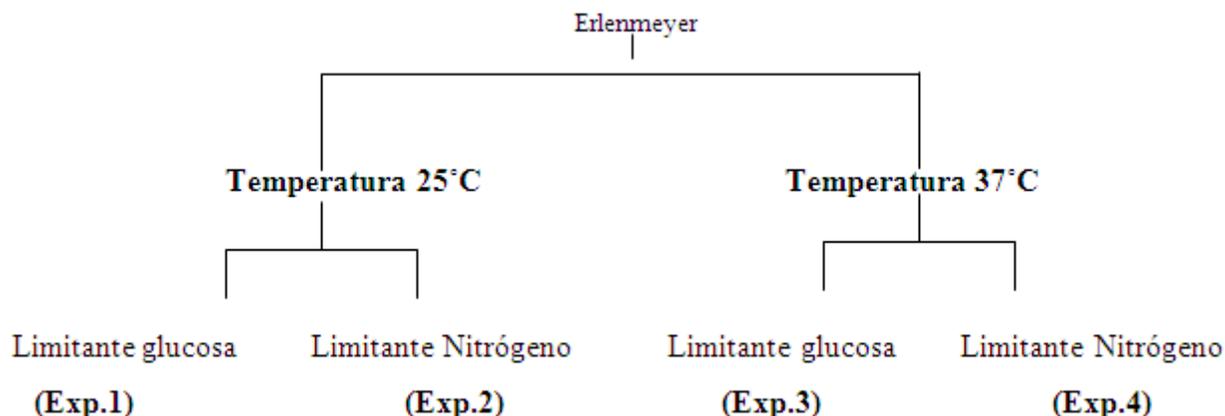


Figura 1. Experimentos con *P. chrysosporium*

Métodos analíticos

La glucosa de la muestra es medida con un analizador de glucosa y lactato model 2700 de Yellow Spring Instrument.

La absorbancia en el espectro ultravioleta a 280 nm en cubetas de cuarzo de 1 cm, se utiliza para indicar la concentración total de compuestos aromáticos. La absorbancia en el espectro visible a 440 nm en cubetas de cuarzo de 1 cm se utiliza como indicador del color. Las muestras de agua residual fueron filtradas y diluidas con tampón tetraborato 0,02 mol.dm⁻³ a pH = 9,1; para obtener absorbancias inferiores a 0,8 unidades.

La Demanda Química de Oxígeno (DQO) se determina de acuerdo al método propuesto por el Standard Methods.¹

La toxicidad se determinó en el Microtox System de Microbics Corporation, basado en el porcentaje de pérdida de la llama emitida por una bacteria bioluminiscente (*Photobacterium phosphoreum*) al ponerla en contacto con una muestra filtrada a pH 7. El valor de la EC₅₀ medida a los 5 minutos y 15 °C representa la concentración efectiva de muestra que causa un 50 % de disminución de la luz emitida. Las reducciones de EC₅₀ se expresan como:

$$(EC_{50\text{final}} - EC_{50\text{inicial}}) / EC_{50\text{inicial}}$$

Pruebas de actividad enzimática

La actividad Manganese Peroxidasa (MnP) fue medida usando una versión^{2,4} modificada del método de Paszcynski et al (1988) para la determinación de MnP donde el 2,6 dimetoxifenol (DMP) es oxidado por la lacasa aun en ausencia de un cofactor. La oxidación por la Manganese peroxidasa (MnP) requiere la presencia de H₂O₂ como cofactor y Mn² catalíticamente activo. La unidad de actividad fue definida en términos del número de micromoles de DMP convertidos en litros por minuto.

La actividad Lignina peroxidasa fue determinada por la oxidación del alcohol veratrílico.¹⁰ La unidad de actividad (AU) fue definida en términos del número de micromoles de alcohol veratrílico convertido por litro por minuto.

Licor negro

El licor negro se obtiene a partir del pulpeo con etanol del bagazo de la caña de azúcar, de una fábrica de papel para corrugar, de la provincia de Cienfuegos, Cuba. Las características de este licor negro se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Características del licor negro proveniente del pulpeo con etanol

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
DQO	7150	Sólidos sedimentables (mg.L ⁻¹)	4,66
PH	7,3	Glucosa (g.L ⁻¹)	0.3
Contenido de etanol (g.L ⁻¹)	4,59	Compuestos Aromáticos	61,5
Sólidos totales disueltos (mg.L ⁻¹)	918	Color	4,85
Sólidos totales suspendidos (mg.L ⁻¹)	< 0,5	Toxicidad (EC ₅₀)	3,28 %

Los licores negros solos no tienen cantidad suficiente de fuentes de carbono y nitrógeno asimilable para permitir el crecimiento, por lo que es necesario suplementar con fuentes adicionales de carbono y nitrógeno. Glucosa y NH₄Cl fueron añadidos al medio para obtener una concentración final de glucosa de 8 g.L⁻¹ y 2,20 g.L⁻¹ de nitrógeno. Un Volumen de 11 mL de medio suplementado y 1,17 g.L⁻¹ de buffer 2,2 dimetilsuccinato fueron añadidos a 85 mL de licor negro diluido. El pH de la solución fue ajustado a 4 y se añadió agua destilada hasta un volumen final de 100 mL; la solución fue esterilizada a 120 °C por 20 minutos.

Resultados y discusión

Con el objetivo de estudiar las mejores condiciones de trabajo de *P. chrysosporium*, se analizaron dos temperaturas (25°C y 37°C). En el trabajo de Lonergan⁷ se evidenció la capacidad degradadora del microorganismo tanto a 37°C como a 25 °C, si bien, en esta última temperatura la velocidad de degradación fue mucho más baja.

La tabla 2 presenta los resultados obtenidos a los 8 días (192 horas) de tratamiento en la reducción de la DQO, la reducción del color, la reducción de los compuestos aromáticos, el consumo de glucosa y el pH, en medio limitante de nitrógeno.

Tabla 2. Valores obtenidos en los experimentos 2 y 4 con 10 g.L⁻¹ de glucosa y 0.286 g.L⁻¹ de nitrógeno iniciales, mostrando las variables estudiadas a los 8 días y el consumo de glucosa y pH a los 4 días

	Temperatura 25 °C	Temperatura 37 °C
Reducción del color,%	31	38,3
Reducción de los compuestos aromáticos,%	25,4	34
Reducción de DQO, %	9	12
Consumo de glucosa en los 4 primeros días	5 g en 4 días	8,5 g en 4 días
Consumo de glucosa a los 8 días	9 g en 8 días	nd
pH al cuarto día	5,24	5,12
pH al octavo día	5,03	nd

nd. No determinada

En los erlenmeyers a 37°C (experimentos 2 y 4) en el medio limitante de nitrógeno a los 4 días ya se había consumido casi la totalidad de la glucosa de los medios (8,5 gramos), lo que corrobora que a 37 °C la velocidad de consumo de sustrato es mayor que a 25 °C.

En las experiencias con el medio limitante de glucosa se siguió un análisis similar al anterior, teniendo en cuenta que la composición del medio es diferente, se comenzó con 8,25 g.L⁻¹ de glucosa y 2,30 g.L⁻¹ de fuente de nitrógeno.

A continuación se muestra la tabla 3 con los resultados obtenidos a los 3 días (72 horas) de tratamiento en la reducción de la DQO, la reducción del color, la reducción de los compuestos aromáticos, el consumo de glucosa y el pH, en medio limitante de glucosa.

Tabla 3. Valores obtenidos en los experimentos 1 y 3 con 8,25 g.L⁻¹ de glucosa y 2,30 g.L⁻¹ de nitrógeno iniciales, mostrando las variables estudiadas a los 3 días

	Temperatura 25 °C	Temperatura 37 °C
Reducción del color,%	20	22,7
Reducción de los compuestos aromáticos,%	16	17,2
Reducción de DQO, %	5,3	8,8
Consumo de glucosa a los 3 días	7,7 g en 3 días	8,25 g en 3 días
pH al tercer día	5,92	5,83

Como se puede observar comprobamos experimentalmente que con *Phanerochaete chrysosporium* creciendo a 37 °C se obtuvieron reducciones de color (38 %), de compuestos aromáticos (34 %) y de DQO (12 %) mejores que cuando crecía a 25 °C y el medio que más favorecía estas reducciones es el medio limitante de nitrógeno (figura 2). Cada vez que nos referimos a experimentos con *P. chrysosporium* estamos hablando que son a 37 °C y en medio limitante de nitrógeno por lo explicado anteriormente.

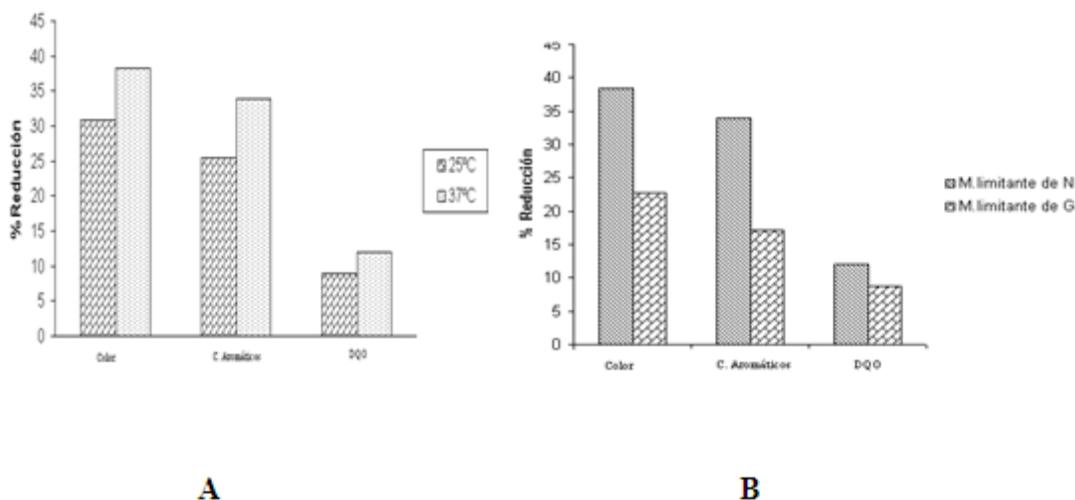


Figura 2. Reducción de color, compuestos aromáticos y DQO en diferentes condiciones de cultivo

A) Medio limitante de nitrógeno a diferentes temperaturas,

B) Resultados a 37 °C en diferentes condiciones de nutrientes

Resulta significativo indicar que el medio donde se obtuvieron los mejores resultados fue el que se encontraba con limitación de nitrógeno, lo que indica que la glucosa juega un papel importante para el crecimiento y desarrollo del hongo, lo cual concuerda con algunos resultados reportados en la literatura. Eaton *et al.* encontraron que la adición de glucosa como sustrato fue necesaria para la decoloración de licores negros utilizando *Phanerochaete chrysosporium*. Roy y Archibald (1993) reportaron que *Trametes versicolor* utilizó glucosa como principal fuente de carbono y energía en un medio que contenía pulpa Kraft.

Rojeck *et al.*⁹ demostraron la influencia del fenómeno de biosorción cuando utilizaron el *P. chrysosporium* para la decoloración de materia orgánica natural, donde sugieren que la biosorción es el proceso de eliminación predominante y que el sistema enzimático ligninolítico juega un rol menor en el mecanismo de eliminación durante los primeros días del cultivo. La sorción ha sido reportada como un paso preliminar en la degradación de la lignina. En general, el comportamiento del pH en los experimentos con *P. chrysosporium* ha sido similar, y se ha podido comprobar en todos los experimentos realizados con este hongo (1, 2, 3 y 4): se comienza con un pH de aproximadamente 5,8 unidades, en las primeras horas del cultivo el

pH asciende hasta 6.5 y vuelve a descender hasta valores cercanos a 5 cuando el cultivo tiene 24 horas aproximadamente y se mantiene alrededor de estos últimos valores, hasta que consume toda la glucosa del medio.

Los resultados expresados en estos experimentos corresponden a un estado inicial de la investigación, por lo que estas condiciones no han de ser definitivas en todos los experimentos que se podrán llevar a cabo posteriormente, pero sí marcan un camino hacia donde dirigir los esfuerzos de las siguientes experiencias con el hongo, sin perder de vista que el objetivo final era conseguir información de la biodegradación de este hongo sobre el licor negro proveniente del pulpeo Organosolv del bagazo de la caña de azúcar para lograr su decoloración.

Conclusiones

1. Los resultados obtenidos en este trabajo con *Phanerochaete chrysosporium* muestran que es factible su utilización en tratamientos biológicos del licor negro del proceso Organosolv del bagazo de la caña de azúcar.
2. Es necesario realizar un estudio de optimización de las condiciones de cultivo de la cepa CECT 2777 de *Phanerochaete chrysosporium* para mejorar los resultados obtenidos en el trabajo.

Bibliografía

1. APHA: Standard Methods for the Examination of water and wastewater. APPA, AWWA and WPCF, Washington, DC., 1985.
2. Field, J.A.: The anaerobic treatment and detoxification of black liquors derived from a non-wood feed stock. Final report of the scholarship MEC. Departament d'Enginyeria Química. Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, España, 1991.
3. González, M.: Impacto global de una tecnología más limpia en la fabricación de papel para ondular. Tesis para optar por el grado científico de Doctor en Ciencias Técnicas. Universidad Central de Las Villas, Cuba, 2004.
4. Kaal, EE.: Jong and J.A. Field: "Estimulation of ligninolytic peroxidase activity by nitrogen in the white rot fungus *Bjerkandera* sp." *Appl Environm Microbiol* 59: 4031-4036, 1993.
5. Kirk, T.K.; E. Schultz; W.J. Connors; L.F. Lorenz and J.G. Zeikus: "Influence of culture parameters on lignin degradation by *P. chrysosporium*." *Arch Microbiol* 117:277-285, 1978.
6. Kortekaas, S.; M. Soto; M.T. Vicent; J.A. Field and G. Lettinga: "Contribution of extractives to methanogenic toxicity of hemp black liquor." *J Ferment Bioeng* 80: 383-388, 1995.
7. Lonergan, G.T.; C.L. Jones and D.E. Mainwaring: "The effect of pH and temperature on radial growth rate and biomass production of selected Australian white-rot fungi in comparison with two strains of *Phanerochaete chrysosporium*." *Materials and Organisms*. 45:104-110, 1994.
8. Paszczynski, A.; R.L. Crawford and V.B. Huynh: "Manganese Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* purification." *Methods enzymol* 161: 264-270, 1988.
9. Rojeck, K.; F.A. Roddick and A. Parkinson: "Decolorisation of natural organic matter by *Phanerochaete chrysosporium*: the effect of environmental conditions." *Water Science and Technology: Water Supply* 4(4):175-182, 2004.
10. Tien, M. And T.K. Kirk: "Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*. Purification, characterization and catalitic properties of a unique H₂O₂-requiring enzyme." *Proc. Natl Acad. Sci USA* 81: 2280-2284, 1984.
11. Zhou, J.L. and C.J. Banks: "The adsorption of humic acid fractions by fungal biomass." *Environ. Technol.*, 12: 519-530, 1991a.