
*Estudios preliminares de la decolorización del licor negro procedente del pulpeo Organosolv del bagazo de la caña de azúcar por *Trametes versicolor**

Leyanis Mesa^{1*}, Erenio González¹, Xavier Gabarrell²

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

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

*Preliminary studies of black liquor decolourization from Organosolv pulping of sugar cane bagasse by *Trametes versicolor**

*Estudis preliminars del descoloriment del licor negre procedent del procés Organosolv del bagàs de la canya de sucre per *Trametes versicolor**

Recibido: 9 de julio de 2007; revisado: 16 de octubre de 2007; aceptado: 29 de octubre de 2007

RESUMEN

El licor negro generado del proceso Organosolv del bagazo de la caña de azúcar fue tratado con el hongo de podredumbre blanca *Trametes versicolor*, 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 obtuvieron reducciones de color y compuestos aromáticos en el orden de 90 a 95% y 95% de DQO. En el transcurso del experimento fue detectada la actividad de la lacasa pero no de lignina peroxidasa o manganeso peroxidasa, aunque *Trametes versicolor* es capaz de producir estas enzimas. A partir de los resultados obtenidos, se puede concluir que existe una relación entre la producción de lacasa y la disminución del color. Esta correlación responde a la ecuación $Y(\text{reducción de color}) = 34,77 + 5,533(\text{actividad de lacasa})$.

Palabras claves: Decolorización. Lacasa. Licor negro. *Trametes versicolor*.

SUMMARY

Black liquor from sugar cane bagasse Organosolv process were treated with the with-rot fungus *Trametes versicolor*, to do preliminary studies of evaluation to reduce of colour, aromatic compounds and chemical oxygen demand (COD). The studies were made in shake flask. Reductions in colour and aromatic compounds of 90 to 95% and in COD of 95% were achieved. During the experiment, laccase activity was detected but neither lignin

peroxidase (LiP) nor manganese peroxidase (MnP) were detected, nevertheless *Trametes versicolor* is able to produce these enzymes. From the results obtained, it can be concluded that there is a relationship between laccase production and colour reduction. This correlation responds to the equation $Y(\text{colour reduction}) = 34,77 + 5,533(\text{laccase activity})$.

Key words: Decolorization. Laccase. Black liquor. *Trametes versicolor*.

RESUM

El licor negro generat pel procés Organosolv del bagàs de la canya de sucre es tracta amb el fong de podridura blanca *Trametes versicolor*, a efectes de realitzar estudis preliminars d'avaluació de la disminució del color, compostos aromàtics i demanda química d'oxigen (DQO). Els estudis es realitzen en erlenmeyers. S'assoleixen reduccions de color i de compostos aromàtics de l'ordre del 90 al 95%, i del 95% pel que fa a la DQO. En el transcurs de l'experiment es detecta activitat de lacasa, però no de lignina peroxidasa o manganès peroxidasa, tot i que *Trametes versicolor* es capaç de produir aquests enzims. A partir dels resultats obtinguts, es pot concloure que existeix una relació entre la producció de lacasa i la disminució del color. Aquesta correlació respon a la equació $Y(\text{reducció de color}) = 34,77 + 5,533(\text{activitat de lacasa})$.

Mots clau: Descoloriment. Lacasa. Licor negre. *Trametes versicolor*.

INTRODUCCIÓN

Las fábricas de pulpa para papel ondulado carecen en general de un tratamiento efectivo del licor negro. Por esta razón, en muchos casos estas industrias vierten el efluente al medio sin ningún tratamiento adecuado provocando el deterioro del mismo. Durante la producción de pulpa a través del pulpeo con etanol (proceso Organosolv), el licor negro obtenido, aunque muy inferiores comparados con el proceso Kraft, tiene valores de demanda química de oxígeno (DQO) superiores a los permitidos para su vertido al medio ambiente (González, M., 2004). Esta agua residual contiene principalmente lignina, un biopolímero aromático, heterogéneo y complejo que protege a las plantas de los ataques microbianos y de los insectos, además de jugar un rol estructural muy importante. La biodegradabilidad anaerobia de este licor negro es baja, debido a la presencia de ligninas y sus derivados (Field, 1991; Kortekaas, 1995). La baja biodegradabilidad unido 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 tratar 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 (Poggi-Veraldo HM, 1997).

Varios estudios han demostrado que los efluentes de la industria del papel pueden ser decolorados por cultivos de hongos de podredumbre blanca. La mayoría de los trabajos han sido realizados con *P. chrysosporium*, pero otros hongos de podredumbre blanca han sido también usados (Jager, 1985; Sundman y Kirk, 1982). Entre estos se encuentran *Trametes versicolor* (Archibald y Paice, 1990; Bergbauer, 1991), *Stagonospora gigaspora* (Bergbauer, 1992) y *Pleurotus pulmonaris* (Masaphy y Leavon, 1992) que han dado buenos resultados. Estos hongos son capaces de degradar tanto la lignina como otras sustancias aromáticas. Ellos excretan un sistema enzimático extracelular capaz de degradar completamente la lignina presente en el licor negro. Las enzimas más importantes son lacasa, manganeso peroxidasa y lignina peroxidasa.

Trametes versicolor puede producir tanto lacasa constitutiva como inductiva, teniendo similar actividad en ambos casos, también puede producir peroxidases tales como lignina peroxidasa (LiP) o Manganeso Peroxidasa (MnP) (Paice, 1993). Es por ello que estos hongos son muy utilizados para degradar una amplia variedad de contaminantes (Kapdan, 2000; Robinson, 2001; Kadhim, 1999; Ullah, 2000) como colorantes textiles, fenoles, clorofenoles, hidrocarburos aromáticos policíclicos, entre otros.

Una de las principales dificultades con estos procesos es la producción de enzimas en cantidades suficientes que permitan la decoloración del licor negro, así como la facilidad de un tratamiento anaeróbico subsecuente del efluente. Por este motivo, es necesario en primer lugar la determinación de las condiciones óptimas de operación. Por lo que uno de los principales objetivos de este trabajo es producir *Trametes versicolor* de una forma que permita niveles adecuados de decoloración, disminución de compuestos aromáticos y DQO.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos y condiciones de cultivo

El microorganismo utilizado es *Trametes versicolor* ATCC 42530, mantenida a 23 °C en placas Petri en me-

dio agar con extracto de malta 2% y resembradas periódicamente.

Producción del inóculo

La suspensión micelial de *Trametes versicolor* fue obtenida por inoculación de un segmento de 1 cm de diámetro de la zona de crecimiento del hongo en agar malta al 2%, en 100 mL de medio de extracto de malta 2% (m/v) en erlenmeyers. Los erlenmeyers fueron incubados a 25 °C y con una agitación orbital de 135 rpm. Después de 3 días la capa de micelio formada se separó del medio de cultivo y se trituró con un homogenizador Polytron hasta obtener un medio homogenizado. A la suspensión resultante se añadió el mismo volumen de solución salina (NaCl 0.8%). Se añadió 10 mL de la suspensión de micelio en 90 mL de medio (85% licor negro). Los erlenmeyers se incubaron a una temperatura de 25 °C y una agitación de 135 r · min⁻¹ durante 5 días.

Todas las muestras fueron esterilizadas a 120 °C durante 15 minutos.

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. (APHA, 1985)

Las reducciones de DQO, color y compuestos aromáticos se calcularon respecto a un control en idénticas condiciones de temperatura, agitación en el tiempo y posibles cambios causados por la evaporación del medio:

$$\text{Reducción (\%)} = (C-S)/C_i * 100$$

Donde:

C: muestra del control no inoculado al tiempo t.

S: muestra inoculada al tiempo t.

C_i: muestra inicial del control no inoculada.

Las muestras y el control son por triplicado.

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 medidas 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

Las actividades Lacasa y Manganeso peroxidasa fueron medidas usando una versión (Kaal, Jong y Field, 1993) modificada del método de Paszczyński 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.

Por el contrario, 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 (Tien M, 1984). 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 I.

TABLA I

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 tot. disueltos (mg · L ⁻¹)	918	Color	4.85
Sólidos tot. 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. 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 100ml; la solución fue esterilizada a 120 °C por 20 minutos.

RESULTADOS Y DISCUSION

Las experiencias anteriores con *T. versicolor* han dado buenos resultados. Su estudio es importante por sus posibles aplicaciones biotecnológicas en el pretratamiento biológico de subproductos agrícolas y su potencial utilización en la fabricación de pasta y papel, obtención de piensos mejorados y eliminación de productos

derivados de la lignina con alto poder contaminante, por esta razón se decidió también llevar a cabo experimentos con este hongo y así evaluar su influencia en la descolorización del licor negro proveniente del pulpeo con etanol.

Los experimentos con *Trametes versicolor* fueron llevados a cabo en erlenmeyers en un medio que contenía licor negro en una concentración del 85% con el objetivo de obtener información acerca del crecimiento del hongo en este medio que contiene el efluente objeto de estudio. En estos experimentos una alta concentración de biomasa se obtuvo después de 3 días de incubación.

En la figura 1 se muestran los perfiles de comportamiento de color y compuestos aromáticos con la utilización de *T. versicolor*.

Aunque *T. versicolor* puede producir lacasa, MnP y LiP, solamente la lacasa fue detectada en las condiciones correspondientes a las experiencias. Varios autores han referido problemas con la determinación de la actividad de la LiP. Por ejemplo, Lobarzewski (Lobarzewski et al., 1990) encontró que la lignina, los lignocelulósicos y las ligninas solubles pueden reaccionar con peroxidases formando complejos y reduciendo o eliminando su actividad. Daniel (Daniel et al., 1994) demostró que la LiP puede formar estos complejos. Archibald (Archibald et al., 1990) arribó a una conclusión similar.

Se han diseñado varios experimentos en los que se ha medido la relación existente en diferentes concentraciones de lignina alcalina y la presencia de la LiP y se ha demostrado el efecto inhibitorio de los derivados de lignina en la actividad de la LiP (Font, X., 1997).

En los resultados obtenidos de los trabajos mencionados anteriormente se demostró que la actividad de la LiP es reducida por la presencia de lignina o derivados de esta.

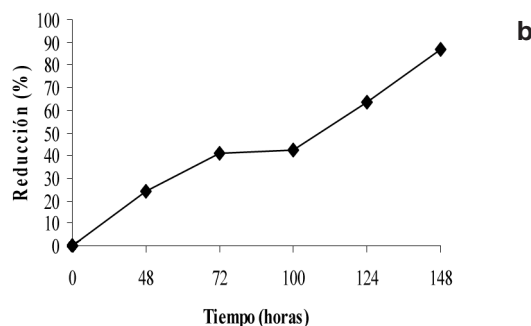
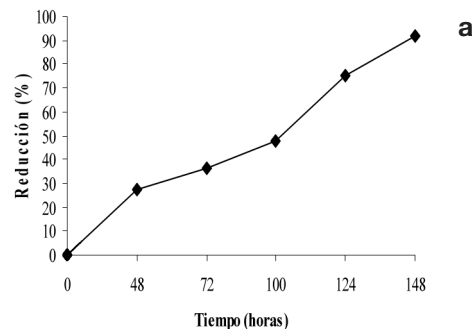


Figura 1. Reducción en el tiempo de color (a) y compuestos aromáticos (b).

De acuerdo a esto, solo la lacasa y MnP pueden ser monitoreadas durante el tratamiento al licor negro, aunque en este caso la MnP tampoco pudo ser detectada en los experimentos, lo cual puede deberse a que las condiciones presentes de trabajo no corresponden a las óptimas para la producción de la MnP (Font et al., 2003).

En la figura 3 se muestra la actividad de la lacasa en relación con el consumo de glucosa por el *T. versicolor*, como se puede observar es un comportamiento típico del metabolismo secundario.

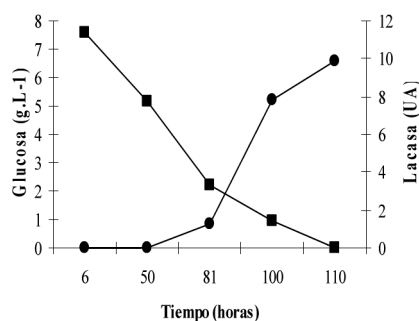


Figura 3. Evolución de la actividad de la lacasa (●) y la glucosa (■).

Siendo la lacasa la única enzima detectada y habiéndose verificado una reducción en el color, podría inferirse que la actividad enzimática puede estar conectada con la reducción del color. La figura 4 muestra la relación existente entre la producción total de lacasa y la reducción de color. Se encontró que este comportamiento puede ser representado por una ecuación lineal,

$$Y (\text{reducción de color}) = 34.77 + 5.533X \quad (R^2 = 0.9463)$$

a un 99% de confianza

Esta correlación indica que la reducción del color depende en gran medida de la actividad enzimática de la lacasa, lo que corrobora el mecanismo de acción de estos hongos;

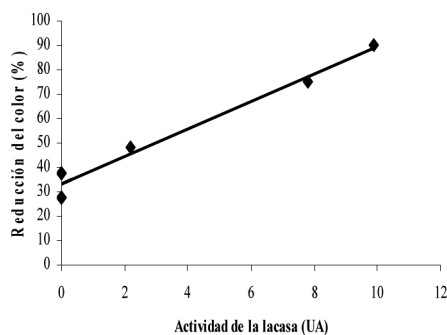


Figura 4. Correlación entre la actividad de la lacasa y la reducción del color.

en una primera etapa se absorbe el colorante y luego este es degradado en el interior del hongo por la enzima.

La forma de la curva que relaciona la reducción de los compuestos aromáticos con la actividad de lacasa, es muy similar a la obtenida para el color. La relación no es tan precisa ($R^2 = 0.89$) porque es evidente que a pesar que los compuestos aromáticos y el color se comporten en forma similar, no es difícil suponer que no todos los compuestos aromáticos contribuyen de igual forma en el color y tampoco la lacasa ataca a todos los compuestos aromáticos por igual.

Corroborando lo explicado anteriormente podemos observar la evolución en el tiempo del color y los compuestos aromáticos con la actividad de la lacasa (figura 5), como se aprecia cuando aparece la actividad de la lacasa se produce una marcada reducción en el color y los compuestos aromáticos.

Una de las características a destacar de la lacasa, es que se trata de una enzima muy inespecífica (Bourbonais, 1990). Además de actuar sobre los polímeros de lignina, oxida una gran variedad de compuestos de bajo peso molecular con estructuras tan distintas como difenoles (las hidroquinonas y el catecol), monofenoles sustituidos con grupos metoxilo y metilo (2,6-dimetoxifenol, guayacol, 2,4,6-trimetilfenol), aminas aromáticas secundarias (p-anisidina, p-aminobenceno) e incluso polialcoholes alifáticos secundarios (3,5-ciclohexadien-1,2-diol y 1,4-hexadien-3,4-diol).

El valor de la toxicidad final del licor tratado con *Trametes versicolor* fue 5.4, lo que indica la efectividad de este proceso de biorremediación, ya que se considera un efluente con niveles tóxicos cuando los valores se encuentran por debajo de 3; la DQO se redujo en un 95%. Estos resultados corresponden a la influencia de factores ya discutidos: la actividad de la lacasa presente en los experimentos realizados y; además, hubo una influencia positiva del comportamiento del pH del medio, descendió a valores debajo de 3 (datos no mostrados), este parámetro es muy importante debido a que la máxima actividad ligninolítica se evidencia a bajos valores de pH (Hatakka, 1997).

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

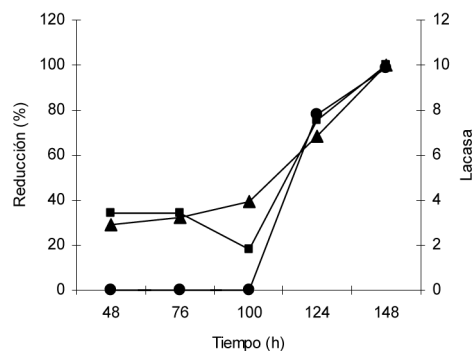


Figura 5. *T. versicolor* (▲) Color, (■) Compuestos Aromáticos, (●) Actividad de la lacasa.

con este hongo, sin perder de vista que el objetivo final era conseguir información de la biodegradación del licor negro proveniente del pulpeo Organosolv del bagazo de la caña de azúcar con este hongo para lograr su decoloración.

Los resultados obtenidos en este trabajo con *Trametes versicolor* muestran que es factible de utilizar en tratamientos biológicos del licor negro del proceso organosolv del bagazo de la caña de azúcar.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración de los miembros del laboratorio químico de la papelera «Sergio González» del municipio Abreus, Cienfuegos, Cuba, por la ayuda brindada a este proyecto. Esta investigación fue financiada por el Proyecto IV.15 «El pulpeo con etanol como alternativa para incrementar la competitividad de fábricas de papel mediante su desarrollo prospectivo integrado a industrias de la caña de azúcar» perteneciente a la Red Cytod.

BIBLIOGRAFIA

APHA. 1985: «Standard Methods for the Examination of water and wastewater». APPA, AWWA and WPCF, Washington, DC.

Archibald FS., Paice MG and Jurasek L. 1990: «Decolorization of kraft bleachery effluent chromophores by *Coriolus (Trametes) versicolor*». *Enzyme Microb Technol* 12: 846-853.

Bergbauer, M.; Eggert, C. and Kalnowski, G. 1992: «Biotreatment of pulp mill effluents with the *Coelomycetus fungus Stagonospora gigaspora*». *Biotechnol Lett* 14:317-322.

Bergbauer, M.; Eggert, C. and Kraepelin, G. 1991: «Decolorization of chlorinated lignin compounds in a bleach plant effluent by the white-rot fungus *T versicolor*». *Appl Microbiol Bot* 35: 105-109.

Bourbonnais, R.; de Paice, M.G. 1990: «Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation». *FEBS Letters* 267. 99-102.

Daniel, G.; Jindrich, V. and Kubatova, E. 1994: «Pyranose oxidase, a major source of H₂O₂ during wood degradation by *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* and *Oudemansiella mucida*». *Appl Environ Microbiol* 60:2524-2532

De Jong, E.; de Vries, F.; Field, J.A.; Van der Zwan, R.P. and de Bont, J.A.M. 1992: «Isolation and screening of Basidiomycetes with peroxidase activity». *Mycological Research*. 96: (12): 1098-1104

Font, X. 1997: «Tractament de lleixius negres amb *Trametes versicolor*. Monitoratge del procés». Tesis para optar por el grado de Doctor. Universitat Autònoma de Barcelona. España.

Font, X.; Caminal, G.; Gabarrell, X.; Romero, S.; Vicent, MT. (online: 2003): «Black liquor detoxification by laccase of *Trametes versicolor* pellets». *J Chem Technol Biotechnol* 78:548-554.

González, M. 2004: «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.

Hatakka, A.; Vares, T.; Bocchini, P. and Galletti, G.C. 1997: «Production of lignin-degrading enzymes on solid straw medium», by *Phanerochaete chrysosporium* and *Ceriporiopsis subvermispota* and degradation of the lignocellulosic substrate. *Proc. TAPPI Biol. Sci. Symp.*, San Francisco, 19-23 October.

Jager, A.; Croan, S. and Kirk, TK. 1985: «Production of ligninase and degradation of lignin in agitated submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium*». *Appl Environ Microbiol* 50: 1274-1278.

Kaal E.E., Jong de E and Field J.A., 1993: «Stimulation of ligninolytic peroxidase activity by nitrogen in the white rot fungus *Bjerkandera* sp». *Appl Environm Microbiol* 59: 4031-4036.

Kadhim, H.; Graham, C.; Barratt, P.; Evans, CS. and Rastall, RA. 1999: «Removal of phenolic compounds in water using *Coriolus versicolor* grown on wheat bran». *Enzyme Microb Technol* 24:303-307.

Kapdan, IK.; Kargia, F.; McMullan, G. and Marchant, R. 2000: «Effect of environmental conditions on biological decolorization of textiles dyestuff by *C. versicolor*». *Enzyme Microb Technol* 26:381-387.

Lobarzewski, J. 1990: «The characteristic and functions of the peroxidases from *Trametes versicolor* in lignin biotransformation». *J Biotechnol* 13:111-117.

Masaphy, S. and Leavon, D. 1992: «The effect of lignocellulose and ligninolytic activity of *Pleurotus pulmonaris* in submerged cultures». *Appl Microbiol Biotechnol* 36:828-832.

Mesa L.; González E. 2004: «Obtención de lignina a partir del licor negro procedente del pulpeo con etanol del bagazo de la caña de azúcar». *Revista Cubana de Química*.

Paice, M.G.; Reid, I.D.; Bourbonnais, R.; Archibald, F.S. and Jurasek, L. 1993: «Manganese peroxidase, produced by *Trametes versicolor* during pulp bleaching, demethylates and delignifies kraft pulp». *Appl Environ Microb* 59:260-265.

Paszczynski A., Crawford R.L., Huynh V.B., 1988: «Manganese Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* purification». *Methods enzymol* 161: 264-270.

Poggi-Varaldo H.M., Estrada-Vazquez C., Fernandez-Villagomez, G. and Esparza-Garcia F., 1997: «Pretreatment of black liquor spills effluent», in *Proceedings of the 51st Industrial Waste Conference, 1996, Ann Arbor Press Inc.*, Indiana, USA, pp 651-661.

Robinson, T.; Chandran, B. and Nigam, P. 2001: «Studies on the production of enzymes by white-rot fungi for the decolorization of textile dyes». *Enzyme Microb Technol* 29:575-579.

Rojeck, K.; Roddick, F.A.; Parkinson A. 2004: «Decolorisation of natural organic matter by *Phanerochaete chrysosporium*: the effect of environmental conditions». *Water Science and Technology: Water Supply Vol 4 No 4* pp 175-182.

Sundman, G. and Kirk, T.K. 1982: «Fungal decolorization of Kraft bleaches plant effluent». *Tappi* **64**:145-148.

Tien M. and Kirk T.K., 1984: «Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaetechrysosporium*. Purification, characterization and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring enzyme». *Proc Natl Acad Sci USA* **81**:2280-2284.

Ullah, M.A.; Kadhim, H.; Rastall, R.A. and Evans, C.S. 2000: «Evaluation of solid substrate for enzyme production by *Coriolus versicolor*, for use in bioremediation of chlorophenols in aqueous effluents». *Appl Microbiol Biotechnol* **54**:832-837.