

---

# Tecnologías enzimáticas para la eliminación de compuestos de baja solubilidad en agua

Gemma M. Eibes, M. Teresa Moreira, Gumersindo Feijoo y Juan M. Lema.

Dept. de Ingeniería Química. Universidad de Santiago de Compostela. Avda. Lope Gómez de Marzoa, s/n.  
15782 Santiago de Compostela.

---

*Enzymatic technologies for the removal of poorly soluble compounds*

*Tecnologies enzimàtiques per a l'eliminació de compostos de baixa solubilitat en aigua*

*Recibido: 17 de septiembre de 2007; aceptado: 22 de abril de 2008*

## RESUMEN

La presencia de compuestos recalcitrantes en efluentes, suelos y sedimentos es un problema medioambiental de especial relevancia. Los compuestos de baja solubilidad tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) tienen una alta persistencia ya que, debido a sus propiedades físico-químicas, su degradación por las bacterias autóctonas se ve limitada. Con el objetivo de desarrollar un sistema capaz de llevar a cabo la degradación de estos compuestos, se ha planteado la utilización de los hongos ligninolíticos o bien sus enzimas oxidativas. La enzima manganeso peroxidasa (MnP) promueve la oxidación de  $Mn^{+2}$  a  $Mn^{+3}$ , el cual actúa como un poderoso agente oxidante que oxida compuestos orgánicos recalcitrantes de forma inespecífica. La degradación de compuestos de baja solubilidad mediante la enzima MnP requiere la adición de un agente que incremente la solubilidad del compuesto a fin de facilitar la acción de la enzima. En este trabajo se plantea la adición de disolventes miscibles e inmiscibles como alternativas para incrementar la solubilidad de un HAP modelo tal como el antraceno de cara a su degradación enzimática.

**Palabras clave:** Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Biodegradación. Reactores enzimáticos. Manganeso peroxidasa. Disolventes.

## SUMMARY

The presence of recalcitrant compounds in effluents, soils and sediments is a relevant environmental problem. Poorly soluble compounds, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), have high persistence to natural bacterial degradation due to their physico-chemical properties. Aiming to develop a system capable of degrading these compounds, the use of ligninolytic fungi or their oxidative enzymes has been proposed. The enzyme manganese peroxidase (MnP) promotes the oxidation of  $Mn^{2+}$  to  $Mn^{3+}$ , which acts as a powerful oxidative agent, oxidizing recalcitrant organic compounds in a non-specific way. The degradation of poorly soluble compounds by MnP requires the addition of any agent which increments

their solubility, in order to facilitate the action of the enzyme. In this work, the addition of miscible and immiscible solvents is proposed, as alternatives to increment the solubility of anthracene, as a PAH model compound, for its enzymatic degradation.

**Key words:** Polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation. Enzymatic reactors. Manganese peroxidase. Solvents.

## RESUM

La presència de compostos recalcitrants en efluentes, sòls i sediments és un problema mediambiental d'especial relevància. Els compostos de baixa solubilitat, com són els hidrocarburs aromàtics policíclics (HAPs), tenen una alta persistència ja que, donades les seves propietats físico-químiques, la seva degradació pels bacteris autòctons es veu limitada. Amb l'objectiu de desenvolupar un sistema capaç de portar a terme la degradació d'aquests compostos, es planteja la utilització dels fongs ligninolítics o bé dels seus enzims oxidatius. L'enzim manganès-peroxidasa (MnP) promou l'oxidació de  $Mn^{+2}$  a  $Mn^{+3}$ , que al seu torn actua com un poderós agent oxidant que oxida compostos orgànics recalcitrants de forma inespecífica. La degradació de compostos de baixa solubilitat mitjançant l'enzim MnP requereix l'addició d'un agent que incrementi la solubilitat del compost per tal de facilitar l'acció de l'enzim. En aquest treball, es planteja l'addició de dissolvents miscibles i immiscibles com a alternatives per incrementar la solubilitat d'un HAP model com l'antracè de cara a la seva degradació enzimàtica.

**Mots clau:** Hidrocarburs aromàtics policíclics. Biodegradació. Reactors enzimàtics. Manganès-peroxidasa. Dissolvents.

---

\* Tel. 981 56 31 00, ext.: 16740 - Fax 981 52 80 50  
e-mail: gemma.eibes@usc.es

## 1. HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

Los compuestos recalcitrantes son, en muchos casos, un peligro para el medioambiente, siendo considerados un riesgo para la salud humana y animal. Son especialmente persistentes los compuestos con baja solubilidad en agua y alta hidrofobicidad, tales como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs). Los HAPs de tres o más anillos aromáticos presentan altos coeficientes de reparto octanol-agua,  $K_{ow}$ , lo cual indica que tienden a adsorberse en partículas sólidas y acumularse en organismos<sup>(1)</sup>. Algunos HAPs presentan propiedades carcinogénicas, mutagénicas y teratogénicas agudas, pudiendo producir tumores en algunos organismos, incluso en pequeñas dosis<sup>(3)</sup>. La presencia de estos compuestos se ha incrementado paulatinamente en los últimos 100-150 años debido al alto consumo de combustibles fósiles, de ahí la particular atención que se viene prestando a los mismos<sup>(2)</sup>. El origen de estos compuestos puede ser natural o antropogénico (Tabla 1). En la naturaleza, uno de sus orígenes se relaciona con la pirólisis de la madera y biomasa a alta temperatura. Otro proceso natural ocurre durante la formación de combustibles fósiles, tales como depósitos de carbón y petróleo, como resultado de la diagénesis (calentamiento a temperatura moderada de la materia orgánica durante un período significativo de tiempo)<sup>(4)</sup>. El origen antropogénico se deriva fundamentalmente de la creciente industrialización, encontrándose como parte de mezclas en hollín, creosota, alquitrán de carbón, petróleo, etc.

## 2. PROCESOS CONVENCIONALES PARA LA ELIMINACIÓN DE HAPs

En general cuanto mayor el peso molecular del hidrocarburo aromático, mayor su hidrofobicidad, toxicidad y persistencia. Otro factor que influye en la persistencia del HAP es su «edad» en el suelo o sedimento, porque la molécula puede permanecer en micrositios inaccesibles dentro de la matriz sólida y por lo tanto se vea limitada su biodegradabilidad<sup>(6)</sup>. Además, la asociación de los HAPs con otros co-contaminantes tales como metales es otro factor que puede incrementar su persistencia en el ambiente<sup>(6)</sup>. Como tratamientos terciarios se utilizan procesos físicos tales como adsorción en carbón activo o membranas para obtener un efluente de alta calidad. Aunque son procesos muy efectivos, su implementación se ve limitada debido a

altos costes de ejecución y operación<sup>(7,8)</sup>. También se aplican los denominados procesos de oxidación avanzada, que son tratamientos químicos de efluentes que comprenden ozonización, tratamiento con peróxido de hidrógeno, luz UV y combinaciones de estos procesos<sup>(9-11)</sup>. Como ya se ha mencionado anteriormente, los HAPs se encuentran adsorbidos a materia orgánica presente en suelos y sedimentos. Los tratamientos más utilizados para su eliminación consisten en su estabilización y enterramiento en vertederos, incineración y las denominadas técnicas de biorremediación. La biorremediación puede definirse como cualquier proceso que utiliza biocatalizadores tales como microorganismos, plantas o enzimas para recuperar zonas contaminadas a su condición original. Se considera que esta tecnología es respetuosa con el medioambiente y económicamente viable. En la Tabla 2 se presentan las distintas tecnologías utilizadas en procesos de biorremediación así como las ventajas y desventajas que presentan.

### 2.1. Biorremediación con hongos de podredumbre blanca

Los hongos de podredumbre blanca difieren de otros microorganismos en su capacidad de mineralizar todos los componentes de la lignina (polímero polifenólico heterogéneo) a dióxido de carbono y agua. Su nombre proviene de la apariencia de la madera atacada por estos hongos. Las enzimas extracelulares producidas por estos hongos tienen una amplia especificidad y están involucradas en la transformación y mineralización de contaminantes orgánicos estructuralmente similares a la lignina. Las enzimas extracelulares que pueden secretar estos hongos comprenden tres peroxidases (lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y peroxidasa versátil) y una fenoloxidasa (lacasa).

En los últimos años se han realizado muchos experimentos para evaluar la capacidad oxidativa de los hongos de podredumbre blanca<sup>(12,13)</sup>. Los primeros trabajos demostraron el potencial oxidativo de *Phanerochaete chrysosporium* para eliminar compuestos recalcitrantes<sup>(14)</sup>, mientras que las investigaciones posteriores se han centrado en la capacidad de diferentes hongos de podredumbre blanca para eliminar tanto HAPs ligeros como pesados y la correlación con la producción de enzimas ligninolíticas<sup>(15-18)</sup>. Hasta la fecha, la mayor parte de los trabajos realizados en este campo tratan con cultivos fúngicos a escala laboratorio en medios contaminados artificialmente. Por el contrario, existen muy pocos trabajos sobre degradación de compuestos presentes en suelos reales<sup>(19,20)</sup> o tecnología *in situ*<sup>(21)</sup>.

TABLA I  
Posibles orígenes de los hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Natural	Antropogénico			
	Procesos domésticos	Procesos industriales		
Volcanes	Tabaco	Plantas energéticas	Plantas de celulosa	Hornos coque
Descomposición de materia orgánica	Barbacoas	Productores de aluminio	Cracking catalítico de petróleo	Plantas de asfalto (HMA)
Depósitos de petróleo y carbón	Emisiones de automóviles	Calderas industriales	Producción de carbón	Fundición de hierro
Incendios de bosques y maleza	Calefacción doméstica	Hornos eléctricos	Conservación madera	Incineradoras municipales

**TABLA II**

**Principales características de las diferentes tecnologías de biorremediación.**

Tecnología	Ejemplos	Beneficios	Limitaciones	Factores a considerar
<i>In situ</i>	Biorremediación <i>in situ</i> Bioestimulación Bioventeo Bioaumentación	Efectivos económicamente No invasivos Relativamente pasivos Atenuación natural Se tratan suelos y aguas	Restricciones ambientales Tiempos de tratamiento elevados Dificultades de monitorización	Capacidad biodegradativa de los microorganismos autóctonos Presencia de metales e inorgánicos Parámetros ambientales Degradabilidad de contaminantes Solubilidad química Factores geológicos Distribución de contaminantes
<i>Ex situ</i>	Landfarming Compostaje Biopilas	Efectivos económicamente Bajo coste Pueden realizarse <i>on site</i>	Requerimiento de espacio Tiempos de tratamiento altos Necesita controlar pérdidas abióticas Problemas de transferencia de materia Limitación de biodisponibilidad	Ver arriba
Biorreactores	Reactores slurry Reactores en fase acuosa	Cinéticas de eliminación rápidas Parámetros ambientales optimizados Transferencia de materia superior Uso efectivo de inóculos y tensioactivos	Excavación de suelos Alto coste de capital Relativamente alto coste operacional	Ver arriba Bioaumentación Toxicidad de aditivos Concentración tóxica de contaminantes

En estos trabajos se vio que la baja disponibilidad de los HAPs actuó como factor limitante para la biodegradación, por lo que es común utilizar surfactantes o disolventes para incrementar la.

### 3. DISPONIBILIDAD DE LOS HAPs

Los surfactantes son moléculas que comprenden una fracción hidrofílica y otra hidrofóbica, formándose, por encima de la concentración crítica micelar, agregados de 10 a 200 moléculas que se llaman micelas. Se consideran dos mecanismos que explicarían el aumento de disponibilidad en presencia del surfactante: i) se incrementa la solubilidad del compuesto debido a la parte hidrofóbica de las micelas; ii) se favorece el transporte del compuesto a la fase acuosa, probablemente debido a la reducción de la tensión interfacial o a la interacción del contaminante con moléculas individuales de surfactante<sup>(22)</sup>.

En muchos trabajos se ha demostrado que la presencia de surfactante no-iónicos favoreció la degradación de los HAPs debido a una mayor biodisponibilidad<sup>(22-24)</sup>. Sin embargo, otros autores encontraron que determinados tensioactivos producían el efecto contrario, por lo que inhibían la biodegradación<sup>(25-27)</sup>. Se señala como hipótesis que el microorganismo no tiene acceso al HAP en la fase micelar o que el tensioactivo podría ser utilizado por microorganismos como fuente de carbono o, incluso, presentar cierta toxicidad.

La utilización de disolventes orgánicos es otra alternativa para incrementar la solubilidad de sustancias hidrofóbicas en varios órdenes de magnitud. Como potenciales desventajas se destaca la complejidad inherente al proceso, el incremento de costes, la necesidad de reciclado del disolvente, la poca experiencia en el tema y la toxicidad potencial del disolvente. Se ha planteado una correlación inversa entre el carácter hidrofóbico del disolvente, expresado por el logaritmo del coeficiente de reparto entre octanol y agua ( $\log K_{ow}$ ) y la toxicidad<sup>(28, 29)</sup>. Se considera que los disolventes con  $\log K_{ow}$  entre 1 y 5 son altamente tóxicos por su efecto devastador en las membranas celulares.

La tecnología y las características del sistema vendrán determinadas por el tipo de disolvente que se utilice: miscibles o inmiscibles. Los sistemas monofásicos se basan en la utilización de disolventes miscibles para incrementar la solubilidad de substratos poco solubles, reduciendo así las limitaciones por transferencia de materia. Este tipo de sistema se ha utilizado tanto con bacterias como hongos resultando en velocidades de reacción superiores. Los incrementos aritméticos de concentración de disolventes miscibles incrementan de modo logarítmico la solubilidad del HAP<sup>(30)</sup>. Sin embargo, la cantidad de disolvente a utilizar se ve limitada por la toxicidad del mismo en el microorganismo. Como ejemplo, concentraciones superiores al 20 % de acetona o etanol, tuvieron un efecto inhibitorio en el crecimiento y acción del hongo de podredumbre blanca *Bjerkandera sp BOS55*<sup>(16)</sup>. Sin embargo, concentraciones entre 11-21 % (v/v) incrementaron la degradación de antraceno por un factor de 2-3, completándose la degradación de 10 mg/L tras 4 días.

Los sistemas bifásicos consisten en dos fases inmiscibles: orgánica y acuosa. La fase orgánica transfiere el sustrato tóxico a la fase acuosa en concentraciones sub-inhibitorias, permitiendo incrementar la transferencia de materia de substratos poco solubles en agua<sup>(31, 32)</sup>. El sistema es auto-regulable, ya que el transporte del contaminante a la fase acuosa se rige por el coeficiente de reparto entre las dos fases y la velocidad de consumo del cultivo<sup>(33)</sup>. La degradación de HAPs en reactores bifásicos se llevó a cabo con cultivos bacterianos puros o mixtos<sup>(34-38)</sup>. Como ejemplo, un cultivo de *Sphingomonas aromaticivorans* permitió la degradación completa de 4 HAPs a una velocidad de 90 mg/L-h en un reactor bifásico<sup>(39)</sup>. Por otro lado, no existen referencias de degradación en sistemas bifásicos con hongos de podredumbre blanca.

### 4. PROCESOS ENZIMÁTICOS

La utilización de enzimas en tecnologías medioambientales presenta ciertas ventajas con respecto a la utilización de microorganismos:

- i) Las enzimas pueden ser activas bajo una gran variedad de condiciones, tales como pH, fuerza iónica o temperatura;
- ii) Pueden mantenerse concentraciones elevadas de contaminante sin darse inhibición enzimática;
- iii) Se reducen los tiempos operacionales y se eliminan los períodos de latencia debido al crecimiento microbiano;
- iv) La composición del medio es más sencilla y los requerimientos enzimáticos son bajos, si la enzima puede ser recuperada;
- v) El control del proceso es más simple;
- vi) No se producen lodos.

Por el contrario, las principales limitaciones que tienen que considerarse para favorecer la eficacia del proceso son el coste de la producción de la enzima y su inestabilidad debido a cambios en condiciones ambientales.

La enzima que se utilice para la degradación de compuestos recalcitrantes debería presentar un elevado potencial de oxidación y de ionización, así como una acción inespecífica, lo cual permitiría degradar no sólo un compuesto en particular, sino una gran variedad de ellos, tal como los que se presentan en suelos o efluentes contaminados. Teniendo en cuenta que la interacción de la enzima y el sustrato podría verse limitada por el tamaño del biocatalizador, sería deseable el uso de enzimas que difundan fácilmente o que actúen a través de mediadores. Además, es preferible el uso de enzimas extracelulares debido a que su producción es más sencilla y económica. La enzima ligninolítica MnP cumple todas estas características, y por esto se ha venido utilizando en procesos *in vitro* para la eliminación de compuestos recalcitrantes. La utilización del crudo enzimático en lugar de la enzima purificada es un requerimiento necesario en la aplicación en ingeniería ambiental, debido al alto coste que supondrían los procesos de purificación<sup>(40)</sup>.

#### 4.1. Degradación *in vitro* de contaminantes mediante MnP

El primer paso para una aplicación con éxito del proceso enzimático, es conocer el comportamiento del biocatalizador, con respecto a los cofactores y cosubstratos implicados en el ciclo catalítico. MnP presenta un ciclo catalítico similar a otras peroxidadas, involucrando una oxidación de 2 electrones. Sin embargo, MnP es única en su capacidad de oxidar Mn<sup>2+</sup>. El ciclo comienza mediante una oxidación de la forma férrica por medio de una molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de manera que se genera una forma oxidada de la enzima (compuesto I), con un estado de oxidación dos niveles superior a la forma nativa, y una molécula de agua. El compuesto I se reduce posteriormente por medio de la oxidación de Mn<sup>2+</sup>, generándose Mn<sup>3+</sup> y el compuesto II, en un estado de oxidación superior al de la enzima original. Por último, se produce una nueva reducción de la enzima hasta recuperar la forma férrica. Esta nueva reducción implica la oxidación de otro Mn<sup>2+</sup> a Mn<sup>3+</sup>. El compuesto II, en exceso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, da lugar a una forma inactiva de la enzima (compuesto III). Los iones Mn<sup>3+</sup> son inestables en medio acuoso, si bien pueden estabilizarse en presencia de ácidos orgánicos tales como oxálico y malónico, y el complejo Mn<sup>3+</sup>-ácido orgánico así formado actúa como un fuerte agente oxidante (1,54 V) de bajo peso molecular y de fácil difusión.

Las enzimas ligninolíticas, y entre ellas MnP, se han venido utilizando para la eliminación *in vitro* de compuestos orgánicos, xenobióticos y contaminantes industriales, tales como tintes, fenoles, HAPs, insecticidas o compuestos nitroaromáticos, así como para el biopulpeo y bioblanqueo en la industria de papel<sup>(12,41)</sup> (Tabla 3).

En el caso específico de compuestos de baja solubilidad acuosa, la degradación *in vitro* presenta la necesidad de algún compuesto que haga más disponible el sustrato a

la enzima. La utilización de disolventes, surfactantes y micelas reversas son los sistemas más ampliamente utilizados para reducir las limitaciones de transferencia de materia en reactores enzimáticos.

Desde un punto de vista clásico, es difícil visualizar enzimas catalizando reacciones en presencia de disolventes orgánicos, porque tradicionalmente su adición se realizaba para la precipitación o desnaturalización de la proteína. Esta noción simplística es errónea, ya que numerosas enzimas, incluyendo lipasas, esterases o deshidrogenadas funcionan en ambientes hidrofóbicos naturales<sup>(42)</sup>, y por tanto, no es sorprendente que las enzimas puedan ser catalíticamente activas en sistemas con disolventes orgánicos. La catálisis enzimática en disolventes orgánicos se ha desarrollado ampliamente en las últimas décadas, abriendo un nuevo campo de aplicaciones biotecnológicas de los biocatalizadores<sup>(42,43)</sup>. La utilización de estos sistemas presenta como mayor ventaja una mayor solubilidad del contaminante hidrofóbico y, aunque se considera una alternativa prometedora para los procesos de descontaminación, la mayor parte de los trabajos de catálisis enzimática en presencia de disolventes se refieren a enzimas hidrolíticas<sup>(42-46)</sup>. La utilización de enzimas más complejas, tales como las ligninolíticas, que requieren co-sustratos y cofactores específicos para completar el ciclo catalítico, es un campo muy poco explorado<sup>(47)</sup>.

El presente trabajo se centra en el tratamiento enzimático de un compuesto recalcitrante de baja solubilidad en agua, seleccionando un HAP, antraceno, como compuesto modelo. El principal objetivo de esta investigación es la utilización de disolventes orgánicos en reactores enzimáticos para incrementar la disponibilidad del HAP y por tanto, su degradación por MnP. Se han utilizado dos tecnologías para este tratamiento: la primera consiste en un reactor monofásico con mezclas disolvente miscible: agua y la segunda trata con reactores bifásicos, en presencia de un disolvente inmiscible en agua.

## 5. REACTORES ENZIMÁTICOS MONOFÁSICOS

La utilización de disolventes miscibles en agua presenta como ventaja que no existen limitaciones difusionales en el medio, puesto que se trata de un sistema monofásico. Otra ventaja de este sistema radica en que se evita la contaminación por microorganismos, ya que disolventes con valores de log K<sub>ow</sub> comprendidos entre 1,5 y 4 se consideran altamente tóxicos<sup>(48)</sup>. Por otro lado presenta una serie de limitaciones, como la recuperación del disolvente para

TABLA III

Degradación *in vitro* de contaminantes orgánicos mediante la enzima manganeso peroxidasa.

Tóxico	Especie	Referencia
TNT	<i>Nematoloma forwardii</i>	58
	<i>Phlebia radiata</i>	59
Organocloruros	<i>P. chrysosporium</i>	60
Efluente planta blanqueo	<i>P. chrysosporium</i>	61
Tintes sintéticos	<i>B. adusta</i>	62
	<i>P. chrysosporium</i>	
	<i>B. sp BOS55</i>	63, 64
HAPs	<i>P. chrysosporium</i>	15, 65-67
	<i>N. forwardii</i>	68

una posible reutilización o para evitar su presencia en el efluente, que sería posible mediante procesos de separación del tipo evaporación u otras técnicas similares. Además, la retención de la enzima en el reactor es importante en la operación en continuo, por lo que habría que considerar un método físico (membranas) o químico (inmovilización) para evitar pérdidas de enzima en el efluente. La primera etapa para considerar la degradación de antraceno en medios con disolventes miscibles es la selección del disolvente y la concentración a utilizar<sup>(48)</sup>. En primer lugar se preseleccionaron 4 disolventes por su disponibilidad, coste y seguridad: etanol, metanol, acetona y metil-etil-cetona. Los factores que se tuvieron en cuenta para la selección final del disolvente más adecuado fueron: i) solubilidad de antraceno en las mezclas con distintas cantidades de agua:disolvente a las temperaturas de trabajo y ii) estabilidad de la enzima en esas mezclas. Este último factor es crucial en la operación en reactores enzimáticos monofásicos, y se ha visto que los disolventes hidrofílicos tienen una mayor tendencia a retirar agua vinculada a la molécula de enzima y, por lo tanto, dan lugar a mayor inactivación enzimática<sup>(49)</sup>.

En la Tabla 4 se muestran las concentraciones de disolvente necesarias para disolver 1, 10 y 100 mg/L de antraceno a 20 y 30 °C. Todos los disolventes permitieron disolver la totalidad de antraceno añadido (1,25 g/L) en concentraciones de 100 %. El disolvente que produjo una mayor solubilización fue metil-etil-cetona, pero a concentraciones superiores a 30 % (v/v) se producía una separación de fases. El metanol fue el disolvente que disolvió en menor medida antraceno y en general ambos alcoholes fueron peores que las cetonas en términos de incremento de solubilidad de antraceno.

Teniendo en cuenta las concentraciones de disolvente necesarias para disolver 10 mg/L de antraceno a 20 °C, se estudió la inactivación de la enzima procedente de *Bjerkandera sp. BOS55* en esas mezclas (Figura 1). Se observó que el disolvente que provocó una mayor inactivación de la enzima fue el metanol, lo que coincide con otros estudios, y resultó ser el disolvente más hidrofílico (log  $K_{ow}$ : -0,72). De entre los 4 disolventes estudiados, se seleccionó acetona a 36 % (v/v) ya que incrementa la solubilidad del antraceno 143 veces y por su baja interacción con el crudo enzimático (a esa concentración de acetona, la enzima se mantenía estable en incubaciones de 24 h). Además, concentraciones de acetona tan elevadas como el 90 % v/v sólo producían una leve inactivación de la enzima, al contrario de lo que se podría presuponer, ya que tras 22 h se mantuvo el 90 % de la actividad inicial.

Una vez seleccionado el disolvente se llevó a cabo la optimización del proceso de degradación de antraceno en reactores en discontinuo durante 2 h<sup>(48)</sup>. Se evaluó el efecto de parámetros que afectan al ciclo catalítico (tales como  $H_2O_2$ , ácido orgánico y  $Mn^{2+}$ ) y parámetros ambientales

(tales como temperatura, presencia de oxígeno y luz). En el caso de los parámetros relacionados con el ciclo catalítico, tal como se muestra en la Tabla 5, se vio que el peróxido de hidrógeno y el ácido orgánico tenían un efecto doble. Por un lado concentraciones altas favorecían una degradación mayor, pero por otro lado, producían una pérdida de actividad mayor. El coste mayor de los reactores enzimáticos suele estar asociado al coste de la enzima, y por eso es muy importante mantener la estabilidad del catalizador para lograr la viabilidad de la operación del reactor enzimático. Por este motivo, para tener en cuenta el coste asociado al biocatalizador, se definió la eficacia como la relación de cantidad de sustrato eliminado por unidad de enzima inactivada. La combinación de la eficacia, junto con una minimización del consumo de reactivos, se utilizó para la selección de las condiciones más favorables para la degradación de antraceno.

De los parámetros ambientales, la temperatura tuvo una mayor influencia en la eficacia, puesto que temperaturas altas daban lugar a una inactivación rápida de la enzima. La presencia de una atmósfera de oxígeno también favoreció la degradación de antraceno. Los experimentos en discontinuo permitieron optimizar el proceso, obteniendo una degradación total de 5 mg/L de antraceno tras 6 h de operación con las siguientes condiciones: 5  $\mu\text{mol/L}$ -min de  $H_2O_2$ , 20 mM de malonato sódico, 20  $\mu\text{M}$  de  $Mn^{2+}$ , a temperatura ambiente, atmósfera de oxígeno y con luz (Figura 2a). En ausencia de atmósfera de oxígeno y las mismas condiciones anteriormente descritas, se alcanzó una degradación casi completa tras 8 h de reacción (Figura 2b). Si se comparan estos datos de degradación con los obtenidos por otros autores en condiciones similares (Tabla 6), se observa una notable mejora en la velocidad de degradación, que es todavía mayor si se compara con experimentos en los cuales se prescindía de mediador, en los que la velocidad es 4,6 veces mayor<sup>(50)</sup>.

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos discontinuos se seleccionaron los parámetros operacionales más adecuados para la degradación de antraceno en continuo, pero previamente se estudiaron distintas estrategias de operación, *fed-batch* y semi-continuo, para realizar un ajuste de la cinética del proceso. El reactor enzimático en continuo, con un tiempo de residencia de 12 h, se operó a distintas velocidades de adición de enzima, comprobándose que la actividad dentro del reactor fue determinante en la extensión de degradación (Figura 3). El reactor se operó por más de 100 h, obteniendo una eliminación del 90 % en la última etapa de operación, coincidiendo con la mayor actividad enzimática dentro del reactor. En cuanto a la cinética del proceso, ésta se ajustó a un mode-

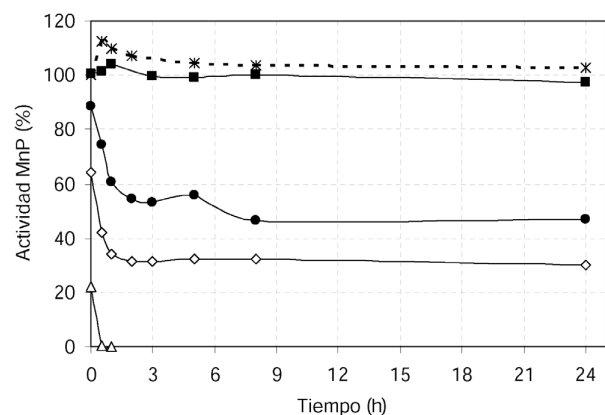
**TABLA IV**

Concentración de disolvente necesaria para mantener disuelto 1, 10 y 100 mg/L de antraceno a 20 °C.

Disolvente	Concentración de disolvente (%)		
	1 mg/L	10 mg/L	100 mg/L
MEK	17	27*	ND
Acetona	21	36*	53
Etanol	31	44*	64
Metanol	37	55*	76

ND: determinado

\*Concentraciones utilizadas en posteriores experimentos.



**Figura 1.** Estabilidad de la enzima MnP en mezclas disolvente: agua. Símbolos: \* control sin disolvente; ■ 36 % acetona; ● 27 % metil-etil-cetona; ◇ 44 % etanol; ▲ 55 % metanol.

**TABLA V**

Efecto de la modificación de los parámetros involucrados en el ciclo catalítico de MnP sobre la degradación de antraceno en reactores monofásicos.

Malonato (mM)	Mn <sup>2+</sup> (μM)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (μM/min)	Veloc. degradación (μM/h)	Veloc. pérdida actividad (U/L-h)	Eficacia (μmol/U)
1	100	25	1,23	57	0,022
1	100	5	1,37	23	0,059
1	100	1	0,43	8	0,056
1	20	5	1,41	30	0,047
10	20	5	4,12	61	0,068
20	20	5	5,81	70	0,083
30	20	5	5,87	76	0,077

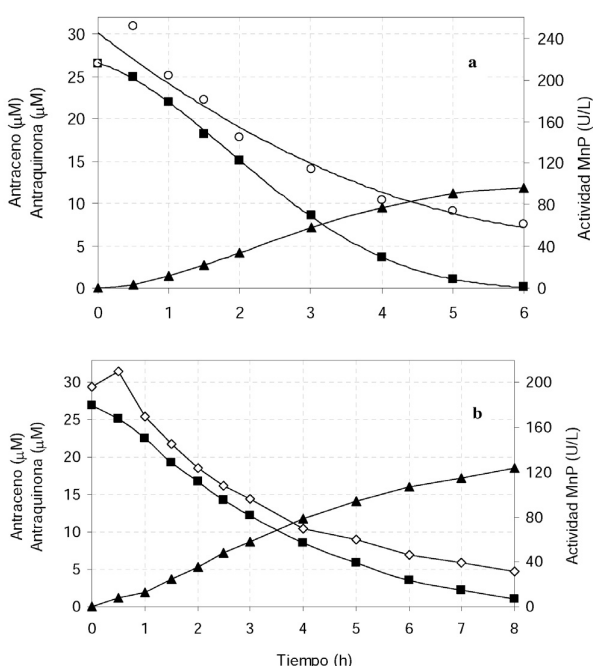


Figura 2. Degradación completa de antraceno (■), formación de antraquinona (▲) y actividad MnP (○) en un experimento en discontinuo en presencia de atmósfera de oxígeno (a) y en ausencia de la misma (b).

**TABLA VI**

Comparación de estudios de degradación de antraceno mediante MnP en medios con disolventes miscibles en agua

Disolvente	Agente mediador	Veloc degradación.	Referencia
40 % acetona	-	0,96	50
5% DMF*	-	0,33	69
5% DMF	-	0,70	68
5% DMF	5 mM GSH <sup>†</sup>	1,15	69
5% DMF	5 mM GSH	2,34	68
36% acetone	-	4,40	48

\* dimetil-formamida

† glutatión

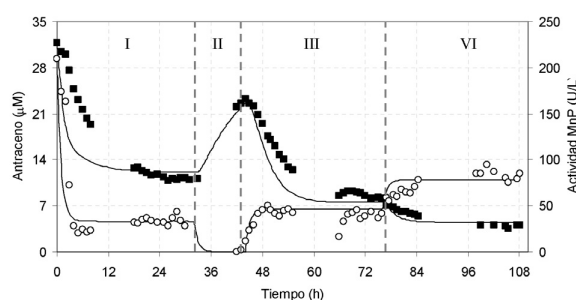


Figura 3. Ajustes (—) y datos experimentales de antraceno (■) y actividad MnP (○) en un reactor en continuo durante cuatro etapas con distintas velocidades de adición de enzima: I) 36 U/L-h; II) sin adición; III) 50 U/L-h; IV) 75 U/L-h.

lo de primer orden con respecto al sustrato, una función autocatalítica con respecto a los productos de oxidación y una función sigmoïdal con respecto a la concentración de enzima presente en el reactor (Ecuación 1).

$$r_s = \left( a + \frac{b}{1 + c \cdot \exp(-d \cdot E)} \right) \cdot (e + f \cdot P) \cdot S \quad \text{Ec. 1}$$

La pérdida de actividad se ajustó a un modelo de primer orden tal como se ha descrito tradicionalmente en bibliografía<sup>(51-53)</sup>. Con respecto a la enzima se vio que actividades enzimáticas por debajo de 100 U/L limitaban en gran medida la eficacia de degradación. Sin embargo, actividades por encima de ese valor, no producían ninguna mejora notable en la degradación. El ajuste, tanto del perfil de antraceno como la actividad enzimática durante las cuatro etapas del reactor en continuo se muestra en la Figura 3.

## 6. REACTORES ENZIMÁTICOS BIFÁSICOS

Los reactores bifásicos constan de una fase orgánica inmisible en agua, en la que se encuentra el contaminante en la concentración deseada, y de una fase acuosa en la que se encuentra la enzima así como los cosubstratos y cofactores necesarios para completar el ciclo catalítico (Figura 4). El disolvente sirve como depósito de antraceno, y se transfiere el mismo a la fase acuosa mediante un equilibrio termodinámico. Allí se produce la catálisis enzimática, oxi-

dando antraceno presente en el medio acuoso. Una de las ventajas de la operación de reactores bifásicos fue que se logró operar con cantidades mayores de contaminante que en el reactor monofásico, puesto que la solubilidad de antraceno en el disolvente puro es mucho mayor que en la mezcla acetona:agua. Además es posible la recuperación y posterior reutilización de la enzima, así como del disolvente, evitando así un problema medioambiental.

En primer lugar se seleccionó el disolvente más apropiado para la operación del reactor bifásico. Un disolvente adecuado debe presentar las siguientes características: poco soluble en agua, baja volatilidad e inerte para la enzima, es decir, que no se oxide por la acción del catalizador. Además, el coeficiente de reparto de antraceno en cada disolvente y la interacción de la enzima con el disolvente son otros factores clave. En primer lugar, para seleccionar el disolvente más adecuado, se evaluó el coeficiente de reparto de antraceno entre disolventes inmiscibles en agua de diferente naturaleza: aceites minerales, aceites vegetales, alcoholes, hidrocarburos, etc. De entre 15 disolventes evaluados se seleccionaron dos para un posterior estudio: el de menor coeficiente de reparto (aceite de silicona  $\log K_{sw}=3,7$ ) y el de un coeficiente intermedio (dodecano  $\log K_{sw}=4,5$ ). Se evitaron los coeficientes de reparto elevados porque en esos casos el antraceno está presente en grandes cantidades en la fase orgánica, lo cual prolongaría de forma excesiva el tiempo de tratamiento e incluso podría tener un efecto negativo sobre la degradación al encontrarse el compuesto de forma preferente y en gran medida en la fase orgánica<sup>(37, 54)</sup>.

A continuación, se estudió la inactivación de la enzima provocada por el contacto con el disolvente a distintas velocidades de agitación. Al aumentar la agitación se aumenta el área de interfase de la enzima con el disolvente, provocando, en muchos casos, una mayor inactivación enzimática<sup>(55)</sup>. De ambos disolventes, aceite de silicona fue el que provocó una menor inactivación sobre la enzima para todas las velocidades de agitación (7, 61 y 138 U/L-h para 400, 600 y 800 rpm, respectivamente) de modo que se seleccionó para los experimentos posteriores.

Del mismo modo que para los reactores monofásicos, se optimizaron los factores implicados en el ciclo catalítico de la enzima:  $H_2O_2$ , ácido orgánico y pH (Figura 5)<sup>(56)</sup>. De entre las velocidades de adición de  $H_2O_2$ , 5  $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$  fue la seleccionada para alcanzar mayor eficacia, velocidad coincidente con la aplicada en reactores monofásicos. Sin embargo, en estos experimentos se vio que el pH aumentaba notablemente. Para evitar este aumento de pH y favorecer una mayor estabilidad enzimática, se incrementó la concentración del tampón, malonato sódico, hasta 66 mM. Sin embargo, la estabilidad sólo fue posible cuando se procedió al control de pH a 4,5 mediante la adición de ácido malónico, aumentándose la eficacia en este caso un 53 %. Llegados a este punto podría compararse la velocidad media de degradación obtenida en reactores bifásicos con respecto a la de reactores monofásicos, observando que en el primer caso es inferior a los resultados en presencia de disolventes miscibles (2,36 y 4,40  $\mu\text{M/h}$ , respectivamente). La limitación podría deberse a una insuficiente transferencia de materia desde la fase orgánica a la acuosa, condicionando, de ese modo, la velocidad de degra-

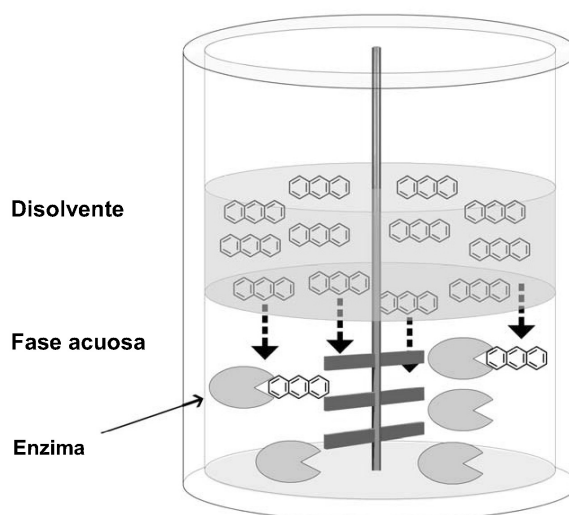


Figura 4. Esquema de un reactor enzimático bifásico para la degradación de antraceno, así como los procesos físico-químicos implicados.

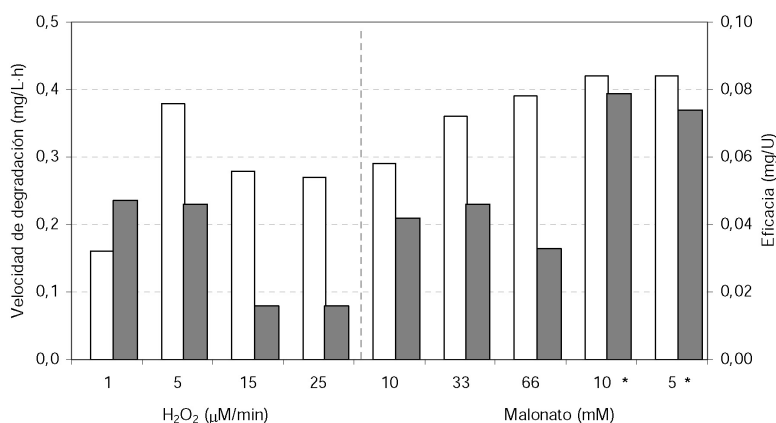


Figura 5. Efecto de la modificación de la velocidad de adición de  $H_2O_2$  y concentración de malonato sódico a pH libre y controlado (\*) sobre la velocidad de degradación de antraceno (barras blancas) y la eficacia (barras grises) en reactores bifásicos.

dación enzimática. Tal como se describe en bibliografía, la transferencia de materia se ve favorecida cuanto mayor la superficie de contacto, controlando, en muchos casos, la velocidad de degradación en reactores bifásicos<sup>(34, 57)</sup>. El área interfacial se define según la Ecuación 2:

$$a = \frac{6 \cdot \varphi}{d_{sm}} \quad \text{Ec. 2}$$

Por lo tanto, se lograría aumentar el área interfacial, bien incrementando la fracción de disolvente ( $\varphi$ ) o bien disminuyendo el diámetro de las gotas ( $d_{sm}$ ), que podría hacerse por un aumento de la velocidad de agitación.

Se realizó un diseño de experimentos para evaluar el efecto de la agitación y la fracción de disolvente, y para ello se consideraron velocidades de agitación entre 200 y 300 rpm (agitaciones menores no producían emulsión, y superiores, del orden de 400 rpm, daban lugar a una inactivación de la enzima casi inmediata)<sup>(56)</sup>. El incremento de ambos

factores tuvo un efecto positivo sobre la degradación de antraceno debido a que se aumentó el área interfacial y por lo tanto su difusión, pero por otro lado afectó negativamente a la actividad (Tabla 7). La eficacia de degradación fue óptima para un 30% de aceite de silicona y 300 rpm: 0,243 mg/U (Figura 6). Experimentos sobre la línea de ascenso no incrementaron la eficacia, debido a que la pérdida de actividad se vio incrementada pero sin mejorar la degradación de antraceno.

Finalmente se modeló el comportamiento del reactor bifásico para la oxidación enzimática de antraceno. Inicialmente, se determinaron los coeficientes de transferencia de materia, en experimentos a distintas agitaciones (50 a 300 rpm) y fracción de disolvente (10-30 %) y en ausencia de enzima. A partir de los resultados se obtuvo una correlación empírica de forma sigmoïdal para cada fracción de disolvente y agitación, de modo que los máximos coeficientes de transferencia de materia se hallaban entre 200 y 300 rpm, coincidente con la formación de la emulsión en el reactor. Una vez conocidos los coeficientes de transferencia de materia, la aplicación de los correspondientes balances a la fase orgánica y la acuosa permitió obtener los parámetros cinéticos y por lo tanto, se obtuvo el modelo que ajustó el comportamiento del reactor bifásico para cada condición de fracción de disolvente y velocidad de agitación. La cinética se ajustó a una ecuación de primer

orden y autocatalítica con respecto a los productos, tal como se describió anteriormente en los reactores monofásicos. Las constantes cinéticas se obtuvieron por un ajuste de mínimos cuadrados a partir de los experimentos en discontinuo, con lo que se pudo modelar y predecir la concentración de antraceno para distintas condiciones de agitación y de fracción de disolvente. En la ecuación cinética se evitó la incorporación de un término enzimático debido a que en los experimentos se mantuvo la actividad enzimática por encima de 100 U/L, por lo que la degradación no se vio limitada por la enzima. La figura 6 muestra el ajuste del modelo propuesto a los datos experimentales obtenidos a 300 rpm y con 30 % de disolvente.

## CONCLUSIONES

Este trabajo presenta dos tecnologías de carácter innovador y de amplia aplicación en el campo medio-ambiental. La utilización de reactores monofásicos con disolventes miscibles para la degradación de compuestos poco solubles ya había sido presentada por otros autores, si bien la investigación se basaba principalmente en la determinación de los substratos oxidados por la enzima, sin realizar la optimización del proceso. La optimización de la degradación de antraceno mediante MnP logró resultados de degradación superiores a los obtenidos por otros autores. En el caso de los reactores enzimáticos bifásicos se presentó un esquema innovador, puesto que hasta el momento sólo se conocían reactores microbianos bifásicos para la degradación de compuestos poco solubles, y los reactores enzimáticos existentes se centraban en procesos de síntesis de compuestos orgánicos. Las ventajas que presenta este sistema, tales como la posibilidad de reutilización del disolvente y/o de la enzima, lo hacen muy atractivo para la aplicación a otros compuestos poco solubles y de carácter recalcitrante.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la Xunta de Galicia (PGI-DIT06PXIB265088PR) y el Ministerio de Educación y Ciencia (CICYT- CTQ2007-66788/PPQ). Gemma Eibes quiere mostrar su gratitud al Ministerio de Ciencia y Tecnología por su financiación (BES-2002-2809).

TABLA VII

Coeficientes de regresión del diseño de experimentos 2<sup>2</sup> factorial para las tres funciones objetivo (F.O.) consideradas

F. O.	b <sub>0</sub> *	b <sub>1</sub>	b <sub>2</sub>	b <sub>12</sub>
Velocidad de degradación	0,969	0,333	0,337	0,239
Velocidad de inactivación	6,24	1,26	NS	NS
Eficacia	0,152	0,026	0,054	0,026

\* b<sub>0</sub>: ordenada en el origen, b<sub>1</sub>: coeficiente de regresión de la velocidad de agitación, b<sub>2</sub>: coeficiente de regresión de la fracción de disolvente, b<sub>12</sub>: coeficiente de regresión de la interacción de la velocidad de agitación y fracción de disolvente

NS: no significativo

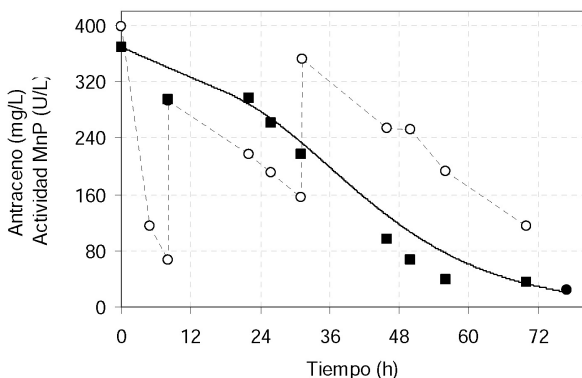


Figura 6. Perfiles de antraceno (■) y actividad enzimática (○) durante la operación de un reactor con 30 % de aceite de silicona y a una velocidad de agitación de 300 rpm. El ajuste del perfil de antraceno al modelo propuesto se muestra mediante la línea continua.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1). Slooff, W. *et al.* Integrated criteria document: PAHs. 1989, National Institute of Public Health and Environmental Protection: Bilthoven, *The Netherlands*, p. 114.
- (2). Cerniglia, C.E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, 3(2-3): p. 351-368 (1992).
- (3). Eisler, R. Polycyclic aromatic hydrocarbon hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review. 1987, United States Fish and Wild Service: Washington D.C. p. 81.
- (4). Blumer, M. Polycyclic aromatic compounds in nature. *Scientific American*, 234(3): p. 35-45 (1976).
- (5). Hatzinger, P.B. and M. Alexander. Effect of aging of chemicals in soil on their biodegradability and extractability. *Environmental Science & Technology*, 29(2): p. 537-545 (1995).
- (6). Bamforth, S.M. and I. Singleton. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80: p. 723-736 (2005).



- <sup>(7)</sup>. Alonso, E. *et al.* On the feasibility of urban wastewater tertiary treatment by membranes: a comparative assessment. *Desalination*, 141(1): p. 39 (2001).
- <sup>(8)</sup>. Walters, R.W. and R.G. Luthy. Equilibrium adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons from water onto activated carbon. *Environmental Science & Technology*, 18(6): p. 395-403 (1984).
- <sup>(9)</sup>. Nadarajah, N. *et al.* Enhanced transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons using a combined Fenton's reagent, microbial treatment and surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(4): p. 540 (2002).
- <sup>(10)</sup>. Mokrini, A.; D. Oussi and S. Esplugas. Oxidation of aromatic compounds with UV radiation/ozone/hydrogen peroxide. *Water Science and Technology*, 35(4): p. 95-102 (1997).
- <sup>(11)</sup>. Butkovic, V. *et al.* Reaction rates of polynuclear aromatic hydrocarbons with ozone in water. *Environmental Science & Technology*, 17: p. 546-548 (1983).
- <sup>(12)</sup>. Pointing, S. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(1): p. 20 (2001).
- <sup>(13)</sup>. Verdin, A.; A.L.H. Sahraoui and R. Durand. Degradation of benzo[a]pyrene by mitosporic fungi and extracellular oxidative enzymes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 53: p. 65-70 (2004).
- <sup>(14)</sup>. Bumpus, J.A. *et al.* Oxidation of persistent environmental pollutants by white-rot fungi. *Science*, 228: p. 1434-1436 (1985).
- <sup>(15)</sup>. Bogan, B.W. and R.T. Lamar. Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading capabilities of *Phanerochaete laevis* HNB-1625 and its extracellular ligninolytic enzymes. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(5): p. 1597-1603 (1996).
- <sup>(16)</sup>. Field, J.A. *et al.* Oxidation of anthracene in water/solvent mixtures by the white-rot fungus, *Bjerkandera sp* strain BOS55. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1995. 44(1-2): p. 234-240.
- <sup>(17)</sup>. Field, J.A. *et al.* Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white-rot fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(7): p. 2219-2226 (1992).
- <sup>(18)</sup>. Sack, U. and T. Gunther. Metabolism of PAH by fungi and correlation with extracellular enzymatic-activities. *Journal of Basic Microbiology*, 33(4): p. 269-277 (1993).
- <sup>(19)</sup>. Canet, R. *et al.* Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by native microflora and combinations of white-rot fungi in a coal-tar contaminated soil. *Bioresource Technology*, 76(2): p. 113-117 (2001).
- <sup>(20)</sup>. Eggen, T. and A. Majcherczyk. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in contaminated soil by white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41(2): p. 111-117 (1998).
- <sup>(21)</sup>. Davis, M.W. *et al.* Field-evaluation of the lignin-degrading fungus *Phanerochaete sordida* to treat creosote-contaminated soil. *Environmental Science & Technology*, 27(12): p. 2572-2576 (1993).
- <sup>(22)</sup>. Volkering, F. *et al.* Influence of nonionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(5): p. 1699-1705 (1995).
- <sup>(23)</sup>. Tiehm, A. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(1): p. 258-263 (1994).
- <sup>(24)</sup>. Zheng, Z.M. and J.P. Obbard. Effect of non-ionic surfactants on elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil-slurry by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 76(4): p. 423-429 (2001).
- <sup>(25)</sup>. Grimberg, S.J.; J. Nagel and M.D. Aitken. Kinetics of phenanthrene dissolution into water in the presence of non-ionic surfactants. *Environmental Science & Technology*, 29: p. 1480-1487 (1995).
- <sup>(26)</sup>. Laha, S. and R.G. Luthy. Inhibition of phenanthrene mineralization by nonionic surfactants in soil-water systems. *Environmental Science & Technology*, 25(11): p. 1920-1930 (1991).
- <sup>(27)</sup>. Laha, S. and R.G. Luthy. Effects of nonionic surfactants on the solubilization and mineralization of phenanthrene in soil-water systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 40(11): p. 1367-1380 (1992).
- <sup>(28)</sup>. Inoue, A. and K. Horikoshi. A *Pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene. *Nature*, 338(6212): p. 264 (1989).
- <sup>(29)</sup>. Heipieper, H.J. *et al.* Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. *Trends in Biotechnology*, 12(10): p. 409 (1994).
- <sup>(30)</sup>. Morris, K.R. *et al.* Solubility of aromatic pollutants in mixed solvents. *Chemosphere*, 17: p. 285-298 (1988).
- <sup>(31)</sup>. Déziel, E.; Y. Comeau and R. Villemur. Two-liquid-phase bioreactors for enhanced degradation of hydrophobic/toxic compounds. *Biodegradation*, 10: p. 219-233 (1999).
- <sup>(32)</sup>. Efrogmson, R.A. and M. Alexander. Biodegradation by an *Arthrobacter* species of hydrocarbons partitioned into an organic solvent. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(5): p. 1441-1447 (1991).
- <sup>(33)</sup>. Daugulis, A.J. Partitioning bioreactors. *Current Opinion in Biotechnology*, 8(2): p. 169 (1997).
- <sup>(34)</sup>. Ascón-Cabrera, M.A. and J.M. Lebeault. Interfacial area effects of a biphasic aqueous/organic system on growth kinetic of xenobiotic-degrading microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43: p. 1136-1141 (1995).
- <sup>(35)</sup>. Guieysse, B.; M.d.D.T.G., Cirne and B. Mattiasson. Microbial degradation of phenanthrene and pyrene in a two-liquid phase-partitioning bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(5): p. 796 (2001).
- <sup>(36)</sup>. MacLeod, C.T. and A.J. Daugulis. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a two-phase partitioning bioreactor in the presence of a bioavailable solvent. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62: p. 291-296 (2003).
- <sup>(37)</sup>. Muñoz, R.; B. Guieysse and B. Mattiasson. Phenanthrene biodegradation by an algal-bacterial consortium in two-phase partitioning bioreactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61: p. 261-267 (2003).
- <sup>(38)</sup>. Villemur, R. *et al.* Two-liquid-phase slurry bioreactors to enhance the degradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Biotechnology Progress*, 16(6): p. 966-972 (2000).
- <sup>(39)</sup>. Janikowski, T.B. *et al.* Use of a two-phase partitioning bioreactor for degrading polycyclic aromatic hydrocarbons by a *Sphingomonas sp.* *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59: p. 368-376 (2002).
- <sup>(40)</sup>. Yu, G. *et al.* In vitro degradation of a reactive azo dye by crude ligninolytic enzymes from nonimmersed liquid culture of *Phanerochaete chrysosporium*. *Process Biochemistry*, 41(9): p. 1987 (2006).
- <sup>(41)</sup>. Cohen, R.; L. Persky and Y. Hadar. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(5): p. 582 (2002).
- <sup>(42)</sup>. Dordick, J.S. Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology*, 11: p. 194-211 (1989).
- <sup>(43)</sup>. Khmel'nitsky, Y.L. *et al.* Engineering biocatalytic systems in organic media with low water content. *Enzyme and Microbial Technology*, 10: p. 710-724 (1988).
- <sup>(44)</sup>. Zaks, A. and A.M. Klibanov. Enzymatic catalysis in non-aqueous solvents. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(7): p. 3194-3201 (1988).
- <sup>(45)</sup>. Wehtje, E. and P. Adlercreutz. Water activity and substrate concentration effects on lipase activity. *Biotechnology and Bioengineering*, 55(5): p. 798-806 (1997).

- <sup>(46)</sup>. Takamoto, T. *et al.* Lipase-catalyzed hydrolytic degradation of polyurethane in organic solvent. *Chemistry Letters*, p. 492-493 (2001).
- <sup>(47)</sup>. Field, J.A. *et al.* The tolerance of lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase to miscible solvents and the in vitro oxidation of anthracene in solvent: Water mixtures. *Enzyme and Microbial Technology*, 18(4): p. 300-308 (1996).
- <sup>(48)</sup>. Eibes, G. *et al.* Complete degradation of anthracene by Manganese Peroxidase in organic solvent mixtures. *Enzyme and Microbial Technology*, 37(4): p. 365-372 (2005).
- <sup>(49)</sup>. Klibanov, A.M. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*, 409(11): p. 241-246 (2001).
- <sup>(50)</sup>. Field, J.A. *et al.* The tolerance of lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase to miscible solvents and the in vitro oxidation of anthracene in solvent: water mixtures. *Enzyme and Microbial Technology*, 18: p. 300-308 (1996).
- <sup>(51)</sup>. Buchanan, I.D. and J.A. Nicell. Model development for horseradish peroxidase catalyzed removal of aqueous phenol. *Biotechnology and Bioengineering*, 54(3): p. 251-261 (1997).
- <sup>(52)</sup>. Wu, G. *et al.* A mechanistic study of self-inactivation of the peroxidase activity in prostaglandin H synthase-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(14): p. 9231-9237 (1999).
- <sup>(53)</sup>. Baldascini, H. and D.B. Janssen. Interfacial inactivation of epoxide hydrolase in a two-liquid-phase system. *Enzyme and Microbial Technology*, 36: p. 285-293 (2005).
- <sup>(54)</sup>. Efrogmson, R.A. and M. Alexander. Reduced mineralization of low concentrations of phenanthrene because of sequestering in nonaqueous-phase liquids. *Environmental Science & Technology*, 29: p. 515-521 (1995).
- <sup>(55)</sup>. Ross, A.C.; G. Bell and P.J. Halling. Organic solvent functional group effect on enzyme inactivation by the interfacial mechanism. *International Biodeterioration & Biodegradation y Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 8: p. 183-192 (2000).
- <sup>(56)</sup>. Eibes, G. *et al.* Operation of a two-phase partitioning bioreactor for the oxidation of anthracene by the enzyme manganese peroxidase. *Chemosphere*, 66: p. 1744-1751 (2007).
- <sup>(57)</sup>. Köhler, A. *et al.* Enhanced biodegradation of phenanthrene in a biphasic culture system. *Biodegradation*, 5: p. 93-103 (1994).
- <sup>(58)</sup>. Scheibner, K. and M. Hofrichter. Conversion of aminonitrotoluenes by fungal manganese peroxidase. *Journal of Basic Microbiology*, 38(1): p. 51-59 (1998).
- <sup>(59)</sup>. Van Aken, B. *et al.* Transformation and mineralization of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by manganese peroxidase from the white-rot basidiomycete *Phlebia radiata*. *Biodegradation*, 10(2): p. 83-91 (1999).
- <sup>(60)</sup>. Valli, K.; H. Wariishi and M.H. Gold. Degradation of 2,7-dichlorodibenzo-p-dioxin by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Bacteriology*, 174(7): p. 2131-2137 (1992).
- <sup>(61)</sup>. Jaspers, C.J.; G. Jimenez and M.J. Penninckx. Evidence for a role of manganese peroxidase in the decolorization of Kraft pulp bleach plant effluent by *Phanerochaete chrysosporium*: Effects of initial culture conditions on enzyme production. *Journal of Biotechnology*, 37(3): p. 229 (1994).
- <sup>(62)</sup>. Heinfling, A. *et al.* Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(8): p. 2788-2793 (1998).
- <sup>(63)</sup>. Mielgo, I. *et al.* Oxidative degradation of azo dyes by manganese peroxidase under optimized conditions. *Biotechnology Progress*, 19(2) (2003).
- <sup>(64)</sup>. López, C. *et al.* Dye decolorization by manganese peroxidase in an enzymatic membrane bioreactor. *Biotechnology Progress*, 20(1): p. 74-81 (2004).
- <sup>(65)</sup>. Bogan, B.W. and R.T. Lamar. One-electron oxidation in the degradation of creosote polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(7): p. 2631-2635 (1995).
- <sup>(66)</sup>. Bogan, B.W.; R.T. Lamar and K.E. Hammel. Fluorene oxidation in vivo by *Phanerochaete chrysosporium* and in vitro during manganese peroxidase-dependent lipid peroxidation. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996: p. 1788-1792 (1996).
- <sup>(67)</sup>. Bogan, B.W. *et al.* Expression of lip genes during growth in soil and oxidation of anthracene by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: p. 3697-3703 (1996).
- <sup>(68)</sup>. Günther, T. *et al.* Oxidation of PAH and PAH-derivatives by fungal and plant oxidoreductases. *Journal of Basic Microbiology*, 38(2): p. 113-122 (1998).
- <sup>(69)</sup>. Sack, U.; M. Hofrichter and W. Fritsche. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by manganese peroxidase of *Nematoloma frowardii*. *FEMS Letters*, 152: p. 227-234 (1997).