

ENSAYO DE DIFERENTES TIPOS DE BIORREACTORES PARA ESCALAR LA PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA LIGNINOPEROXIDASA EN CULTIVOS SUMERGIDOS DE *Phanerochaete chrysosporium*

ASSAY OF DIFFERENT BIOREACTORS' TYPES TO SCALE THE PRODUCTION
OF THE ENZYME LIGNINOPEROXIDASA IN SUBMERGED CULTURES OF
Phanerochaete chrysosporium

Freimar Segura Sanchez*, Nancy Edilma Mendoza*, Amanda Inés Mejía G*¹.

RESUMEN

El objetivo de éste trabajo es diseñar un bioreactor adecuado para escalar la producción de la enzima lignina peroxidasa (LiP) en cultivos sumergidos del hongo *Phanerochaete chrysosporium*. Se estudiaron tres bioreactores con diferentes características. El primer biorreactor es de tipo tanque con agitación orbital y neumática; los otros dos son tipo columna de burbujeo de una sola etapa que difieren en su material de elaboración (vidrio o polipropileno). La producción de la LiP se logró en los tres fermentadores, pero el sistema que mostró la mayor rata de producción de LiP, es el biorreactor de vidrio tipo columna.

Palabras clave: *Ligninoperoxidasa, Phanerochaete chrysosporium, biorreactor columna de burbujeo.*

SUMMARY

The aim of this work is to design a bioreactor suitable to scale the production of the enzyme lignin peroxidase (LiP) in submerged cultures of the *Phanerochaete chrysosporium* fungus. Three bioreactors with different characteristics are designed. The first biorreactor is a tank-type one with orbital and pneumatic agitation and the other two are column-type reactors (built with glass or polypropylene) with single-stage bubble agitation. Production of LiP is obtained in the three fermentators, but the glass column type bioreactor shows the highest LiP production rate.

Key Words: *Lignin peroxidase, Phanerochaete chrysosporium, bubble column bioreactor.*

¹* Grupo Ciencia de los Materiales, Universidad de Antioquia.

* Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia. Apartado aéreo 1226, Medellín, Colombia.
Dirigir correspondencia a la dirección electrónica: amejia@quimbaya.udea.edu.co

INTRODUCCIÓN

Las enzimas son catalizadores biológicos que hacen posible el funcionamiento de la célula en condiciones ambientales moderadas. Desde el punto de vista tecnológico, las enzimas catalizan la transformación de materias primas a productos con valor agregado, con elevada especificidad y alta eficiencia en la conversión sustrato-producto. Las enzimas son proteínas y están clasificadas dependiendo del tipo de reacción que catalizan en oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas. (Rodríguez, 1996).

Hay algunos factores decisivos en la selección del microorganismo fuente de producción de una enzima. El primero es que el microorganismo sea capaz de dar una alta producción de enzima en el menor tiempo posible de fermentación. En segundo lugar es importante que las enzimas sean extracelulares; se prefieren porque su aislamiento es relativamente simple comparado con el costoso proceso de desintegración de las células que hay que realizar para obtener enzimas intracelulares. Adicionalmente, las cepas no deben producir sustancias tóxicas, deben generar la menor cantidad posible de subproductos interferentes y crecer en nutrientes económicamente viables. Si para la producción de la enzima se requiere de un cofactor, éste debe estar presente en el medio de cultivo (Präve et al, 1987).

La mayoría de las enzimas son producidas en cultivos sumergidos en fermentadores tradicionales. Los factores más importantes en la tecnología de obtención de enzimas son: la posibilidad de alimentación automática con algunos de los constituyentes del medio que se van agotando durante la fermentación y el control automático de los parámetros de la fermentación (Meyrath and Bu'Lock et al, 1977).

Las condiciones óptimas para la cepa seleccionada deben ser determinadas experimentalmente; esto se lleva a cabo primero a escala

de laboratorio y se utilizan frecuentemente cultivos agitados. Sin embargo, éstos tienen la desventaja de que sus valores de pH y la concentración de oxígeno disuelto normalmente no pueden ser controlados. Consecuentemente, sólo la temperatura, la composición de la solución de nutrientes y la suplementación de sustrato óptimas para los cultivos puede ser determinada. La optimización del pH y la concentración de oxígeno disuelto en el medio son generalmente llevadas a cabo en pequeños reactores en el laboratorio, los cuales deben poseer un control de pH y si es posible, una medida de la velocidad de agitación y del flujo de gas (Präve et al, 1987).

El basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* es un hongo filamentoso que produce durante su metabolismo secundario, bajo condiciones limitadas de nitrógeno o carbono un gran número de enzimas oxidativas que se encuentran en el fluido extracelular; entre estas enzimas se encuentra, la lignina peroxidasa (LiP), la manganeso peroxidasa (MnP) y la lacasa (Jiménez y col, 1999), Bajo condiciones adecuadas de temperatura, O₂, agitación y pH; estas enzimas pueden producir a partir de múltiples sustratos, entre ellos el polivinil alcohol (PVOH), compuestos de origen natural que tienen un valor comercial importante como el benzaldehído (Finch et al, 1992) o la vainillina (Mejía et al, 2002). Además, estas enzimas extracelulares obtenidas del hongo son de gran importancia por su alto poder oxidante y su capacidad para degradar muchos compuestos recalcitrantes como clorolignina, pesticidas, colorantes entre otros (Kück, 1995 y Cameron et al, 2000).

En la producción de enzimas en biorreactores a partir de hongos filamentosos, la forma del micelio es importante porque determina el consumo de nutrientes, la aireación y el rendimiento. El micelio filamentoso demanda más en la fermentación que el micelio en forma de pellets. La forma de pellet es preferida porque tiene menores requerimientos energéticos y porque es fácil de remover en los procesos de recu-

peración (Meyrath and Bu'Lock et al, 1977; Jiménez et al, 1997).

El modo de operación de un reactor depende sustancialmente de la estabilidad de la cepa y por lo tanto sólo las cepas que son lo suficientemente estables pueden ser usadas en fermentaciones continuas. Las condiciones de operación son decisivamente afectadas si el organismo es aerobio o anaerobio. En el cultivo de organismos aerobios, siempre debe estar disponible una cantidad adecuada de oxígeno disuelto en el medio y como ésta a veces es muy baja debe ser suplido continuamente.

Para la selección de un biorreactor se deben tener en cuenta requerimientos funcionales y económicos:

Requerimientos funcionales:

- Debe existir una alta transferencia de masa líquido/gas.
- Es necesaria la formación de interfaces líquido/gas, pero sin problemas de espuma.
- Debe haber una adecuada relación de las fases dispersadas (gaseosa, líquida o sólida).
- Se requiere una transferencia de calor razonable.
- Para que haya un adecuado control del volumen de flujo, se deben evitar las zonas muertas y las mezclas de alta viscosidad.
- Se debe prevenir la agregación, pero sin dañar el microorganismo.

Requerimientos económicos:

- Economía, robustez y diseño mecánico simple.
- Fácil de operar bajo condiciones asépticas.
- Buen entendimiento de las características de escalado.
- Flexibilidad razonable con respecto a los requerimientos de varios procesos.

- Operación estable bajo condiciones de fluctuación en el proceso.
- Bajo poder específico de consumo. (Meyrath and Bu'Lock et al, 1977)

Con el fin de aumentar la producción de la enzima LiP obtenida en investigaciones realizadas anteriormente a escala de laboratorio (Mejía, et al, 2002; López et al, 1999; Jiménez y col, 1999), se propone escalar el proceso en volúmenes de 1 litro. Buscando encontrar el sistema más adecuado de crecimiento del hongo y la producción de la enzima, se realizaron varias fermentaciones tipo batch o discontinuas, con diferentes tipos de biorreactores, en cultivos sumergidos del *Phanerochaete chrysosporium*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Bioreactores: Se realizaron seis experimentos para los que se diseñaron 3 tipos de biorreactores (véase figura 1) con diferentes características, que se describen en la tabla 1.



Figura 1. 1. Biorreactor tipo tanque. 2. Tipo columna de burbujeo de una sola etapa (polipropileno). 3. Tipo columna de burbujeo de una sola etapa (vidrio).

Tabla 1. Características de los biorreactores utilizados en los diferentes experimentos.

Características	Biorreactores		
	Ensayo 1 y 2	Ensayo 3 y 4	Ensayo 5 y 6
Tipo	Tanque.	Columna de burbujeo de una sola etapa ⁴ .	Columna de burbujeo de una sola etapa.
Material	Vidrio	Polipropileno de mediana densidad	Vidrio Pyrex®
Capacidad	4 litros	2 litros	1.5 litros
Diámetro	16 cm	8 cm	6 cm
Altura	25 cm	40 cm	60 cm
Agitación	Orbital ¹ – neumática	Neumática	Neumática
Difusor de aire	Aireador de asa interna de salida múltiple ² .	Membrana polimérica porosa ⁵	Membrana de vidrio porosa ⁷
Control de espuma	Antiespumantes	Dispositivo mecánico ⁶	Dispositivo mecánico
Volumen de aire inyectado	300 mL / min ³	300 mL / min	750 mL / min ⁸

¹ En un agitador orbital Heidolph Unimax 2010 a 150 rpm durante el primer ensayo y a 80 rpm en el segundo.

² (Luis y col, 1994), de 7 cm de diámetro y 23 de altura, ubicado 2 cm por encima de la base del fermentador.

³ Aire estéril suministrado por 4 bombas de aire Elite 799 pump.

⁴ (Präve et al, 1987).

⁵ Ubicada en la parte inferior del biorreactor, de 7cm de diámetro, y que termina cónicamente hasta un tubo de vidrio de 1 cm de diámetro por el cual entraba el aire.

⁶ Para el control de la espuma se utilizó un método mecánico ubicado en la parte superior del biorreactor, que estaba conformado por un motor Matsushita SF80 Fan Motor de 12 V y 125 mA de 1200 rpm y por un eje de 30 cm de largo, que transmitía la fuerza de rotación a un aspa de pasta dura situada a 2 cm por encima de la superficie del líquido.

Se hicieron ensayos para seleccionar el eje más adecuado con tubos de plástico, de cobre y de vidrio; y con aspas tipo hélice de tres y cuatro palas, y se eligió finalmente como mejor opción el eje de vidrio de 8 mm de diámetro y el aspa tipo hélice de cuatro palas para los ensayos siguientes.

Para el acople del aspa con el eje se realizaron varias pruebas. Inicialmente se utilizó un tornillo adherido al eje que pasaba por el centro del aspa retenida por 2 tuercas. Posteriormente se realizó con un pegante extra fuerte, y finalmente con silicona en barra que fue la opción elegida para posteriores ensayos.

⁷ Ubicado en la parte inferior del biorreactor, de 4 cm de diámetro y una extensión cónica, que termina con un tubo de vidrio de 6 cm de largo y 1 cm de diámetro para la entrada de aire.

⁸ Aire estéril proporcionado por 2 compresores para acuario Elite 802 Pump.

★ En la parte superior de los biorreactores se acopló un tapón de caucho adaptado para la toma de muestras y la entrada del aireador para los ensayos 1 y 2; y para la entrada del eje en los cuatro ensayos siguientes.

Esterilización de los biorreactores: antes del bioproceso, los biorreactores se trataron con una solución de hipoclorito de sodio al 0.25% por 48 horas; luego se trataron con una solución de fenol al 3% por 15 minutos, posteriormente con una de etanol al 70% por 15 minutos y finalmente fueron enjuagados con 500 mL de agua estéril. Los aditamentos para la entrada de aire y el control de espuma se esterilizaron de manera similar.

El aire inyectado se pasó previamente por filtros de 0.45 mm estériles.

Todos los experimentos fueron realizados con un volumen de 1 litro de fluido de expresión, a temperatura ambiente y con control del pH.

Microorganismo y condiciones de cultivo: Se utilizó la cepa *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 (ATCC 24725) replicada en medio YMPG, el cual contiene por cada 100 mililitros: extracto de levadura 1 g, extracto de malta 1 g, peptona bacteriológica 0.2 g, glucosa 1 g, asparagina 0.1 g, KH_2PO_4 0.2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g; tiamina clorhidrato 1 mg y agar 2 g. Se esterilizó y se colocó en cajas de Petri estériles; la cepa se replicó sobre este medio e incubó a 37°C por 5 días y se mantuvo a 4°C (Tien *et al*, 1983; Glenn *et al*, 1983).

Composición del medio de expresión enzimática: Se preparó el fluido de expresión enzimático que contenía por cada 100 mililitros: glucosa 1 g; tartrato de amonio 0.02 g; KH_2PO_4 0.2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g; Tween 80 0.05 g; tiamina HCl 0.1 mg; alcohol veratrílico 2,5 mM y solución de elementos traza 7 ml. Un litro de la solución de elementos traza contiene: ácido nitriloacético 1,5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 3 g; NaCl 1 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g; $\text{AlK}(\text{SO}_4) \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g; HBO_3 0,01 g; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g; $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1g.)

Se le adicionó 0.1 % p/v de PVOH de peso molecular nominal entre 20.000 y 180.000 g/

mol, con un grado de hidrólisis del 99.5 %. El fluido se llevó a pH 4.5 con solución reguladora de tartrato de sodio 20 mM (Penninckx y Jiménez, 1996).

Preparación de la solución de esporas: Al biorreactor estéril se le adicionaron 1000 mL de fluido de expresión esterilizado por filtración a través de filtros de 0.45 mm, y una suspensión de esporas de la cepa recién replicada en tween 80 al 0.1 % hasta una concentración final entre 15×10^4 y 20×10^4 esporas/ml (Jiménez *et al*, 1997).

Actividad enzimática y seguimiento del bioproceso: Durante los seis ensayos se tomaron muestras dos veces por día, las cuales fueron filtradas por 0.45 mm. Se le realizaron los siguientes análisis:

- Alícuotas de 2 mL del filtrado se llevaron a pH=2 con solución de HCl 6 N, se extrajeron con acetónitrilo-diclorometano (90:10) y a una alícuota de los extractos orgánicos se les realizó un scan entre 400 y 200 nm en un espectrofotómetro Cary 50 Bio UV-Visible. Se compararon con scans realizados a soluciones estándares de vainillina, ácido vainillínico y alcohol veratrílico.
- A una alícuota de las muestras filtradas se les determinó actividad enzimática de la ligninoperoxidasa (LiP) modificando el método descrito por Jiménez y col (1999). Se mezcló entre 200 y 500 μL del fluido extracelular en una cubeta de cuarzo de 900 μL , se adicionó entre 300 y 600 μL de buffer de tartrato de sodio 0.150 M de pH 3.0 necesarios para completar 800 μL , dependiendo de la cantidad usada de fluido; se adicionó 50 μL de alcohol veratrílico 10 mM y se inició la reacción con la adición de 50 μL de peróxido de hidrógeno (25 μL en 25 μL recientemente preparado), monitoreando inmediatamente el cambio en la absorbancia a $\lambda=310$ nm. La cantidad de LiP requerida para oxidar 1 mmol de alcohol veratrílico por minuto se define como una unidad. El coeficiente de

absortividad molar es $\epsilon=9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. También se podría monitorizar la actividad de la LiP con el método descrito por Arora et al (2001).

Pruebas específicas para cada ensayo

Para los ensayos 1 y 2: Se tomaron 10.0 ml de muestra del biorreactor dos veces al día durante 15 días para el ensayo 1 y 27 días para el ensayo 2. Las muestras se filtraron por membrana de $0.45 \mu\text{m}$ prepesadas y se determinó el peso seco del micelio secando los filtros prepesados a 40°C en estufa de vacío hasta peso constante.

Al terminar los ensayos, todo el contenido del biorreactor fue filtrado, se llevó a $\text{pH}=2$ con $\text{HCl } 6 \text{ N}$, y se extrajo con acetonitrilo-diclorometano (90:10), los extractos orgánicos se rotaevaporaron a 50°C y se les realizó un scan entre 400 y 200 nm.

Para los ensayos 3 y 4: Se tomaron 5.0 mL de muestra del biorreactor dos veces al día, durante 11 días para el ensayo 3 y durante 23 días para el ensayo 4; se les determinó la turbidez por UV-VIS a 650 nm.

Para los ensayos 5 y 6: Se tomaron 5.0 mL de muestra dos veces al día, durante 13 días para el ensayo 5 y durante 35 días para el ensayo 6.

El tiempo de duración de cada ensayo se determinó de acuerdo a los cambios que se iban presentando en el biorreactor (aparición y olor del fluido de expresión, estado del hongo, resultados obtenidos, etc.) con los cuales se concluyó la viabilidad de cada ensayo.

Alícuotas del ensayo 6 fueron precipitadas con metanol grado reactivo, pasadas por filtros especiales para solventes orgánicos de $0.45 \mu\text{m}$ previamente pesados. Al residuo se le realizó un espectro IRTF en un Spectrum RXI FT-IR System Perkin Elmer, con el fin de observar los cambios en la estructura del PVOH.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los ensayos 1 y 2 donde se utilizó un biorreactor con un gran diámetro y se empleó agitación orbital, se observó que el hongo creció en forma de pellets. Algunos de ellos tenían un gran tamaño, dificultando la toma homogénea de muestras. Por tanto, la biomasa representada en estas muestras no era homogénea y por ello los puntos en los gráficos de crecimiento dan muy variables, pero en general presentan una tendencia creciente.

Comparando los dos ensayos realizados en este biorreactor, los pellets del primero fueron más pequeños y por tanto más susceptibles a la desintegración debido a la alta agitación orbital usada (150 rpm); en el segundo ensayo se disminuyó esta velocidad a 80 rpm para evitar este problema, ya que la morfología y el tamaño del hongo depende en gran parte del tipo de agitación y de su intensidad (Podgornik et al, 2001). En este segundo experimento los pellets obtenidos fueron de mayor tamaño y más homogéneos. Las curvas de crecimiento respectivas se observan en la figura 2.

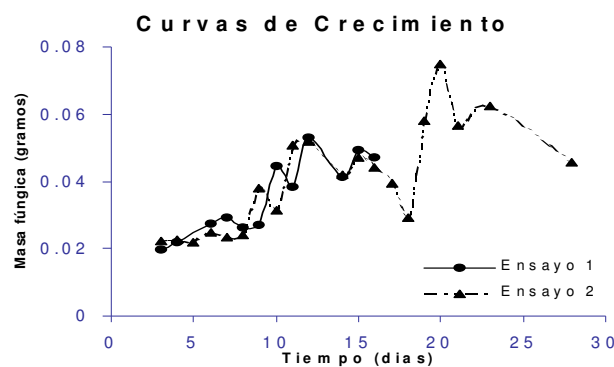


Figura 2. Curvas de crecimiento obtenidas como peso seco del micelio a partir de alícuotas de 10 ml de fluido.

En cuanto a la actividad de la LiP, la máxima actividad enzimática se observó el día 16 para el primer ensayo (18.00 U/l) y el día 23 para el segundo ensayo (24.96 U/l). Sin embargo la

actividad tuvo mucha variación durante el tiempo de experimentación, que pudo deberse al tamaño de los pellets, ya que a mayor tamaño, menor superficie de contacto y de intercambio de oxígeno con los nutrientes y aumenta la dificultad para la liberación de los metabolitos al medio extracelular, entre ellos la enzima. También debido a las características del biorreactor, no se logró un intercambio adecuado ni homogéneo del aire con el fluido de expresión, ya que por su amplitud las burbujas no alcanzaban a distribuirse por todo el tanque ni tenían tiempo suficiente para la transferencia del oxígeno, porque el aireador estaba ubicado muy cerca de la superficie del líquido. Además por problemas ocasionados por el exceso de espuma que genera demasiados puntos muertos en las paredes del biorreactor y puede provocar problemas de pérdida de biomasa y de fluido y generar contaminación. Y por último debido a la ineficacia de los antiespumantes ya que al poco tiempo de adicionados permitían de nuevo la formación de gran cantidad de espuma.

Para los ensayos 3 y 4 se modificó el tipo de biorreactor, porque el usado en los dos primeros por su amplio diámetro y por su forma, tenía muchos puntos muertos, no permitía una buena superficie de intercambio entre las burbujas de aire y el medio líquido y por tanto se presentaba una oxigenación deficiente de los pellets. En este modelo de biorreactor con un diámetro más reducido, no se utilizó agitación orbital, porque se supone que no tendrá los problemas descritos previamente, ya que el suministro de aire es suficiente tanto para la oxigenación del medio como para mantener una agitación homogénea del mismo. Se monitoreó el aumento en la turbidez como método indirecto para determinar el crecimiento del micelio, debido a que el cambio de forma del biorreactor y el tipo de agitación originaron un crecimiento sin pellets. No se logró obtener una correlación entre el crecimiento del micelio y la turbidez, debido tal vez a las variaciones en el flujo de aire inyectado ocasionado por frecuentes interrupciones eléctricas, y la falta de agitación

neumática durante las interrupciones permitió la adhesión del hongo a la membrana porosa, lo que condujo a pérdida de turbidez del medio y por lo tanto no se observó una tendencia de crecimiento lineal.

Para el tercer y cuarto ensayo, el polipropileno del biorreactor, los aditamentos utilizados para el control de la espuma (ejes, tuercas, tornillos) y la membrana polimérica porosa (hechos con materiales no inertes) interactuaron con el medio, produciendo cambios en sus características físicas y químicas, que se observaron en el cambio del olor, la morfología y color del micelio y del fluido y se confirmaron en los análisis de actividad enzimática y en los barridos UV-VIS. La máxima actividad enzimática se observó al noveno día con valores de 6.36 U/l y 9.46 U/l respectivamente. La actividad tuvo mucha variación durante el tiempo de experimentación posiblemente porque al estar el micelio adherido a la membrana porosa situada en la base del biorreactor y crecer en forma filamentosa, la superficie de intercambio entre el hongo y el medio fue muy pequeña dificultándole la toma de nutrientes, lo que se reflejó en un crecimiento más lento, en una menor producción de biomasa (Meyrath and Bu'Lock et al, 1977) y en una menor liberación de LiP.

Para los ensayos 5 y 6 se diseñó otro tipo de biorreactor más inerte para evitar los problemas descritos anteriormente, al cambiarse los materiales poliméricos y metálicos por materiales de vidrio. En este sistema además, se mejoró la aireación del medio al aumentarse el volumen de aire inyectado de 300 mL/min a 750 mL/min. Al tener éste un diámetro menor que el modelo anterior, la columna de líquido es mayor permitiendo más tiempo de intercambio entre las burbujas y el medio, mejorando así la oxigenación y garantizando una agitación neumática más adecuada sin tantos puntos muertos.

En la morfología de crecimiento del hongo no se observaron cambios significativos con relación a los observados en los ensayos 3 y 4, por-

que básicamente ambos biorreactores eran del tipo columna de burbujeo de una sola etapa y su difusor de aire era una membrana porosa que permitió la fijación del micelio sobre ella, lo que originó un crecimiento aglomerado filamentososo.

En cuánto a la actividad de la LiP obtenida en los ensayos 5 y 6 (véase figura 3), la máxima concentración de esta enzima se observó al cuarto día (10.79 U/l) para el ensayo 5 y al día 30 (43.22 U/l) para el ensayo 6.

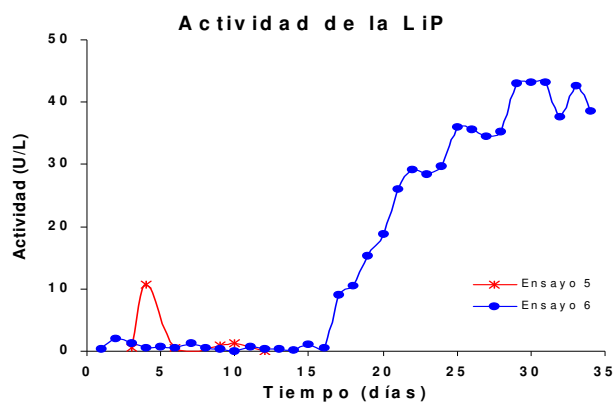


Figura 3. Actividad de la enzima ligninoperoxidasa.

En este modelo de biorreactor la actividad enzimática fue más estable y aumentó gradualmente, pero el metabolismo secundario del hongo se retrasó (máxima actividad de la LiP el día 30) si se compara con los resultados obtenidos en otros estudios (Alzate y col, 2001) donde la máxima actividad enzimática se presentó entre el octavo y el décimo día de los experimentos. El aumento del tiempo del metabolismo primario se debió al desarrollo del micelio en forma aglomerada, porque con esta morfología el hongo sólo crece en los extremos de los filamentos; la toma de oxígeno y nutrientes es menor y esto se refleja finalmente en una baja tasa de crecimiento (Meyrath and Bu'Lock et al, 1977).

En ninguno de los scan realizados en los ensayos 1 a 5, se pudo observar señales caracterís-

ticas que determinaran la presencia de vainillina o de ácido vainillínico; sólo se observaron picos característicos del alcohol veratrílico y algunos corrimientos de los mismos.

Para el ensayo 6, en los scan obtenidos, se observó un aumento progresivo de bandas características que indican la formación de compuestos fenólicos (a $\lambda=280$ y 310 nm) que resultaron a partir de la biodegradación del PVOH. (Véase figura 4).

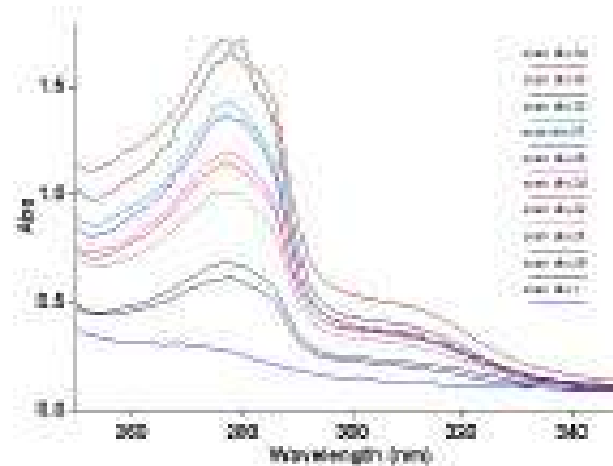


Figura 4. Análisis por espectroscopía UV entre 250 y 400 nm característicos de compuestos fenólicos.

El PVOH al servir como sustrato de la LiP, estabilizó el sistema permitiendo un aumento gradual de la producción de la enzima durante todo el ensayo. La utilidad del PVOH como sustrato se comprobó por IR, donde se observó el cambio en la longitud e intensidad de sus bandas características, que evidencian modificaciones en la naturaleza química del polímero especialmente una disminución de los grupos $-OH$ por la oxidación de los mismos, la formación de grupos carbonilo y de insaturaciones $C=C$, similares a las descritas con más detalle en un estudio anterior realizado por Alzate y col (2001).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos hasta ahora, permiten concluir que el escalamiento del proceso exige un cuidadoso diseño del biorreactor, con el control estricto de todas las variables, ya que los resultados obtenidos fueron diferentes en los 6 ensayos realizados.

Por la factibilidad económica que tiene el biorreactor utilizado en los ensayos 5 y 6 y por la estabilidad en la producción de la LiP observada en el ensayo 6, se puede concluir que de los tres sistemas diseñados, este es el más adecuado para continuar estandarizando las variables y optimizando el proceso para mejorar la obtención de la LiP.

Para tratar de mejorar la producción de la LiP, es necesario buscar acelerar el metabolismo del hongo con el fin de aumentar su tasa de crecimiento para que su producción enzimática se inicie en el menor tiempo posible; esto se puede lograr si se aumenta el área superficial de intercambio entre el micelio y el medio, mediante la inmovilización sobre un material sólido e inerte que permita mayor contacto entre el hongo y los nutrientes del fluido de expresión. Ejemplos de esta técnica fueron realizados por Leatham et al (1995), G. Feijoo et al (1994) y Couto et al (2001).

Si se quiere mejorar aún más la producción enzimática, podría agregársele al medio aserrín de pino porque en trabajos anteriores no publicados (Segura et al, 2000), se comprobó que la presencia de éste, estabiliza el sistema y aumenta la cantidad de enzima producida, debido a que la lignina del aserrín actúa como inductor para la enzima ligninoperoxidasa haciendo que ésta se libere en mayor cantidad. (Huttermann et al, 2001).

Para mantener estables los niveles de enzima se podría realizar la fermentación como un proceso discontinuo hasta que el microorganismo se encuentre en su metabolismo secundario, para luego convertirlo en un proceso continuo agregándole diariamente pequeñas cantidades de fluido de expresión, garantizándole al hongo un tiempo de vida mayor y un metabolismo secundario con presencia de enzima durante más tiempo.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Universidad de Antioquia por la financiación de este trabajo de investigación, al grupo de investigación de sustancias bioactivas por permitirnos utilizar el equipo IRTE, a los laboratorios de la facultad de Química Farmacéutica por facilitarnos equipo instrumental y reactivos, y a la estudiante de maestría Carolina Arboleda por su valiosa colaboración.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Rodríguez A.** "Procesos Biotecnológicos en Alimentos, Programa de Doctorado en Ingeniería" Universidad del Valle. Cali, Febrero 5 - 16 de 1996. Capítulo 3: 27-32.
2. **Präve, P., Faust U., Sittig W. and Sukatsch D. A.** Fundamentals of biotechnology. VCH Verlagsgesellschaft mbH. Federal Republic of Germany, 1987. Capítulo 6: 476, 180, 208.
3. **Meyrath and Bu'Lock,** Biotechnology and fungal differentiation FEMS Symposium N°. 4. Academic Press INC. LTDA. London 1977. p 167, 138, 186.
4. **Finch C.A.** Ed. Polyvinyl alcohol. Developments. Chapter 1, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 19. J. Wiley & Sons, London, England, 1992.
5. **Mejía G. Amanda Inés; López O. Betty Lucy; Alzate Jans and Hess Michael.** Bioconversion of poly (vinylalcohol) -PVOH- to vanillin in a *Phanerochaete chrysosporium* culture medium. Sometida a publicación en Research Material Innovations, 2002.
6. The Mycota II, Genetics and Biotechnology. Kück (Ed), Springer-Verlag Berlin Heiderlberg, 1995. Chapter 18: 302-319

7. **Cameron MD, Timofeevski S, Aust SD.** Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. *Applied Microbiology & Biotechnology*. **54**(6):751-758, **2000**.
8. **Jiménez T, Gloria A. Penninckx, Michel and Lejeune, Robert.** The relationship between pellet size and production of Mn (II) peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium* in submerged culture. *Enzyme and Microbial Technology*, **21**, 537-542, **1997**.
9. **López O. Betty L.; Mejía G. Amanda, Sierra G. Ligia** «Study of the Biodegradability of poly (vinyl alcohol)». *Polymer Engineering and Science*, **39** (8), 1346-1352, **1999**.
10. **Jiménez T., G. A. ; Mejía G, A. I. & López O, B. L.** "Actividad de las enzimas ligninolíticas del *Phanerochaete chrysosporium* y su variación con la adición de Mn²⁺". *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* **23** (89): 587-594., **1999**.
11. **L. Luis, J. C. González, T. K. Martino, S. Tirado, J. Alonso, S. Pujada y X. Robaina.** Estudio de biorreactores con agitación por enjambre de burbujas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas. Cuba*, **25**, (1-2-3), 21. **1994**.
12. **Tien M. & Kirk T. K.** Lignin degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* burds. *Science*. **221**: 661-663. **1983**.
13. **Glenn J. K; Morgan M. A. ; Mayfield M. B.; Kuwahara M. & Gold M. H.** An extracelular H₂O₂ requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys.* **114**: 1077-1083. **1983**.
14. **Penninckx M. & Jiménez G. A.** Transformación microbiológica de la biomasa. Curso teórico práctico. Université Libre de Bruxelles and Universidad de Antioquia. Medellín, abril 22-27. **1996**.
15. **Arora D. S., Gill P. K.** Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase. *Enzyme & Microbial Technology*. **28** (7-8): 602-605, **2001**.
16. **Podgornik H, Podgornik A, Milavec P and Perdih A.** The effect of agitation and nitrogen concentration on lignin peroxidase (LiP) isoform composition during fermentation of *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biotechnology*. **88** (2):173-176, **2001**.
17. **Alzate J. H., Arbeláez C. A., Mejía A. I. y López B. L.** Caracterización del polivinilalcohol (PVOH) en medios de disolución complejos. *Vitae*, **8** (1-2), 47-54. **2001**.
18. **Leatham Gary F., Himmel Michael E.** Enzymes in biomass conversion. University of winsconsin at Madison. United States. **1995**. Chapter 18: 225 -235.
19. **G. Feijoo, C. Dosoretz and J. M. Lema.** Production of lignin peroxidase from *Phanerochaete chrusosporium* in a packed bed bioreactors with recycling, *Biotech. Techniques* **8** (5), 363-368, **1994**.
20. **Couto S. R., Ratto M., Domínguez A., Sanroman A.** Strategies for improving ligninolytic enzyme activities in semi-solid-state bioreactors. *Process Biochemistry*. **36** (10): 995-999, **2001**.
21. **Segura F.** Obtención y aislamiento de los extractos enzimáticos del *Phanerochaete chrysosporium* por cromatografía líquida de alta resolución y comparación y seguimiento de la actividad enzimática de la ligninoperoxidasa producida por el hongo cultivado en un medio de cultivo sumergido sin aserrín y en un medio enriquecido con aserrín. Proyecto de las Prácticas en el Área de Farmoquímica, Semestre I-2000. Profesor asesor : Amanda Inés Mejía.
22. **Huttermann A., Mai C., Kharazipour A.** Modification of lignin for the production of new compounded materials. *Applied Microbiology & Biotechnology*. **55** (4):387-394, **2001**

Fecha de recibo: Julio 30 de 2002

Fecha de Aceptación: Octubre 29 de 2002