

**EVALUACION DE LOS DESECHOS AGROINDUSTRIALES COMO
SUSTRATO EN LA PRODUCCION DE ENZIMAS LIGNOLITICAS,
MEDIANTE LA TECNICA DE FERMENTACION SEMISOLIDA POR
HONGOS DEL GENERO BASIDIOMYCETES**

SANDRA MILENA PINTO BOHORQUEZ

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
ESCUELA DE QUIMICA
BUCARAMANGA
2004**

**EVALUACION DE LOS DESECHOS AGROINDUSTRIALES COMO
SUSTRATO EN LA PRODUCCION DE ENZIMAS LIGNOLITICAS,
MEDIANTE LA TECNICA DE FERMENTACION SEMISOLIDA POR
HONGOS DEL GENERO BASIDIOMYCETES**

SANDRA MILENA PINTO BOHORQUEZ

**Trabajo de grado para optar el título de
Maestría en Química**

Director

**RODRIGO TORRES SAEZ
Bioquímico MSc.**

Codirector

**WILLIAM LARROTA
Ing. Químico MSc.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
ESCUELA DE QUIMICA
BUCARAMANGA
2004**

Dedicatoria

A mis padres, Reynaldo y Ana.

*A mis hermanos, Diego, Lina y
Karen*

A mi abuela, Isabel

A Ti.

*Por que fueron mis amigos,
leales y comprensivos cuando
soplaban buenos vientos;
amigos verdaderos cuando
dichos vientos se viciaron.*

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION	17
1. MARCO TEÓRICO	20
1.1 INTRODUCCIÓN	20
1.2 Estructura y composición de los compuestos lignocelulósicos	20
1.2.1 Estructura y composición de la celulosa	22
1.2.2 Estructura y composición de la hemicelulosas	24
1.2.3 Estructura y composición de la lignina	25
1.3 MICROORGANISMOS INVOLUCRADOS EN LA DEGRADACIÓN DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS	27
1.3.1 Microorganismos degradadores de Lignina	30
1.4 ENZIMAS LIGNOLÍTICAS	32
1.4.1 Lignina Peroxidasa (Li-P)	32
1.4.2 Manganese Peroxidasa (Mn-P)	33
1.4.3 Lacasa	34
1.5 PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIGNOLÍTICAS POR FERMENTACIÓN	35
1.6 POSIBILIDADES BIOTECNOLÓGICAS DE LAS ENZIMAS LIGNOLÍTICAS	37
2. MATERIALES Y MÉTODOS	40
2.1 MATERIALES	40
2.1.1 Microorganismos	40
2.1.2 Sustratos	40
2.1.3 Reactivos	41
2.2 METODOLOGIA ANALITICA	41
2.2.1 Determinación de azúcares reductores	41

2.2.2 Determinación de proteína extracelular. (Bradford, 1976)	42
2.2.3. Determinación de la concentración celular (Stickland, 1954)	43
2.2.4 Determinación de la actividad enzimática de Lacasa. (Bourbonnais, R, 1992)	45
2.2.5 Determinación de la actividad enzimática de Manganese Peroxidasa. (Honda, 1992)	45
2.2.6 Determinación de la actividad enzimática de lignina Peroxidasa (Hofrichter, 1999)	45
2.2.7 Determinación de Lignina	46
2.2.7.1 Preparación del sustrato libre de extraíbles	46
2.2.7.2 Determinación de lignina (klason) y celulosa (Kurschner y Hoffer)	46
2.2.7.3 Determinación del Contenido de Humedad (Rodriguez, 1978)	46
2.2.8 Análisis elemental de los sustratos celulósicos	47
2.3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL	47
2.3.1 Conservación y propagación de las cepas	47
2.3.2 Preparación de los medios de Cultivo	47
2.3.2.1 Esterilización	48
2.3.3 Experiencias preliminares de producción de ligninasas	48
2.3.4 Selección del sustrato celulósico y cepa productora	48
2.3.5 Formulación del medio de cultivo	49
2.3.5.1 Estudio del Efecto del pH	49
2.3.5.2 Estudio de la composición del medio de cultivo en la cepa seleccionada.	49
2.3.5.3 Estudio del efecto de inductores y surfactantes en la producción de enzimas lignolíticas	49
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
3.1 EXPERIENCIAS PRELIMINARES DE PRODUCCIÓN DE LIGNINASAS	51

3.2 SELECCIÓN DEL SUSTRATO CELULÓSICO Y CEPA PRODUCTORA	51
3.2.1 Fermentación utilizando como sustrato salvado de trigo	52
3.2.2 Fermentación utilizando como sustrato paja de trigo	58
3.2.3 Fermentación utilizando como sustrato de tuza de mazorca	64
3.3 FORMULACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO	74
3.3.1 Estudio del efecto del pH inicial del medio de cultivo en la producción de enzimas lignolíticas	74
3.3.2 Estudio de la composición del medio de cultivo en la cepa seleccionada	76
3.3.2.1 Estudio del efecto de la concentración de carbono en la composición del medio de cultivo para la producción de enzimas lignolíticas	77
3.3.2.2 Estudio del efecto de la concentración de nitrógeno en la composición del medio de cultivo para la producción de enzimas lignolíticas	80
3.3.2.3. Estudio del efecto de Inductores y surfactantes en la producción de enzimas lignolíticas	82
CONCLUSIONES	85
RECOMENDACIONES	87
BIBLIOGRAFÍA	88
ANEXOS	101

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Composición de algunas maderas y residuos lignocelulósicos agroindustriales (29)	21
Tabla 2. Tipos de Enzimas oxidativas producidas por hongos de pudrición blanca	31
Tabla 3. Aplicaciones potenciales de las enzimas y microorganismos lignolíticos (29)	39
Tabla 4. Parámetros cinéticos de comparación obtenidos para <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Pleurotus eryngii</i> , <i>Pleurotus pulmonaris</i> empleando como sustrato salvado de trigo.	56
Tabla 5. Parámetros cinéticos de comparación obtenidos para <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Pleurotus eryngii</i> , <i>Pleurotus pulmonaris</i> empleando como sustrato paja de trigo	63
Tabla 6. Parámetros cinéticos de comparación obtenidos para <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Pleurotus eryngii</i> , <i>Pleurotus pulmonaris</i> empleando como sustrato tuza de mazorca	69
Tabla 7. Valores de productividad específica (q_P) obtenidos para las diferentes enzimas lignolíticas producidos por los <i>Basidiomycetes</i> en estudio	73
Tabla 8. Efecto del pH en la producción de enzimas de <i>Pleurotus ostreatus</i> empleando como sustrato paja de trigo	75
Tabla 9. Efecto de la variación de la concentración de la fuente de carbono sobre los parámetros cinéticos de producción de enzimas lignolíticas, azúcares reductores y rendimiento	78
Tabla 10. Cuadro comparativo de actividades de fermentación sólida y fermentación semi-sólida para <i>Pleurotus ostreatus</i>	79

Tabla 11. Efecto de la variación de la concentración de la fuente de nitrógeno ((NH ₄) ₂ SO ₄) sobre los parámetros cinéticos de producción de enzimas lignolíticas, azúcares reductores y rendimiento	80
Tabla 12. Parámetros cinéticos obtenidos en el estudio del efecto de inductores sobre la producción de enzimas lignolíticas por <i>Pleurotus ostreatus</i>	83

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura Química de la celulosa	22
Figura 2. Estructura microscópica y submicroscópica de la celulosa	23
Figura 3. Precusores primarios de la lignina	26
Figura 4. Modelo esquemático de la lignina de abeto	27
Figura 5. Cinética de crecimiento celular, producción de proteínas y azúcares reductores para <i>Pleurotus Ostreatus</i> empleando como sustrato salvado de trigo	52
Figura 6. Cinética de crecimiento celular, pH , producción de proteína y azúcares reductores para <i>pleurotus eryngii</i> empleando como sustrato salvado de trigo	53
Figura 7. Cinética de crecimiento celular, pH , producción de proteína y azúcares reductores para <i>Pleurotus pulmonaris</i> empleando como sustrato salvado de trigo.	53
Figura 8. Actividades específicas de Lacasa, Manganese Peroxidasa para los Basidiomycetes: <i>Pleurotus Ostreatus</i> , <i>Pleurotus Pulmonaris</i> y <i>Pleurotus Eryngii</i> empleando como sustrato salvado de trigo.	55
Figura 9. Cinética de crecimiento celular, producción de proteínas y azúcares reductores para <i>Pleurotus Ostreatus</i> empleando como sustrato paja de trigo.	59
Figura 10. Cinética de crecimiento celular, pH , producción de proteína y azúcares reductores para <i>pleurotus pulmonaris</i> empleando como sustrato paja de trigo.	60
Figura 11. Cinética de crecimiento celular, pH , producción de proteína y azúcares reductores para <i>pleurotus Eryngii</i> empleando como sustrato paja de trigo.	61

Figura 12. Actividades específicas de Lacasa y Manganese Peroxidasa para los Basidiomycetes: <i>Pleurotus Ostreatus</i> , <i>Pleurotus Pulmonaris</i> y <i>Pleurotus Eryngii</i> empleando como sustrato paja de trigo.	62
Figura 13. Cinética de crecimiento celular, producción de proteínas y azúcares reductores para <i>Pleurotus Ostreatus</i> empleando como tuza de mazorca.	65
Figura 14. Cinética de crecimiento celular, pH , producción de proteína y azúcares reductores para <i>pleurotus pulmonaris</i> empleando como sustrato tuza de mazorca.	66
Figura 15. Cinética de crecimiento celular, pH , producción de proteína y azúcares reductores para <i>pleurotus Eryngii</i> empleando como sustrato tuza de mazorca.	66
Figura 16. Actividades específicas de Lacasa, Lignina Peroxidasa para los Basidiomycetes: <i>Pleurotus Ostreatus</i> , <i>Pleurotus Pulmonaris</i> y <i>Pleurotus Eryngii</i> empleando como sustrato tuza de mazorca.	68
Figura 17. Valores máximos de actividad enzimática de la casa presentados por los Basidiomycetes <i>P. ostreatus</i> , <i>P. eryngii</i> . <i>P. pulmonaris</i> sobre los sustratos paja de trigo, tuza de mazorca y salvado de trigo.	71
Figura 18. Valores máximos de actividad enzimática de manganeso peroxidasa presentados por los Basidiomycetes <i>P. ostreatus</i> , <i>P. eryngii</i> . <i>P. pulmonaris</i> sobre los sustratos paja de trigo, tuza de mazorca y salvado de trigo.	71
Figura 19. Valores máximos de actividad enzimática de lignina peroxidasa presentados por los Basidiomycetes <i>P. ostreatus</i> , <i>P. eryngii</i> . <i>P. pulmonaris</i> sobre los sustratos paja de trigo, tuza de mazorca y salvado de trigo.	72
Figura 20. Efecto de las condiciones iniciales de pH en la producción de enzimas lignolíticas por <i>Pleurotus ostreatus</i> sobre paja de trigo	74

Figura 21. Valores máximos de actividad enzimática de lacasa, Mn-P y Li-P presentados en el proceso fermentativo con <i>Pleurotus ostreatus</i> .	77
Figura 22. Valores máximos de actividad enzimática de lacasa, Mn-P y Li-P presentados en el proceso fermentativo en el estudio del efecto de la variación de la concentración de la fuente de nitrógeno.	81
Figura 23. Valores máximos de actividad enzimática de lacasa y Li-P presentados en el proceso fermentativo en el estudio del efecto de inductores	84

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Caracterización de la composición elemental, contenido de celulosa y lignina de Salvado de trigo, Tuza de mazorca y paja de trigo	102
Anexo B. Curva de calibración para determinación de la concentración de azúcares reductores por el método del ácido dinitrosalisílico (DNS)	103
Anexo C. Curva de calibración para determinación de la concentración de proteína extracelular por el método de Bradford (Proteína patrón Albúmina)	104
Anexo Da. Curva de calibración para determinación de la concentración de proteína intracelular por el método de Stikland para <i>Pleurotus pulmonaris</i>	105
Anexo Db. Curva de calibración para determinación de la concentración de proteína intracelular por el método de Stikland para <i>Pleurotus Eryngii</i>	106
Anexo Dc. Curva de calibración para determinación de la concentración de proteína intracelular por el método de Stikland para <i>Pleurotus Ostreatus</i>	107
Anexo E. Curva de calibración para la determinación de concentración de proteína por el método Stikland (modificado del método de Biuret)	108
Anexo F. Composición de los medios de cultivos sólidos con Agar-papa-dextrosa y Agar-malta	109
Anexo G. Composición de la solución nutriente y condiciones iniciales en el proceso fermentativo para la producción de enzimas lignolíticas utilizando paja de trigo, tuza de mazorca y salvado de trigo como sustratos	110

Anexo H. Composición de la solución nutriente y condiciones iniciales en el proceso fermentativo para la producción de enzimas lignolíticas empleados en el estudio del efecto de inductores y surfactantes	111
Anexo I. Ecuaciones para el cálculo de los parámetros cinéticos: productividad específica (q_p), actividad enzimática específica (AE) y rendimiento de formación de biomasa en producto ($Y_{P/X}$)	112

RESUMEN

TITULO: EVALUACIÓN DE LOS DESECHOS AGROINDUSTRIALES COMO SUSTRATO EN LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIGNOLÍTICAS, MEDIANTE LA TÉCNICA DE FERMENTACIÓN SEMISÓLIDA POR HONGOS DEL GÉNERO BASIDIOMYCETES*

AUTOR: SANDRA MILENA PINTO BOHORQUEZ**

PALABRAS CLAVES: *Pleurotus* spp., Ligninasas, Fermentación semi-sólida, Sustratos celulósicos.

En este trabajo se llevaron a cabo estudios de producción de enzimas lignolíticas por fermentación semi-sólida utilizando las tres cepas de referencia: *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus pulmonaris* y los sustratos celulósicos paja de trigo, tuza de mazorca y salvado de trigo; este último se utilizó como sustrato de referencia. Inicialmente se realizó la selección de la mejor cepa productora de ligninasas así como el mejor sustrato agroindustrial a escala de laboratorio. La comparación entre las cepas y los sustratos permitió la selección de *Pleurotus Ostreatus* y paja de trigo. Obteniéndose una productividad específica q_p (U actividad/g célula*hora) de $2,15 \cdot 10^{-3}$ para lacasa y de $1,14 \cdot 10^{-2}$ para Manganese peroxidasa y una producción de azúcares reductores de 0,161 g/L a las 112 horas de llevada a cabo la fermentación.

Así mismo se establecieron las mejores condiciones de inducción del medio de cultivo para el crecimiento microbiano y la producción de enzimas lignolíticas por *Pleurotus ostreatus* sobre paja de trigo. Teniendo en cuenta las condiciones de pH inicial y el efecto de la concentración de la fuente de carbono (paja de trigo) y de nitrógeno (sulfato de amonio) se obtuvieron los mejores valores de productividad específica (q_p), y la expresión de las tres enzimas (Lacasa, Mn-P y Li-P) a un pH inicial de 5,0; y concentraciones de 5,71 y 0,25 g/L de sustrato celulósico y sulfato de amonio respectivamente.

De igual forma se estudió el efecto de inductores como: alcohol veratrílico, dimetoxifenol y twen-80 sobre el medio de cultivo, favoreciéndose en todos los casos la expresión de la actividad para Lacasa y alcanzando los mejores valores de productividad específica, para el medio que contenía alcohol veratrílico.

* Tesis

** Facultad de ciencias, Escuela de Química; Rodrigo Torres Saez

SUMMARY

TITLE: EVALUATION OF AGRO-INDUSTRIAL WASTES AS SUBSTRATE IN THE PRODUCTION OF LIGNOLITIC ENZYMES, THROUGH SEMI-SOLID FERMENTATION TECHNIQS BY MUSHROOM OF THE BASIDIOMYCETES GENUS*

AUTHOR: SANDRA MILENA PINTO BOHORQUEZ**

KEY WORDS: *Pleurotus* spp., Ligninases, semisolid Fermentation, cellulosic substrates.

In this research it was carried out studies on production of lignolitic enzymes by semi-solid fermentation using the three reference strains: *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus pulmonaris* and the cellulosic substrates of wheat straw, corn-cob fibre and wheat bran; this later was used as reference substrate. Initially, the best ligninases-producer was selected, as well as the best agro-industrial substrate to laboratory scale. The comparison between the strain and the substrates permitted the selection of the *Pleurotus Ostreatus* and wheat straw. It was obtained a specific productivity q_p (U activity/g cell*hour) of $2,15 \cdot 10^{-3}$ for lacassa and $1,14 \cdot 10^{-2}$ for Manganese peroxidase and a production of reducing sugars of 0,161 g/ L to the 112 hours after that the fermentation was carried out.

At the same way, it was established the best induction condition of the culture medium for the microbial grown and the production of lignolitic enzymes through *Pleurotus ostreatus* on wheat straw. Taking into account the conditions of initial pH and the effect of the concentration of the carbon (wheat straw) and nitrogen sources (ammonium sulfate), it was obtained the best values of specific productivity (q_p), and the expression of the three enzymes (Lacassa, Mn-P y Li-P) to initial pH of 5,0; and concentrations of 5,71 and 0,25 g/L of cellulosic substrate and ammonia sulfate, respectively.

Moreover, it was studied the effect of inductors such as: veratryl alcohol, dimethoxyphenol and twen-80 on the culture medium, enhancing in all cases the expression of activity for lacasa and accomplish the best values of specific productivity, for the medium that contained veratryl alcohol.

* Thesis

** Science Faculty, Chemistry School; Rodrigo Torres Saez

INTRODUCCION

El empleo de desechos agroindustriales como sustrato en la producción de enzimas de interés industrial se convierte en una alternativa bastante atractiva, debido a que estos compuestos presentan grandes cantidades de celulosa, hemicelulosa, pectina y lignina, que son inductores en la síntesis de enzimas hidrolíticas (Raimbault. 1988; Ladisc, MR. 1979; Enari, M. 1990). Sin embargo, son pocos los microorganismos capaces de degradar lignocelulosa, los más efectivos son los del género *Basidiomycetes* pudridores de madera, particularmente los de pudrición blanca que atacan los componentes de la pared celular. Estos hongos son capaces de degradar eficientemente la lignina y son altamente especializados. Entre los hongos de pudrición blanca más estudiados se encuentran las especies de *Pleurotus* (Muñoz, Guillen. 1997).

El objetivo general de este trabajo de investigación fue la evaluación de la capacidad de los hongos del género *Basidiomycetes* de pudrición blanca *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii* y *Pleurotus pulmonaris* de crecer sobre desechos agroindustriales y producir las enzimas lignolíticas lacasa, manganeso-peroxidasa y lignina-peroxidasa; mediante la técnica de fermentación semi-sólida (FSsS).

El trabajo de investigación se realizó empleando biorreactores a nivel de matraces y empleando dos diferentes desechos agroindustriales, paja de trigo y tuza de mazorca, teniendo como sustrato de referencia el salvado de trigo. Se llevaron a cabo estudios de producción de ligninasas por fermentación semi-sólida utilizando el hongo filamentoso *P. ostreatus* (CBS 411,71).

Inicialmente se realizó la preselección del mejor sustrato celulósico y de la mejor cepa productora de ligninasas entre los tres hongos filamentosos y los sustratos

paja de trigo y tuza de mazorca en el medio de cultivo con sulfato de amonio y sales minerales.

La comparación entre las cepas y los sustratos, teniendo en cuenta los parámetros cinéticos obtenidos, permitió la selección de *P. ostreatus* y la paja de trigo, con los que se obtuvieron valores de productividad específica de 2.154×10^{-3} U/g_{célula}·día para lacasa y 1.14×10^{-2} U/g_{célula}·día para Mn-P a las 140 horas de llevada a cabo la fermentación.

Se estudió el efecto inductor de la fuente de carbono, fuente de nitrógeno y el pH a nivel de matraces con *P. ostreatus*, obteniéndose la expresión de Li-P en los tres casos, a diferencia de los resultados presentados en la fase inicial de preselección con este mismo sustrato, en la cual no se observó la expresión de dicha enzima. Estos resultados demostraron el carácter inducible de la producción de ligninasas.

Por otra parte, se evaluó el efecto de inductores como alcohol veratrílico y dimetoxifenol sobre la producción de las enzimas lignolíticas, de esta forma se obtuvieron los mejores niveles de expresión de la actividad de lacasa en los medios que contenían alcohol veratrílico con una concentración de 0.25mM, para lo cual se obtuvo 0.641 U/g_{célula}·día de productividad específica para lacasa y 9.5×10^{-2} U/g_{célula}·día para Mn-P. A su vez, la presencia de una concentración más alta de los inductores, 0.5 mM, en el medio de cultivo, produjo una inhibición en los niveles de actividad de las enzimas estudiadas por *P. ostreatus*.

Finalmente se evaluó el efecto de Tween 80 como surfactante sobre el medio de cultivo en dos niveles de concentración (0.01% y 0.1% p/v), induciendo la expresión de lacasa pero con valores más bajos de actividad que los obtenidos con alcohol veratrílico. Los resultados mostraron que es posible la producción de ligninasas por fermentación semi-sólida a nivel de matraces mediante el empleo

de la cepa *P. ostreatus* como microorganismo y paja de trigo como sustrato a un pH inicial de 5.0 en el medio de cultivo.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 INTRODUCCIÓN

La biotecnología ha recibido un creciente interés durante las últimas dos décadas debido a su potencial comercial en diversos campos. Una de las mayores ventajas de la biotecnología es su capacidad de llevar a cabo reacciones con alta especificidad, ofrecer procesos tecnológicos de producción limpia, ahorrar energía y desarrollar procesos biológicos alternativos a los procesos químicos.

Uno de los procesos en los cuales la biotecnología puede tener un gran potencial es en la degradación de residuos lignocelulósicos para su bioconversión a biomasa y enzimas de interés en el procesamiento de pulpa, papel, desarrollo de biosensores y degradación de compuestos contaminantes, entre otros (29).

No obstante, la accesibilidad de las enzimas a la madera y fibras de residuos lignocelulósicos es limitada, debido a factores tales como las áreas superficiales, baja porosidad y tamaño de poro de las fibras (30). Además, la organización molecular de los diferentes componentes de las paredes celulares de las fibras vegetales es otro factor limitante. De este modo, el uso apropiado de microorganismos y enzimas en el procesamiento de los compuestos lignocelulósicos requiere de un mejor conocimiento de la arquitectura molecular de los sustratos, mecanismos de acción enzimática, y métodos para el estudio de la degradación específica de cada componente de las fibras vegetales.

1.2 ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE LOS COMPUESTOS LIGNOCELULÓSICOS

Los compuestos lignocelulósicos tales como madera y residuos agroindustriales

son virtualmente inagotables. Ellos constituyen alrededor del 60% en peso de la biomasa total producida en el mundo. La producción fotosintética neta de biomasa seca en las plantas se ha estimado en alrededor de 155 billones de toneladas por año (30).

Tabla 1. Composición de algunas maderas y residuos lignocelulósicos agroindustriales (29)

Residuo	% Peso Seco
Hexosas	Pentosas
Lignina	Cenizas
Maderas Duras	
Abedul	4720230.2
Madera de Algodón	4619240.6
Roble	4818280.4
Alamo	4519200.1
Maderas Blandas	
Pino Blanco	4411280.1
Pino Jack	4110270.1
Arbol de Piña	578240.4
Abeto rojo	4312270.2
Abeto blanco	4410270.3
Residuos Agroindustriales	
Bagazo de caña	3330294
Desechos de cebada	40201511
Mazorca de Maíz	4239142
Paja de avena	41161112
Tallos de algodón	4212156
Cáscaras de nueces	3836165
Cáscaras de arroz	32241318
Paja de trigo	30241810

Fuente: Autora del proyecto

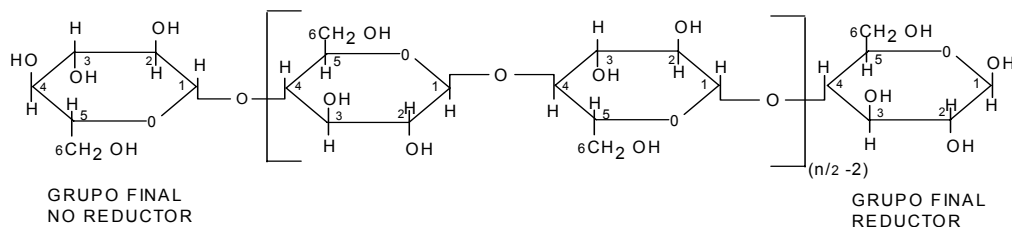
Los materiales lignocelulósicos se caracterizan por que poseen celulosa, hemicelulosas y lignina como sus principales constituyentes. La Tabla 1 muestra la composición de varios residuos agroindustriales, maderas duras y blandas. La composición varía notablemente entre los diferentes sustratos. En ella se observa

que el contenido de lignina es comparativamente mayor en las maderas blandas que en las maderas duras. Cabe destacar también el alto porcentaje de lignina en los residuos lignocelulósicos tales como el bagazo de caña.

La madera y los residuos lignocelulósicos están conformadas por células o fibras. La madera es un material poroso que consiste de una matriz de paredes de fibras y un espacio aéreo. El espacio aéreo existe mayormente en la formas de cavidades de fibras (lumen) y en una menor extensión que los espacios de las paredes de fibras. La pared de fibra posee tres constituyentes principales: celulosa, hemicelulosa y lignina.

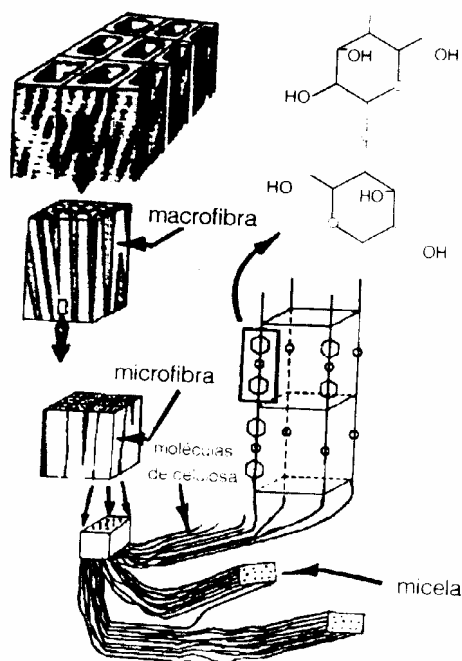
1.2.1 Estructura y composición de la celulosa. La celulosa es un homopolímero lineal de monómeros de glucosa unidos a través de enlaces β -1,4-glicosídicos (figura 1) (31). La fórmula condensada de la celulosa es $(C_6H_{10}O_5)_n$ donde n es el grado de polimerización (DP) que por lo regular es de 10.000. La celulosa es como un hilo, conformado por haces de moléculas formando fibrillas estabilizadas por enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de las cadenas adyacentes. El arreglo de las moléculas de celulosa en haces fibrilares es tan regular que adquiere un patrón estructural cristalino. Las cadenas de celulosa individuales son empaquetadas en grupos de cerca de 30 cadenas para formar microfibrillas, aproximadamente 100 de las cuales se empaquetan para formar fibrillas. Estas fibrillas se condensan para conformar las fibras de celulosa (Figura 2) (32).

Figura 1. Estructura Química de la celulosa



Fuente: Autora del proyecto

Figura 2. Estructura microscópica y submicroscópica de la celulosa



Fuente: Autora del proyecto

La celulosa posee cuatro tipos de estructura (Celulosa I-IV), las cuales se han determinado por patrones de difracción de rayos X (33). Celulosa I es la forma nativa de la celulosa en la pared celular secundaria. Esta puede convertirse en celulosa del tipo II y III por tratamientos físicos o químicos. La transición de celulosa I a celulosa II es irreversible. La celulosa IV es la estructura dominante en la pared celular primaria y se cree que posee una forma similar a la celulosa I pero más desordenada. Por otro lado, en la celulosa I las cadenas se arreglan parcialmente en forma de láminas plegadas estabilizadas por interacciones hidrofóbicas, fuerzas de Van der Waals e interacciones de hidrógeno (34).

El grado de cristalinidad de la celulosa depende de varios factores. Esta puede variar desde valores de 0% (celulosa amorfa y tratada con ácido) hasta un 100% (Celulosa del alga *Valonia macrophysica*) (35). El grado de cristalinidad de la

celulosa del algodón es cercano al 70%, mientras que para celulosas comerciales varía de 30-70% (36). Sin embargo, las formas cristalinas de la celulosa no son aún completamente entendidas. Una característica importante es que la celulosa es altamente resistente al ataque microbiano e hidrólisis enzimática, mientras que la celulosa amorfa se degrada mucho más rápido (10).

1.2.2 Estructura y composición de la hemicelulosas. Las hemicelulosas son fácilmente hidrolizables a cadenas cortas de heteropolisacáridos ramificados compuestos tanto de hexosas como de pentosas. D-xilosa y L-arabinosa son los principales constituyentes de los pentosanos (xilanos), mientras de D-glucosa, D-galactosa, y D-manosa son los principales constituyentes de los hexosanos (mananos). Se ha encontrado que las maderas blandas están compuestas principalmente de manano, mientras que las maderas duras de xilano.

La estrecha asociación de las hemicelulosas con celulosa y lignina en las fibras de la pared celular contribuye a su rigidez y flexibilidad. Las hemicelulosas están compuestas de azúcares neutros (por ej. Xilano, arabano, glucano, galactano y manano) y ácidos urónicos. La hemicelulosa constituye alrededor del 25% de las maderas y se encuentra en un 30% en varios residuos agroindustriales (37,38). Los valores de DP en la hemicelulosa varían de 100-200. La mayoría de las hemicelulosas está construidas por enlaces β -1,4 entre sus monómeros de azúcar. Sin embargo, las hemicelulosas formadas con base en galactosa que están β -1,3 enlazadas.

El principal tipo de hemicelulosa es el xilano. Este se encuentra en grandes cantidades en plantas y árboles de estación, y en menor cantidad en coníferas. Se ha encontrado también en cereales y hierbas los cuales presentan xilanos formados por D-xilosa unido a L-arabinosa (39). El xilano conforma el 15-30% de plantas estacionales, 20-25% de maderas duras y 7-12% de maderas blandas. Se ha propuesto que el xilano constituye una interface entre la lignina y otros

carbohidratos en muchos complejos fenólico-carbohidrato (40,41), donde ellos estarían probablemente unidos a los residuos fenólicos a través de residuos arabinosil (42) y/o glucuronosil (43).

Los xilanos tienden a absorber celulosa y agregarse con otros componentes hemicelulósicos, probablemente como resultado de interacciones de tipo hidrógeno (44). Se ha visto también que el xilano puede jugar un rol en la cohesión de la pared celular puesto que su remoción selectiva desde maderas delignificadas aumenta la porosidad de las fibras (45).

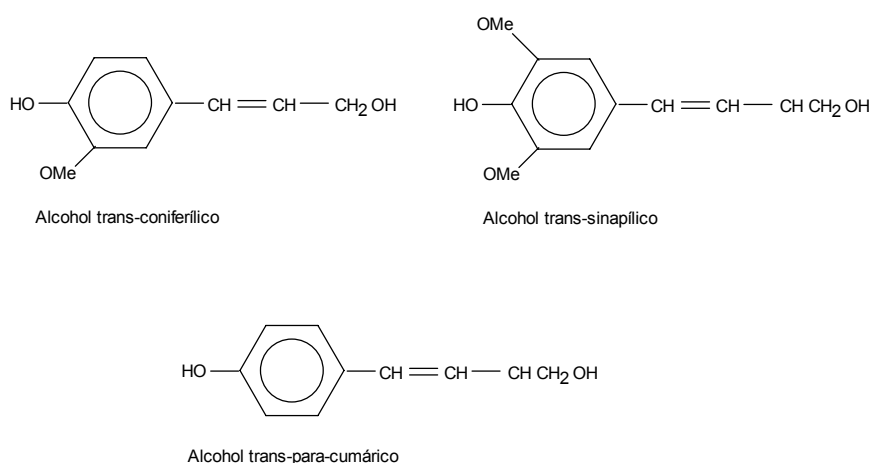
1.2.3 Estructura y composición de la lignina. Después de la celulosa, la lignina es uno de los biopolímeros más abundantes del planeta. Su peso molecular puede alcanzar 100 kDa o más (46). A su vez, se dedica una parte considerable de la maquinaria fotosintética de las plantas a la producción de lignina a partir de dióxido de carbono. Se ha estimado que en la tierra se generan alrededor de unas 2×10^{10} toneladas al año (10,46).

Su ubicación estructural en la pared de las células vegetales se encuentra en la *lamela media* pero es más abundante en las paredes secundarias de las plantas vasculares (47). La lignina posee funciones importantes en la vida de las plantas. Se ha sugerido que: favorece la adhesión de las células vegetales, actúa como antioxidante y estabilizador de la radiación UV y protector contra el ataque microbiano. Posee además propiedades de reducir la permeabilidad del agua, lo cual le permite jugar un rol importante en el transporte interno de agua, nutrientes y metabolitos en la planta (46).

La lignina está compuesta por moléculas poliméricas altamente ramificadas y formada por unidades monoméricas de fenil-propano (figura 3) unidas por diferentes tipos de enlace tales como: alquil-aril, alquil-alquil y aril-aril éter. Su estructura es extremadamente compleja (figura 4) y la dificultad en su estudio se

debe principalmente a la dificultad en aislar moléculas intactas de lignina. Se ha sugerido que sus enlaces hidrolizables son de dos tipos: β -aril eter y α -aril éter (48).

Figura 3. Precursores primarios de la lignina



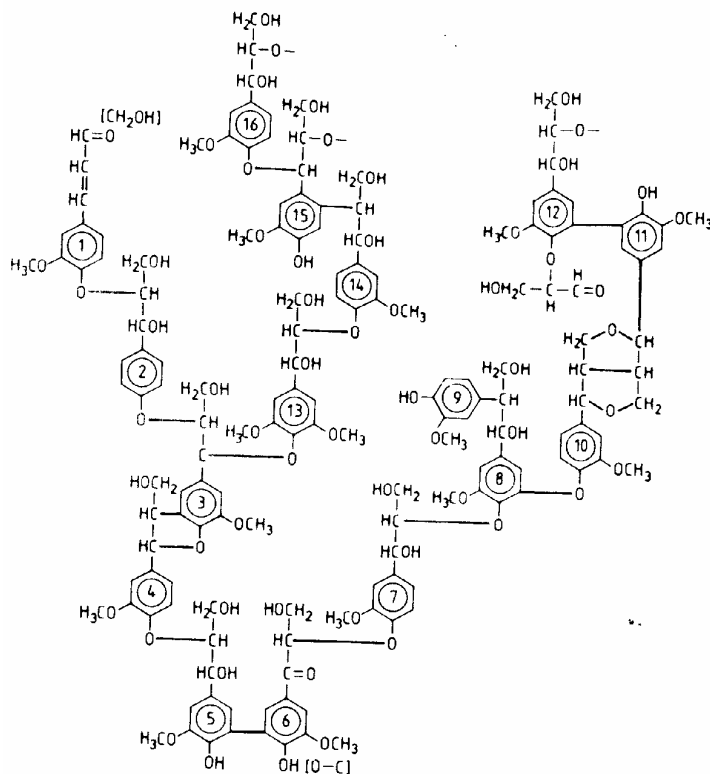
Fuente: Autora del proyecto

Las ligninas presentan una estructura polimérica amorfa que no posee cristalinidad (49). Son insolubles en agua, lo cual hace que sea difícil que los microorganismos puedan penetrarla y degradarla. Además, son generalmente estables en ácido, aunque pueden ser solubilizadas bajo condiciones alcalinas.

La lignina se asocia estrechamente a celulosa y hemicelulosa mediante enlaces covalentes (34). Por ejemplo, se unen a glucoronoxilanos de la hemicelulosa a través de enlaces bencil-éster (43). También se han encontrado enlaces covalentes entre las cadenas laterales de L-arabinosa o xilosa y ligninas a través de enlaces eter (50). Muchos estudios han sugerido que los sustituyentes del esqueleto de las hemicelulosas tales como arabinosa, galactosa y ácido 4-O-metil-galacturónico se enlazan a lignina. No obstante, algunas moléculas de lignina

aisladas a partir de maderas contienen significantes cantidades de proteínas ricas en residuos de glicina, prolina e hidroxiprolina (51).

Figura 4. Modelo esquemático de la lignina de abeto



Fuente: Autora del proyecto

1.3 MICROORGANISMOS INVOLUCRADOS EN LA DEGRADACIÓN DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS

Los residuos lignocelulósicos son degradados por una amplia variedad de hongos y bacterias. La estructura tridimensional y la composición química de los materiales lignocelulósicos juegan un rol importante en la resistencia a la degradación por microorganismos.

Hongos. Los grupos de hongos más importantes lo constituyen los del género; **Ascomycetes**, **Deuteromycetes** y **Basidiomycetes**. Dependiendo de cómo degraden uno o más componentes de la madera viva o muerta se clasifican en hongos de pudrición suave, parda y blanca (10,12).

Se destacan entre los hongos de pudrición suave: **Aspergillus niger**, **Fusarium Oxysporum**, **Trichoderma viride (reesei)** y **Chaetomium cellulolyticum**, entre otros (10,29). Los hongos de pudrición suave degradan carbohidratos de la madera pero modifican muy poco a la lignina. Su característica principal es la formación de cadenas bicónicas y cavidades cilíndricas dentro de la pared secundaria de las células vegetales. En general los hongos de pudrición suave degradan más rápido maderas duras que maderas blancas (52).

Entre los hongos de pudrición parda se destacan **Poria placenta**, **Tyromyces balsemeus**, **Comiophora puteana**, **Gloeophyllum trabeum**, entre otros (10,29). Ellos muestran mayor capacidad de biodegradación de celulosa y hemicelulosa, mientras que lignina es parcialmente degradada. Estos hongos degradan celulosa a una alta velocidad y sus hifas se localizan normalmente en el lumen de las células de madera y penetran células adyacentes (10,12,29). A pesar de que los hongos de pudrición parda degradan los carbohidratos contenidos en la madera, la mayoría de ellos son incapaces de degradar y utilizar celulosa en forma pura, particularmente en cultivos de fermentación sumergida (29).

Los hongos de pudrición blanca pueden atacar todos los componentes de las paredes de las células vegetales. Los hongos más característicos de este grupo son: **Phanerochaete chrysosporium**, **Trametes versicolor**, **Dichomitus squalens**, **Phlebia radiata**, **Heterobasidium annosum**, **Phellinus pini**, **Pleurotus ostreatus**, **Polyporus anceps** y **Ustulina vulgaris** (10,29,53). La mayoría de los hongos pertenecen al género de los **Basidiomycetes** a excepción de **Ustulina vulgaris** que es **Ascomycete**. Estos hongos son capaces de atacar

simultáneamente las fracciones de celulosa, hemicelulosa y lignina de las paredes de las células vegetales (10).

Algunos de los hongos de pudrición blanca tales como ***P. chrysosporium*** y ***T. versicolor*** poseen un modo no-selectivo de degradación de la madera, mientras que otros como ***Phlebia radiata*** degradan la lignina de una manera más selectiva (54). Los hongos de pudrición blanca crecen en los diferentes tipos de maderas duras y blancas. Las hifas fungales entran en el lumen de la células colonizando primero las células parenquimales y luego penetran célula a célula (10).

Se ha descrito que los hongos anaeróbicos que habitan el tracto intestinal de animales herbívoros juegan un rol importante en la degradación de los compuestos lignocelulósicos. Los hongos anaeróbicos degradan los polisacáridos pero no utilizan la lignina. Entre los hongos más estudiados se encuentran, ***Neocallimastix frontalis***, ***Pyromyces communis*** y ***Caecomyces communis*** (55,56). Las hifas de los hongos crecen extensamente y se ramifican al interior de la pared celular de los vegetales causando su rompimiento físico (57). Esto se debe principalmente a la producción de enzimas extracelulares tales como celulasas, hemicelulasas, proteasas y amilasas (58).

Bacterias. Este tipo de microorganismos degradan generalmente la madera lentamente. La degradación de la madera se lleva a cabo en la superficie de maderas con alto contenido de humedad. Atacan generalmente con los hongos de forma simultánea la madera, colonizando principalmente las células parenquimales (59). Bacterias ruminales son los principales degradadores de las paredes células de fibras vegetales (29). Se han estudiado algunas bacterias tales como: ***Fibrobacter succinogenes***, ***Ruminococcus albus*** y ***flivifaciens*** (29). Estas especies se adhieren fuertemente a paredes de células vegetales parcialmente degradadas.

Algunos tipos de **Actinomyces** (eubacterias filamentosas) degradan también activamente materiales lignocelulósicos. Se han reportado diferentes especies de **Streptomyces** capaces de colonizar vesículas, fibras y células parenquimales (60).

1.3.1 Microorganismos degradadores de Lignina. La lignina es degradada por diferentes tipos de microorganismos, de los cuales los hongos pudridores de madera son los más efectivos, especialmente los de pudrición blanca (10,12). Los hongos de pudrición blanca degradan predominantemente madera por ataque simultáneo sobre la lignina, celulosa y hemicelulosa, pero unos pocos hongos son específicos para lignina (10). Estos microorganismos producen una serie de enzimas oxidativas extracelulares (Tabla 2). Las enzimas más importantes son Mn-peroxidasa, Lignina Peroxidasa y lacasa. (12, 29, 61-66).

La regulación de la producción de las enzimas es un proceso bastante complejo. Los efectos de condiciones de cultivo y nutricionales en la degradación de lignina y producción enzimas lignolíticas han sido estudiadas por varios grupos en el mundo (10). El rol de factores tales como Mn sobre la degradación de lignina y producción de las enzimas no ha sido totalmente comprendido. Durante los estudios de degradación, Mn se ha encontrado depositado en la madera blanca podrida (10,67), y se ha reportado que juega un rol regulatorio en la degradación de lignina y la expresión de lacasa, Mn-P y Li-P (68,69).

Los Hongos de pudrición suave degradan eficientemente polisacáridos de la madera pero metabolizan la lignina lenta e incompletamente (29). La mayoría de los hongos suaves producen enzimas las cuales demetoxilan ácido vanílico en la presencia de NADH y oxígeno para formar ácidos orgánicos y formaldehído (70). Aunque estos hongos han mostrado ser capaces de demetoxilar lignina en la madera, no se ha demostrado demetoxilación de ligninas puras.

Tabla 2. Tipos de Enzimas oxidativas producidas por hongos de pudrición blanca

Enzimas oxidativas				
Hongos de pudrición blancaLi-PMn-PLacasaAAO				
<i>Coriolus versicolor</i>	x	x		x
<i>Cyathus bulleri</i>	x	x		x
<i>Oudemansiella radicata</i>	x			x
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	x			x
<i>Phlebia rediviva</i>	x	x		x
<i>Phlebia tremellosa</i>	x			x
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	x	x		x
<i>Pleurotus eryngii</i>	x	x	x	x
<i>Pleurotus floridae</i>				
<i>Pleurotus ostreatus</i>	x	x	x	x
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	x	x	x	x
<i>Trametes versicolor</i>	x	x	x	x
<i>Bjerkandera adusta</i>	x	x		x
Li-P: Lignina Peroxidasa, Mn-P: Manganese Peroxidasa, AAO: Aril alcohol oxidasa X: Indica presencia de actividad enzimática				

Fuente: Autora del proyecto

Los hongos de pudrición parda prefieren degradar madera de coníferas. Entre los hongos degradadores de lignina se destacan las especies de **Polyporus** (53). Estos hongos causan extensa degradación de los polisacáridos, pero degradan parcialmente la lignina (29). Los cambios que se producen por la degradación son: demetoxilación, hidroxilaciones aromáticas y oxidaciones limitadas de cadenas laterales.

Las bacterias también son capaces de degradar lignina. Muchos de los estudios se han basado en *Pseudomonas* y *Actinomyces* filamentosos (71). Las bacterias degradan en poca extensión a la lignina de los materiales lignocelulósicos, aunque se ha demostrado que **Actinomyces** son capaces de

mineralizar lignina completamente, pero a una menor velocidad que los hongos de pudrición blanca (72).

1.4 ENZIMAS LIGNOLÍTICAS

El complejo sistema enzimático de las ligninasas está conformado por; peroxidasas, lacasas y oxidasas productoras de H_2O_2 . Dentro de estas enzimas las lacasas y peroxidasas se definen como fenol oxidasas (10). Las reacciones catalizadas por estas enzimas son muy similares. Ellas oxidan compuestos fenólicos creando radicales fenoxilos mientras que los compuestos no-fenólicos son oxidados a sus cationes radicales correspondientes (13,74-75). Entre las enzimas de tipo peroxidasa cabe destacar Li-P y Mn-P de *Phanerochaete chrysosporium* las cuales ya han sido cristalizadas y determinadas sus estructuras tridimensionales (76-78). Estos estudios han mostrado que Mn-P presenta un alto grado de similitud estructural con Li-P (79).

1.4.1 Lignina Peroxidasa (Li-P). Esta enzima (ligninasa, EC 1.11.1.14) se descubrió en cultivos lignolíticos de *P. chrysosporium* (17,80), y parece ser la enzima de mayor proporción en el complejo enzimático de las ligninasas. Li-P cataliza una amplia variedad de reacciones, por ej. , rompimiento de enlaces β -O-4 eter y C_α - C_β de compuestos modelos diméricos de lignina. La enzima cataliza también la decarboxilación de ácido fenilacético, oxidación de alcoholes C_α -aromáticos a compuestos C_α -oxo-aromáticos, hidroxilación, formación de quinonas y apertura de anillos aromáticos (81).

Li-P oxida sus sustratos por dos pasos consecutivos de oxidación de un electrón, con la formación de cationes radicales. La enzima posee un ciclo catalítico similar al de la peroxidasa de rábano (82-84). En el ciclo catalítico el Fe (III) unido a la fracción proteica de Li-P es oxidado por H_2O_2 al compuesto I y luego se produce la reducción del compuesto I con alcohol veratrilico (85) al compuesto II.

Debido a su alto potencial redox, Li-P puede catalizar la oxidación de subunidades de lignina sustituidas con grupos metoxi. Esto ha llevado a utilizar a Li-P en reacciones de oxidación de compuestos xenobióticos (8,9,86,87). La enzima puede depolimerizar soluciones diluidas de lignina (88), oxidar y degradar una variedad de dímeros y oligómeros similares a lignina *in vitro* (74) y catalizar la producción de especies activadas (89).

Algunas de las funciones industriales de esta enzima están relacionadas con los procesos de blanqueamiento de pulpa de madera, tratamiento de efluentes azucareros, decoloración y detoxificación de contaminantes ambientales (64).

1.4.2 Manganeso Peroxidasa (Mn-P). La manganeso peroxidasa, es también una glicoproteína perteneciente al grupo de las hemo-peroxidases (EC 1.11.1.13; Mn(II):H₂O₂ oxidoreductasa), (62). Esta peroxidasa se encuentra en los cultivos lignolíticos de *P. chrysosporium* y fue descubierta por Kuwahara y colaboradores (90). La enzima actúa exclusivamente como una fenoloxidasas de sustratos fenólicos usando Mn⁺²/Mn⁺³ como un intermediario redox. Se ha demostrado que Mn-P es también capaz de producir H₂O₂ en la oxidación de glutatión, NADPH y ácido dihidroximálico (75). Sin embargo, esta enzima está involucrada en la oxidación de fenoles y estructuras fenólicas de la lignina. Su acción es oxidar Mn(II) a Mn(III) en la presencia de un agente quelante (91). Los agentes más utilizados por los hongos de pudrición blanca son ácidos orgánicos tales como ácido malónico, pirúvico, oxálico y málico (75,91). Mn-P posee un ciclo catalítico muy similar al de Li-P. Sin embargo, el compuesto II es literalmente reducido por Mn⁺² a la enzima nativa para completar el ciclo catalítico. Recientemente se han detectado altos niveles de Mn-P en cultivos de *P. Eryngii*.

Se ha reportado que Mn-P puede oxidar estructuras fenólicas y de lignina y degradar cloroligninas de alto peso molecular (73,92). También es capaz de

depolimerizar moléculas de lignina al romper enlaces C_{α} - C_{β} o alquil-fenilos. Se ha observado en cultivos de *P. chrysosporium* que Mn-P actúa en forma concertada con Li-P para oxidar sub-estructuras de lignina, lo cual la hace un buen sistema para la degradación de residuos agroindustriales ricos en contenido de lignina (73). También puede atacar estructuras no-fenólicas vía peroxidación lipídica (93).

1.4.3 Lacasa. Las lacasas (Bencenodiol: O_2 oxidoreductasa, EC 1.10.3.2) parecen jugar un rol importante en la degradación de lignina. Esta enzima es producida por hongos de pudrición blanca. Se conocen variantes de la enzima en sus formas constitutiva e inducible (94, 96-98). Son glicoproteínas y pertenecen a la familia de Cu-oxidasas azules catalizando la oxidación de compuestos fenólicos y aminas aromáticas con la correspondiente reducción de oxígeno molecular a agua (21,99). Se consideran fenoloxidasas con una especificidad amplia hacia compuestos aromáticos que contienen grupos aminos e hidroxilos (95). Estas enzimas han sido aisladas a partir de varios hongos y sus funciones bioquímicas se han discutido ampliamente (15,21,22). La enzima oxida fenoles y subestructuras fenólicas por la abstracción de un electrón con la formación de radicales que pueden llevar a la repolimerización o depolimerización (100).

Las lacasas catalizan la demetoxilación de unidades fenólicas terminales. Pueden degradar β -dímeros y β -O-4-dímeros vía rompimiento de enlaces: alquil-aril a través de oxidación C_{α} y rompimiento de enlaces C_{α} - C_{β} (95). Esta enzima al igual que Li-P es capaz de catalizar el rompimiento de anillos aromáticos (101). Hasta 1990, se había considerado que la lacasa era capaz de degradar solo compuestos fenólicos modelos (100). Sin embargo, a mediados de los 90's se demostró que lacasas de *T. versicolor* eran capaces de oxidar ligninas no-fenólicas en presencia de mediadores redox adecuados (102).

La actividad enzimática de lacasa en cultivos con *Basidiomycetes* puede incrementarse por la adición al medio de cultivo de compuestos aromáticos en concentraciones bajas (146).

Aunque el conocimiento de las reacciones de transferencia de electrones que ocurren en lacasas es amplio, se conoce relativamente poco acerca de las funciones fisiológicas de estas enzimas. Lacasas han sido implicadas en los procesos de pigmentación (23), patogenicidad (24) y biosíntesis y degradación de lignina (15,25). No obstante, muy pocas de estas funciones metabólicas se han comprobado experimentalmente, y solo debido a la disponibilidad de secuencias de múltiples genes y datos cristalográficos ha sido posible especular acerca de como las relaciones estructura-función pueden jugar un rol importante en sus funciones específicas. Una de estas especulaciones ha involucrado las aparentes funciones contradictorias de las lacasas en la síntesis y rompimiento de lignina (15,25).

1.5 PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIGNOLÍTICAS POR FERMENTACIÓN

La producción de enzimas extracelulares tales como las ligninasas a partir de sustratos agroindustriales se puede llevar a cabo tanto por fermentación sumergida como por fermentación en sustrato sólido (1-3,103,104).

Los estudios en fermentación sumergida con hongos de *Basidiomycetes* permiten un mayor control de las condiciones ambientales, aunque con hongos filamentosos la mayor limitación se presenta al nivel de transferencia de masa, debido al aumento considerable de la viscosidad de los caldos de cultivo. Por otro lado, la producción de enzimas por fermentación en sustrato sólido presenta muchas ventajas tales como: mayor productividad volumétrica, menores requerimientos energéticos, manejo operacional simple y mejor recuperación de los productos de fermentación (105). Una de las mayores ventajas es la reducción

de los costos de fermentación por el uso de grandes cantidades de sustrato sólido, aunque a veces se presentan problemas para el control y monitoreo de parámetros ambientales (106).

La mayor cantidad de estudios de producción de enzimas lignolíticas se han realizado a partir del hongo ***P. chrysosporium*** bajo diferentes modalidades de cultivo y tipos de fermentación (12, 62, 107-109). En estos estudios se ha observado que la limitación por nitrógeno (N) es el factor que gatilla el complejo enzimático de degradación de lignina, aunque se ha visto que la limitación por carbono (C), azufre (S) y manganeso (Mn) puede también provocar una activación de la producción de ligninasas (12,107). La degradación de lignina no ocurre con la presencia de co-sustratos rápidamente metabolizables, lo cual sugiere que las enzimas lignolíticas están sometidas a represión catabólica (12).

P. chrysosporium es un hongo filamentoso, y cuando crece en cultivos líquidos agitados forma pellets. Éstos son formados por la agregación de las esporas inmediatamente antes y durante la germinación del hongo (110). Las enzimas Li-P y Mn-P se producen durante el metabolismo secundario y como se mencionó antes bajo limitación por nitrógeno (12,111,112). Los cultivos sumergidos agitados de ***P. chrysosporium*** forman pellets miceliales que suprimen la degradación de lignina y bajan la producción de Li-P (113). Es por ello que la producción en fermentaciones sumergida depende esencialmente del tamaño del inóculo que determina la forma de los pellets.

También se ha llevado a cabo la producción de las ligninasas en biorreactores empacados con soportes inertes tales como poliuretano y nylon de manera de inmovilizar los hongos y aumentar los valores de productividad de las enzimas Mn-P y lacasa (109,139). Sin embargo, pocos estudios se han llevado a cabo para la producción continua de enzimas lignolíticas (139-141).

Se han realizado también estudios de biodegradación utilizando hongos del género ***Pleurotus*** para la remoción de lignina de madera, paja de trigo y arroz (129, 131, 137). Se ha demostrado que el Mn(II) estimula la mineralización de lignina en fermentaciones en sustrato sólido de ***Pleurotus pulmonaris***.

Adicionalmente a la producción de Li-P y Mn-P, los últimos estudios de fermentación en estado sólido y sumergido se han enfocado a la producción de lacasa y aril alcohol oxidasa (AAO). Las lacasas se han aislado de varios tipos de hongos (29). No obstante, se ha estudiado la producción de las enzimas por hongos del género ***Pleurotus spp.*** Por ejemplo, ***Pleurotus eryngii*** y ***Pleurotus ostreatus*** producen lacasas y AAO tanto bajo condiciones de fermentación sumergida como en fermentación por sustrato sólido (129,131). También se ha descrito la producción de lacasas por hongos del género ***Trametes versicolor*** en cultivos sumergidos con presencia de mediadores como ABTS o bajo la presencia de colorantes de tipo azo (138,127, 139).

1.6 POSIBILIDADES BIOTECNOLÓGICAS DE LAS ENZIMAS LIGNOLÍTICAS

Las enzimas lignolíticas producidas por hongos de pudrición blanca poseen un espectro amplio de especificidad de sustratos y pueden ser usadas en diferentes áreas de procesos industriales tales como: manufactura de pulpa y papel, revalorización de subproductos agroindustriales y manejo de desechos (Tabla 3).

Se ha estudiado el uso de las enzimas lignolíticas en el procesamiento de pulpa (bioblanqueo) (114). Con mezclas de enzimas lignolíticas se ha reducido hasta un 20-30% el número Kappa de pulpas de celulosa, con la correspondiente reducción de uso de cloro en los procesos de blanqueo (115). Para ello se han usado enzimas como; Mn-P, Li-P y lacasa (116-118).

Las enzimas lignolíticas pueden usarse también en procesos de decoloración de efluentes contaminados con colorantes (119-121). Se ha usado para este propósito Li-P y lacasa como también Mn-P de diversos tipos de hongos de pudrición blanca (122). Se ha demostrado también el uso de las enzimas de ***P. chrysosporium*** en la degradación de contaminantes y xenobióticos. Se han oxidado compuestos fenólicos halogenados para formar productos poliméricos y oligoméricos, usualmente menos tóxicos que las moléculas originales. Los hongos de pudrición blanca son también capaces de degradar un gran número de compuestos contaminantes (27,87). Estos hongos se caracterizan por tolerar y/o detoxificar algunos pesticidas como mezclas de químicos a concentraciones que serían tóxicas para otros microorganismos (87).

Estos hongos y sus enzimas se han usado también para detoxificar pentaclorofenol y bifenilos policlorados (PCB's) en matrices sólidas y líquidas (123,124). La detoxificación de fenol se lleva a cabo principalmente por polifenol oxidasas las cuales demetilan y deshalogenan polifenoles sustituidos con cloro (87). Se ha logrado reducir hasta un 80% de las concentraciones de PCP en suelos contaminados con el uso de los hongos ***P. chrysosporium*** y ***T. versicolor*** (124). Se ha investigado también la capacidad de las enzimas lignolíticas en biotransformar hidrocarburos poliaromáticos (PAH's) (125,27). Se ha trabajado con lacasas de ***Pleurotus spp.***, ***Trametes versicolor*** y Li-P de ***P. chrysosporium***, las cuales pueden oxidar por ejemplo el pireno y benzopireno en reacciones llevadas a cabo en fase orgánica (126,127).

Tabla 3. Aplicaciones potenciales de las enzimas y microorganismos lignolíticos (29)

Área Industrial	Campo de Aplicación
Alimentos	Producción de hongos comestibles, mejoramiento de la digestibilidad de madera y residuos agroindustriales para alimentación animal.
Pulpa y Papel	Biopulpaje y bioblanqueo de pulpa de celulosa, modificación de fibras de la pulpa, delignificación de chips de madera para reducir consumo de energía mecánica y química en el pulpaje de celulosa.
Química	Modificación de ligninas aisladas para producir compuestos fenólicos
Ambiental	Tratamiento de licores de plantas de pulpa kraft, biodegradación de contaminantes tales como hidrocarburos poliaromáticos (PAH's), bifenilos policlorados (PCB's), y dioxinas.
Analítica	Desarrollo de biosensores para la detección de celodextrinas, medición de superficies de fibras de celulosa detección de sustratos fenólicos y contaminantes.

Fuente: Autora del proyecto

El potencial de los hongos de pudrición blanca se ha ampliado también al procesamiento de residuos lignocelulósicos para la producción de alimentos (128). Se ha logrado disminuir el contenido de lignina con hongos del género ***Pleurotus*** y aumentar considerablemente la digestibilidad de los residuos agroindustriales (129-131). En consecuencia, se puede ver el gran potencial de los hongos de pudrición blanca y sus enzimas en diversos procesos biotecnológicos. Las aplicaciones futuras dependerán de la valorización los recursos biológicos disponibles y la optimización de los procesos biotecnológicos relacionados con el crecimiento de los hongos, técnicas y de cultivo y producción de enzimas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIALES

2.1.1 Microorganismos. Se estudiaron los parámetros cinéticos de tres hongos del género *Basidiomycetes*. de pudrición blanca: *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonaris* y *Pleurotus eryngii* donadas por el Centro de Investigaciones Biológicas, CIS-CSIC (Madrid, España). Los microorganismos se seleccionaron por su capacidad de producción de enzimas lignolíticas, presentando un óptimo crecimiento a un pH entre 4.5 – 5.0 (3) y una temperatura de 28 °C.

2.1.2 Sustratos. Las experiencias de fermentación se realizaron utilizando como sustratos insolubles desechos agroindustriales, provenientes de zonas aledañas a la ciudad de Bucaramanga. Los sustratos utilizados fueron el salvado de trigo como sustrato de referencia; la paja de trigo, y la tuza de mazorca como sustratos de prueba. Estos sustratos son producto de desecho de las cosechas del trigo y la mazorca, respectivamente. Con el fin de obtener un material particulado de características físicas definidas, los sustratos fueron secados al aire y posteriormente se redujo el tamaño de partícula en un molino de cuchillas utilizando mallas de 2 mm. El material que salió del molino fue pasado por una serie de tamices serie Tyler, para escoger la fracción que queda entre la malla 40 y 60 que corresponde a un tamaño de partícula de 800 micras. Para mantener constante la humedad residual el material fue empacado en recipiente cerrado. La caracterización del material obtenido, en cuanto a su composición elemental, contenido de celulosa y lignina se presentan en las tablas del anexo A.

2.1.3 Reactivos. Para el desarrollo de las experiencias se emplearon los siguientes reactivos de grado analítico: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, MnSO_4 , CaCl_2 , CuSO_4 (Merck) en la preparación de los medios de cultivo. Tartrato de sodio y tartrato de potasio (J.T. Baker) como buffer y agar papa dextrosa (Merck) para conservar las cepas en tubo. Como surfactante se empleó Tween 80, Alcohol veratrílico (Merck) y 2,5 Dimethoxybenzil alcohol (Fluka) como agentes inductores.

Los sustratos utilizados para la determinación de las actividades enzimáticas fueron ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)), Guayacol de Sigma Co y, alcohol veratrílico de Merck (Darmstadt, Germany).

2.2 METODOLOGIA ANALITICA

2.2.1 Determinación de azúcares reductores. Método DNS (Miller, 1959). La determinación de azúcares reductores se realizó a través del método colorimétrico del ácido dinitrosalicílico (DNS). Este método se seleccionó por ser rápido y reproducible.

La determinación de la concentración de azúcares reductores se obtuvo a partir de la recta obtenida al realizar la curva de calibración (ver anexo B) que correlaciona la absorbancia medida a 540 nm con la concentración de glucosa. Los patrones fueron preparados con D-glucosa de Merck.

Preparación del reactivo DNS

- Pesar 8 g de NaOH y disolverlos en 250 mL de agua destilada y 150 g de tartrato de sodio y potasio.
- Agregar 5 g de DNS (marca Merck) bajo calentamiento.
- Aforar a 500 mL con agua destilada.
- Almacenar a temperatura ambiente y proteger de la luz.

Procedimiento

- Agregar 1ml de reactivo a 1ml de muestra usando tubos tapa rosca.
- Poner a ebullición durante 5 minutos en baño con agua.
- Detener la reacción en un baño con hielo.
- Agregar 10 mL de agua destilada y dejar en reposo durante 15 min.
- Medir la absorbancia óptica a 540 nm contra un blanco obtenido con el procedimiento anterior, pero agregando agua destilada en lugar de muestra.

2.2.2 Determinación de proteína extracelular. (Bradford, 1976). La determinación de proteínas excretadas por los microorganismos y que se encuentran en el caldo de cultivo se realizó mediante el método colorimétrico de Bradford. Este método se utilizó por ser rápido, reproducible y sensible para cuantificar proteínas en un intervalo de 10 – 100 mg/l, sin presentar interferencias por la presencia de aminoácidos y carbohidratos en el medio de cultivo.

La concentración de proteína se obtuvo a partir de la ecuación de la recta obtenida al realizar una curva de calibración (Anexo C) que correlaciona la concentración de Bobin Serum Albumin de Merck con la absorbancia a 595 nm.

Reactivo de Bradford

- Pesar y disolver 100 mg de azul brillante de Coomassie G-250 en 50 mL de etanol.
- Agregar lentamente con agitación 100 mL de ácido fosfórico al 85%.
- Diluir la solución resultante a un volumen final de 1 L.

Procedimiento

- Agregar 5 mL de reactivo Bradford a 0.5 mL de una muestra de solución de proteína en un rango entre 0 y 80 mg/L.

- Homogeneizar la mezcla esperar 2 min para leer la absorbancia a 595 nm contra un blanco de reactivo preparado con agua destilada.
- La concentración de proteínas se expresa en mg de proteína por litro de caldo libre de células.

2.2.3. Determinación de la concentración celular (Stickland, 1954). Debido a que en la realización de los ensayos todavía quedan restos de sustratos insolubles sin transformar y a la forma física de crecimiento de los microorganismos (formación de pellets), Fue difícil determinar de la concentración celular, por lo tanto, ésta se realizó mediante la utilización de un método indirecto que se basa en la proporcionalidad entre la absorbancia y la concentración de la proteína celular dentro de un rango determinado de linealidad. Este método resultó lo suficientemente sensible y no presentó interferencias con ninguno de los componentes del medio.

Para calcular la concentración de biomasa obtenida a partir de la curva de calibración que relaciona proteína vs absorbancia, se tuvo en cuenta el factor que resulta de la diferencia que se presenta entre el contenido de proteína obtenido y el peso seco de un volumen conocido de muestra (teniendo en cuenta que solo un porcentaje de la célula corresponde a proteína).

Para obtener los valores de concentración de proteína celular en las muestras se utilizó una curva de calibración (ver Anexo D) que correlaciona la absorbancia a 540 nm y la concentración de proteína celular para cada una de las cepas utilizadas. A su vez estas curvas se obtuvieron previamente correlacionando la absorbancia a 540 nm y la concentración de albúmina a 540 nm (ver anexo E).

Procedimiento

- Centrifugar 15 mL de cultivo de un determinado crecimiento a 1200 r.p.m. en centrífuga durante 15 min.

- Retirar el sobrenadante y lavar los sedimentos celulares con agua destilada.
- Centrifugar nuevamente y lavar los sólidos celulares al menos tres veces para evitar interferencias con la proteína extracelular y los iones amonio que reaccionan con el cobre del reactivo.
- Preparar las muestras diluyendo en agua destilada el sedimento celular previamente lavado a distintas concentraciones y con un contenido sobre 5 mg en peso seco. Para determinar el factor que correlacione la concentración de proteína determinada con la concentración de biomasa se realiza el mismo procedimiento y se determina peso seco de las muestras.
- Llevar 4.2 mL de muestra a un tubo de ensayo y adicionar 0.75 mL de una solución de NaOH al 20%.
- Calentar hasta ebullición, en baño durante 5 minutos y dejar enfriar.
- Adicionar 0.125 mL de una solución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 25 % p/v.
- Llevar nuevamente a centrifugar durante 5 minutos para eliminar el hidróxido de cobre que precipita.
- Leer densidad óptica a 540 nm contra un blanco obtenido con el procedimiento anterior pero agregando agua destilada en lugar de muestra.
- Interpolar los valores de absorbancia obtenidos en la curva de calibrado que relaciona absorbancia con concentración de biomasa, la cual ha sido obtenida con el procedimiento anteriormente descrito, determinando simultáneamente el peso seco de la muestra correspondiente a la concentración de proteína.

2.2.4 Determinación de la actividad enzimática de Lacasa. (Bourbonnais, R, 1992). La actividad enzimática de Lacasa fue determinada por la oxidación del 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS). La mezcla de reacción contiene 0.5 mM ABTS, 0.1 M de buffer de acetato de sodio pH 5.0 y una cantidad apropiada de enzima (250 μ l). La oxidación del ABTS fue seguida por el incremento de la absorbancia a 420 nm ($\epsilon_{420} = 36.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Una unidad de actividad enzimática (U) fue definida como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μ mol de ABTS /min en las condiciones de ensayo (sustrato, pH y temperatura) descritas anteriormente.

2.2.5 Determinación de la actividad enzimática de Manganese Peroxidasa. (Honda, 1992). La actividad de Manganese Peroxidasa fue medida usando una mezcla de reacción que contiene 0.4 mM de guayacol, 50mM de buffer lactato de sodio (pH 4.5), 0.2 mM de MnSO_4 , 0.1 mM de H_2O_2 y una cantidad de enzima en un volumen total de 4 mL. La reacción fue medida por el monitoreo del incremento de la absorbancia del producto de la reacción a 465 nm. La actividad de Manganese peroxidasa fue calculada restando el valor de la actividad en ausencia de MnSO_4

Una unidad de actividad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima que incrementó la absorbancia a 465 nm en las condiciones de ensayo (sustrato, pH y temperatura) descritas anteriormente.

2.2.6 Determinación de la actividad enzimática de lignina Peroxidasa (Hofrichter, 1999). La actividad de lignina peroxidasa fue medida siguiendo la oxidación del alcohol veratrílico a veratril aldehído. Cada mililitro de mezcla de reacción contiene: 100 mM de buffer Tartrato de Sodio (pH 3.0) 1 nM de alcohol veratrílico , 0.2 mM de H_2O_2 y 50 a 100 μ L de solución de enzima. La reacción fue

iniciada con el H_2O_2 y la formación del veratril aldehído fue monitoreada a 310 nm ($\epsilon_{310} = 9.300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Una unidad de actividad enzimática (U), se definió como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μmol de alcohol veratrilico por minuto en las condiciones de ensayo (sustrato, pH y temperatura) descritas anteriormente.

2.2.7 Determinación de Lignina

2.2.7.1 Preparación del sustrato libre de extraíbles. Previo a la determinación del contenido de lignina fue necesario tratar el sustrato sólido, de manera que se eliminen los extraíbles, los cuales se refieren a los materiales solubles en solventes neutros. El procedimiento consistió en tratar la muestra en un aparato Soxhlet, de manera sucesiva con una mezcla de etanol- benceno y, posteriormente un tratamiento de reflujo con agua caliente por una hora.

2.2.7.2 Determinación de lignina (klason) y celulosa (Kurschner y Hoffer). Una vez eliminados los materiales solubles en los sustratos sólidos, se determinó el contenido de lignina. Las muestras fueron tratadas inicialmente con ácido sulfúrico 24N y posteriormente con una solución de éste al 3% (v/v) hasta la sedimentación de la lignina para su respectiva cuantificación.

Para la determinación del contenido de celulosa (método de Kurschner y Hoffer, una vez eliminados los materiales solubles en los sustratos sólidos y conociendo el contenido de humedad, se trataron las muestras bajo tratamientos de digestión sucesivos con alcohol-ácido nítrico y posteriormente con agua destilada.

2.2.7.3 Determinación del Contenido de Humedad (Rodriguez, 1978). Se pesaron entre 1-2 gramos de sustrato en una caja petri limpia y seca. Las muestras se secaron en una estufa (BLUE M) a 105 °C hasta peso constante. Los

resultados se expresaron como porcentaje de humedad promedio de tres determinaciones.

2.2.8 Análisis elemental de los sustratos celulósicos. La determinación de la composición elemental (CHNS) de los sustratos se realizó en un Analizador Elemental Modelo CE Instrumens Serie EA 1110 CHNS que utiliza el método de combustión de Dumas, detector de conductividad térmica (temperatura 60°C), columna tipo poropach, Temperatura del horno 1000 °C, la combustión de la muestra se lleva a cabo a una temperatura de 1800 ° C, con fase móvil de He a 120 mL/min.

2.3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

2.3.1 Conservación y propagación de las cepas. Las cepas de *Pleurotus* (*ostreatus*, *eryngii* y *pulmonaris*) se mantuvieron en medio sólido de agar-malta y/o agar papa dextrosa, que constituyen un medio sólido comercial selectivo para hongos, cuya composición se muestra en las tablas del anexo F. Los tubos de agar inclinado fueron inoculados en superficie con esporas de *Pleurotus* (*ostreatus*, *eryngii* y *pulmonaris*) e incubados a 28 °C, en estufa (BLUE M) por un tiempo de 10 días. Posteriormente fueron almacenados a 4°C en nevera hasta su utilización. La propagación de las cepas fue realizada mensualmente.

2.3.2 Preparación de los medios de Cultivo. En las experiencias con cada uno de los sustratos sólidos (desechos celulósicos) se diseñaron los respectivos medios de cultivo para obtener una concentración celular de 2 g/L; con base en la composición de los sustratos sólidos (ver anexo A) y los requerimientos nutricionales de los hongos. Se utilizó como fuente única de carbono el respectivo sustrato sólido. La tabla del anexo G indica la composición de los medios de cultivo empleados al igual que las condiciones iniciales para el proceso de fermentación.

2.3.2.1 Esterilización. La esterilización de los medios de cultivo (contenidos en recipientes de vidrio de 500 mL de capacidad) y del material de vidrio empleado durante la inoculación, fue realizada en autoclave a 121 °C, a una presión de 15 *psi* durante un tiempo de 20 minutos.

2.3.3 Experiencias preliminares de producción de ligninasas. Para verificar el crecimiento celular y la producción de las enzimas se preparó una fermentación sumergida con un medio de cultivo que contenía glucosa, peptona, extracto de malta, sulfato de manganeso y sulfato de cobre, esto disuelto en una solución de extracto de salvado de trigo. La fermentación se monitoreó durante siete días, tiempo necesario para observar su comportamiento, y se analizó la producción de proteínas, azúcares reductores, actividades enzimáticas (Lacasa, Mn-P y Li-P) y concentración celular, empleando las técnicas analíticas mencionadas anteriormente. La composición del medio de cultivo se muestra en el anexo G. Este medio de cultivo fue propuesto de acuerdo con Ha, H.C. et al; (2001).

2.3.4 Selección del sustrato celulósico y cepa productora. Para la selección del mejor sustrato sólido y de la mejor cepa productora se realizaron fermentaciones para cada una de las cepas en estudio en cada uno de los sustratos. Se utilizaron los medios de cultivo que se indican en el anexo G. Las fermentaciones se monitorearon cada 40 horas durante un periodo fermentativo de 7 días. En la selección del mejor sustrato y la mejor cepa productora se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros cinéticos: q_p , productividad específica (U/g sustrato seco x hora); actividad específica para cada una de las enzimas (U/g); los cuales fueron calculados de acuerdo con las ecuaciones mostradas en el anexo I. Los parámetros cinéticos fueron evaluados por triplicado para cada uno de los tiempos junto con un control el cual se lleva a iguales condiciones de fermentación pero sin inóculo inicial.

2.3.5 Formulación del medio de cultivo

2.3.5.1 Estudio del Efecto del pH. Esta experiencia tuvo como objetivo el estudio de la influencia de diferentes condiciones iniciales de pH sobre la producción de enzimas lignolíticas.

Teniendo en cuenta los parámetros cinéticos antes mencionados se trabajaron condiciones de pH iniciales de 4.0, 4.5 y 5.0(3). En el anexo G se indican las condiciones del medio de cultivo utilizados.

2.3.5.2 Estudio de la composición del medio de cultivo en la cepa seleccionada. Una vez evaluadas las condiciones de pH inicial, se estudio la influencia de diferentes concentraciones de Carbono en el medio de cultivo sobre la producción de enzimas lignolíticas, utilizando concentraciones de 1,9 g/L, 5,71 g/l y 17,13 g/L de paja de trigo. Finalmente se estudio la influencia de diferentes concentraciones de nitrógeno, empleando concentraciones de 0.25 g/L, 0.74 g/L y 2.22 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Dichos efectos se evaluaron de acuerdo con los parámetros cinéticos antes mencionados. Las fermentaciones se monitorearon cada 40 horas durante un periodo de 7 días. Los parámetros cinéticos fueron evaluados por triplicado para cada uno de los tiempos junto con un control el cual se lleva a iguales condiciones de fermentación pero sin inóculo inicial.

2.3.5.3 Estudio del efecto de inductores y surfactantes en la producción de enzimas lignolíticas. Se evaluó el uso de inductores como alcohol veratrílico y dimetoxifenol sobre la producción de enzimas lignolíticas utilizando concentraciones de 0.25 – 0.5 mM de dimetoxifenol y alcohol veratrílico en el medio de cultivo (anexo H). Finalmente se estudio la influencia de un surfactante, Twen-80 utilizando concentraciones de 0.01 – 0.1% p/v. Estos efectos se evaluaron de acuerdo con los parámetros cinéticos antes mencionados. Las fermentaciones se monitorearon cada 40 horas durante un periodo de 5 días. Los

parámetros cinéticos fueron evaluados por triplicado para cada uno de los tiempos junto con un control el cual se lleva a iguales condiciones de fermentación pero sin inóculo inicial.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 EXPERIENCIAS PRELIMINARES DE PRODUCCIÓN DE LIGNINASAS

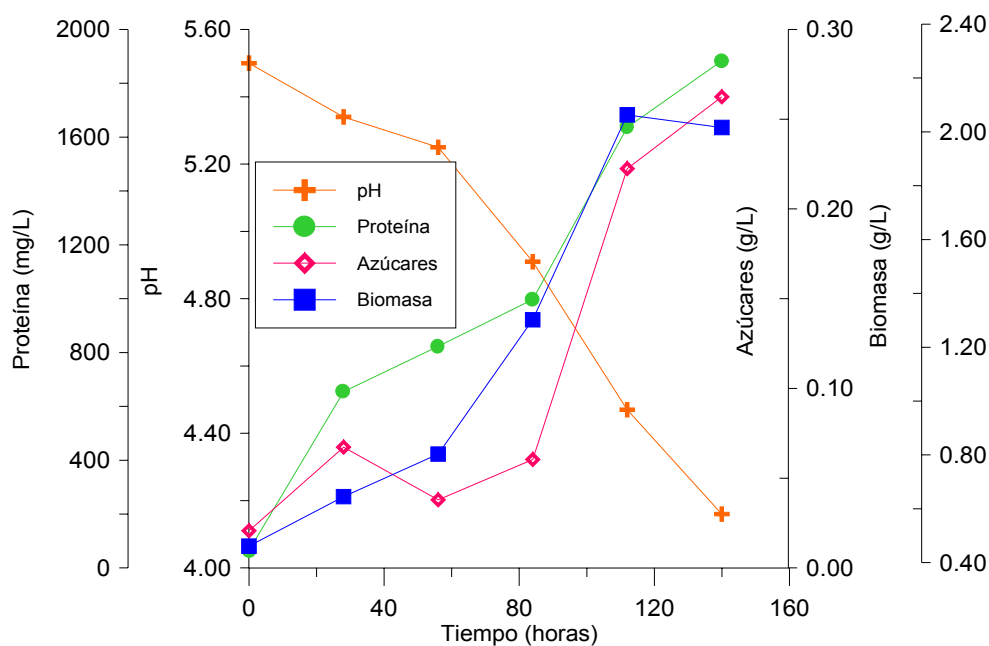
Con el fin de observar las características del cultivo y la producción de enzimas lignolíticas, se llevaron a cabo experiencias preliminares con *Pleurotus Ostreatus* CBS 411.71, *Pleurotus Pulmonaris* CBS y *Pleurotus Eryngii* CBS 613.91. Estas experiencias permitieron verificar el crecimiento celular en el medio de cultivo propuesto inicialmente en (2.3.3). Los tres hongos filamentosos crecieron normalmente con pH inicial 5,5 y temperatura ambiente. Estos cultivos se utilizaron en la elaboración de las curvas patrón para la determinación de la concentración celular de acuerdo con el método descrito en (2.2). También se realizó la estandarización de la metodología analítica para las posteriores cinéticas de crecimiento y producción de ligninasas.

3.2 SELECCIÓN DEL SUSTRATO CELULÓSICO Y CEPA PRODUCTORA

Esta experiencia tuvo por objeto el estudio de la capacidad de los hongos del género *Basidiomycetes*: *Pleurotus Ostreatus*, *Pleurotus Pulmonaris* y *Pleurotus eryngii*, de crecer y producir las enzimas lacasa, manganeso peroxidasa (Mn-P) y lignina peroxidasa (Li-P) sobre los sustratos agroindustriales: paja de trigo y tuza de mazorca; utilizando como sustrato de referencia el salvado de trigo. De acuerdo con la metodología experimental expuesta en (2.3.4), se obtuvieron las respectivas cinéticas de crecimiento, producción de proteína, azúcares reductores y actividades enzimáticas de Lacasa, Manganeso peroxidasa y Lignina peroxidasa. Los contenidos de lignina de los sustratos empleados se muestran en la tabla del anexo A.

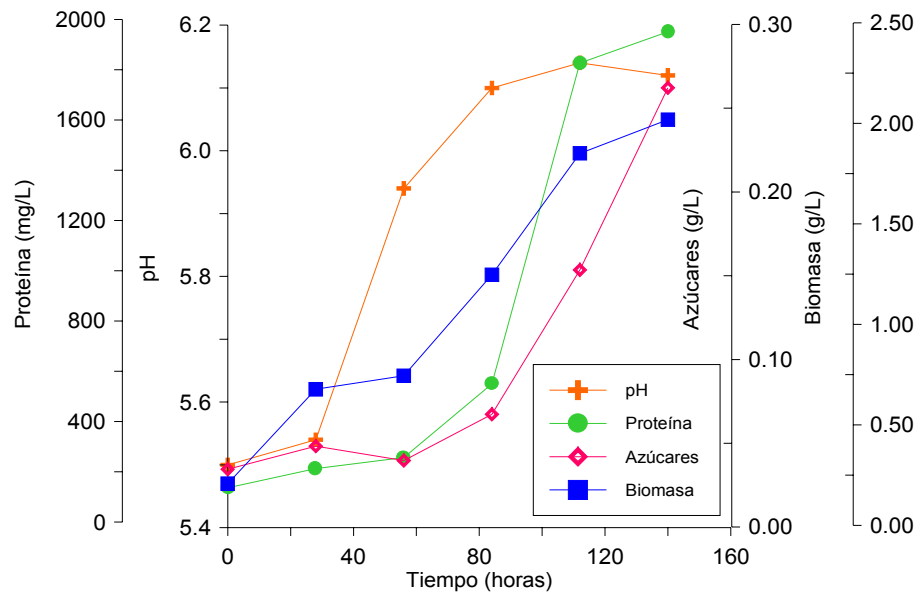
3.2.1 Fermentación utilizando como sustrato salvado de trigo. El medio de cultivo y las condiciones iniciales para el proceso fermentativo se encuentran en el anexo G. En las figuras 5 - 8, se muestran las cinéticas de crecimiento celular, producción de proteína, azúcares, actividades específicas de lacasa, Mn-P y Li-P para los *Basidiomycetes: Pleurotus ostreatus, Pleurotus pulmonaris y Pleurotus eryngii*, Durante un tiempo de fermentación de 140 horas empleando como sustrato salvado de trigo.

Figura 5. Cinética de crecimiento celular, producción de proteínas y azúcares reductores para *Pleurotus Ostreatus* empleando como sustrato salvado de trigo



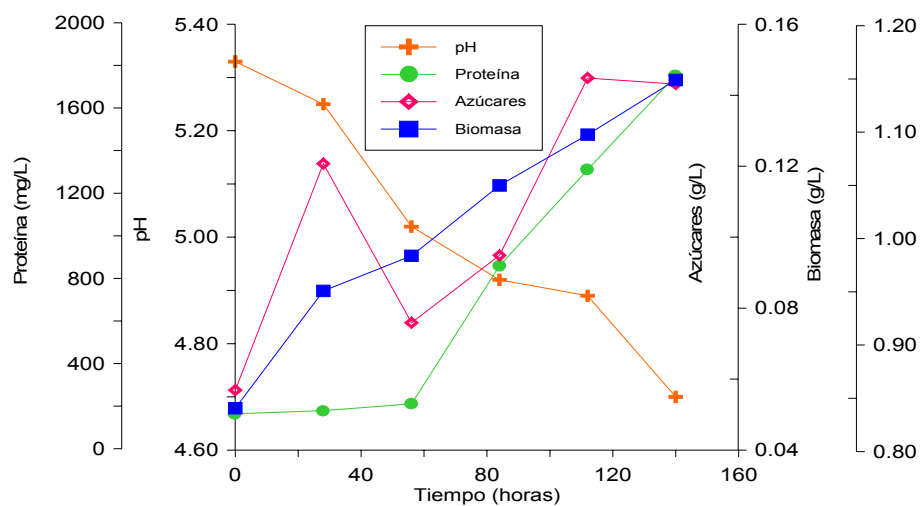
Fuente: Autora del proyecto

Figura 6. Cinética de crecimiento celular, pH , producción de proteína y azúcares reductores para *pleurotus eryngii* empleando como sustrato salvado de trigo



Fuente: Autora del proyecto

Figura 7. Cinética de crecimiento celular, pH , producción de proteína y azúcares reductores para *Pleurotus pulmonaris* empleando como sustrato salvado de trigo.



Fuente: Autora del proyecto

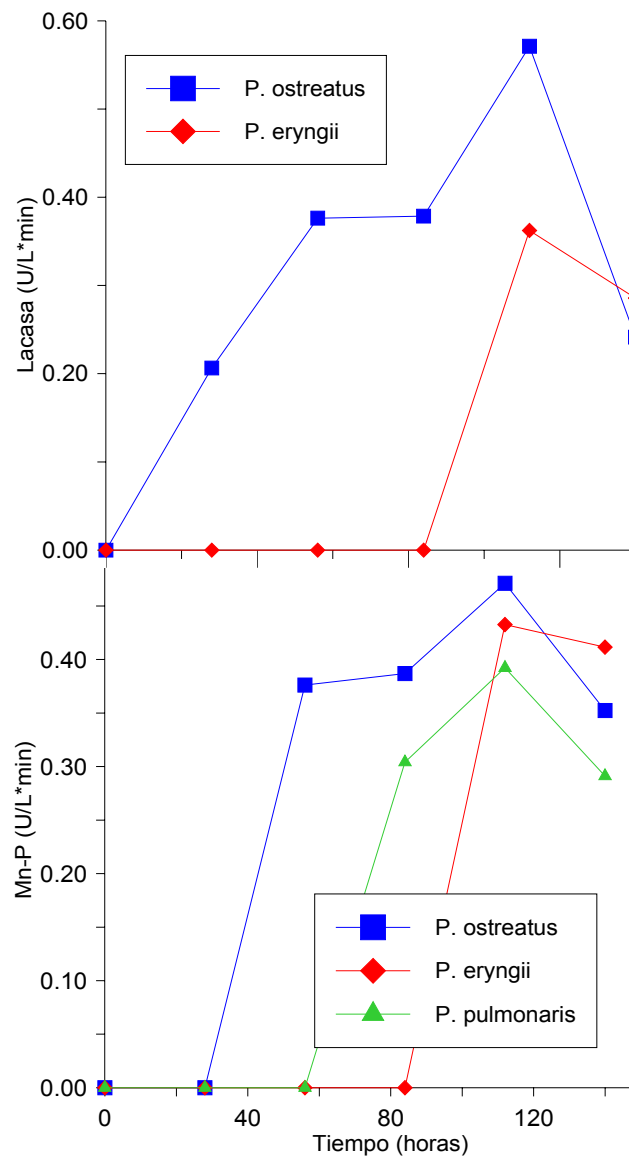
En la figura 5 se observa la cinética de crecimiento y producción de ligninasas de *Pleurotus ostreatus* CBS 411.71 alcanzándose una concentración celular de 2,06 g/L alrededor de las 112 horas. Por otro lado, en la figura 7 se observa que *Pleurotus eryngii* CBS 613.91 alcanza una concentración celular de 2,018 g/L alrededor de las 140 horas, mientras que *Pleurotus pulmonaris* CBS 507.85 alcanza un crecimiento celular máximo de 1,15 g/L a las 140 horas de fermentación. La concentración alcanzada por *P. pulmonaris* es un 42,5% menor a 2 g/L que fue el valor estimado para el diseño del medio de cultivo, probablemente debido a su menor capacidad para biodegradar los nutrientes del salvado de trigo.

Para los tres microorganismos la producción de proteína soluble, o extracelular, se ve asociada al crecimiento celular alcanzando valores máximos de 1636,32mg/L, 1826,76 mg/L y 1452,973 mg/L *P. ostreatus* CBS 411.71, *Pleurotus eryngii* CBS 613.91 y *P. pulmonaris* CBS 507.85 respectivamente.

En estas figuras también se muestran las variaciones del pH durante el cultivo. Para las fermentaciones llevadas a cabo con *P. ostreatus* y *P. pulmonaris* se presentó un notorio descenso de pH alcanzando valores de 4,16 y 4,7 respectivamente, mientras que para la fermentación llevada a cabo con *P. eryngii* se presentó un incremento hasta un valor de 6,1.

En la figura 8 se puede observar que para los tres microorganismos la actividad enzimática de Mn-P aumentó durante la fermentación alcanzando su máximo durante la fase exponencial de crecimiento celular para posteriormente disminuir en el transcurso de esta fase. Con respecto a la actividad enzimática de lacasa, *P. ostreatus* y *P. eryngii* presentaron su máximo a las 120 horas, mientras que *P. pulmonaris* no presentó actividad, lo cual indicaría su menor capacidad para biodegradar algunas fracciones fenólicas del salvado de trigo, haciendo de esta manera que el crecimiento celular fuera menor.

Figura 8. Actividades específicas de Lacasa, Manganeso Peroxidasa para los Basidiomycetes: *Pleurotus Ostreatus*, *Pleurotus Pulmonaris* y *Pleurotus Eryngii* empleando como sustrato salvado de trigo.



Fuente: Autora del proyecto

En la tabla 4 se puede observar que los valores de productividad específica (q_p), rendimiento de actividad en biomasa ($Y_{p/x}$) y actividad enzimática (U/g) son mayores para *P. ostreatus*.

Tabla 4. Parámetros cinéticos de comparación obtenidos para *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus pulmonaris* empleando como sustrato salvado de trigo.

Basidiomycete	Enzima	Actividad Enzimática (u/g sustrato seco)*	q_p^* (u/g sustrato seco·día)	$Y_{p/xmáx}$ (u/g biomasa)	Azúcares Reductores (g/l)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Lacasa	1.85×10^{-2}	3.69×10^{-3}	3.66×10^{-2}	0.2225
	Mn-P	0.0161	1.61×10^{-2}	0.104	
	Li-P	-	-	-	
<i>Pleurotus Eryngii</i>	Lacasa	5.38×10^{-4}	1.076×10^{-4}	1.12×10^{-3}	0.2622
	Mn-P	1.092×10^{-3}	5.476×10^{-4}	6.794×10^{-3}	
	Li-P	-	-	-	
<i>Pleurotus pulmonaris</i>	Lacasa				0.1449
	Mn-P	1.09×10^{-2}	6.611×10^{-4}	9.654×10^{-3}	
	Li-P	-	-	-	

Fuente: Autora del proyecto

*Valores máximos: calculados con relación al tiempo en el cual se obtuvo la máxima productividad específica para cada actividad enzimática.

Los niveles de producción de ligninasas en las tres cepas estudiadas es diferente en cuanto a los valores de los parámetros cinéticos cuantificados como base para su criterio de selección. En cuanto a la producción enzimática los microorganismos presentaron actividad para lacasa y Mn-P corroborando lo expuesto por Hatakka (1994) quien afirma que estas enzimas son producidas por

las especies de *Pleurotus*. La actividad enzimática está asociada a la fase exponencial de crecimiento celular, sin embargo, las actividades de lacasa y Mn-P para *P. ostreatus* y *P. eryngii* presentaron sus máximos valores desplazados hacia la fase estacionaria del crecimiento del microorganismo; lo que indica que pudo haber una represión catabólica en la actividad de las enzimas producida por la presencia de una fuente de carbono rápidamente metabolizable, como consecuencia del alto contenido de azúcares presentes y debido a que estas enzimas son inducibles, es probable que una vez consumidos los azúcares se expresara la actividad de estas enzimas para la biodegradación de los componentes de lignina del sustrato. No obstante la actividad de Li-P no fue detectada durante las fermentaciones realizadas con salvado de trigo.

Por otro lado, *P. pulmonaris* sólo presentó actividad de Mn-P una vez transcurridas las 60 horas de fermentación, alcanzando su máximo valor de expresión durante la fase estacionaria de crecimiento.

En las figuras 5, 6 y 7 se observa el comportamiento cinético para un cultivo por lotes, donde solo hay intercambio de gases (aireación, producción de CO₂, etc.) con los alrededores, los que se suministran dentro y fuera del sistema. Una vez iniciada la fermentación, para *P. ostreatus*, *P. eryngii* y *P. pulmonaris*, esta transcurre de forma característica presentando diferentes fases en cuanto al crecimiento celular y producción de enzimas lignolíticas y azúcares reductores. Los valores máximos de producción de proteína extracelular están asociados a la fase exponencial de crecimiento para los tres microorganismos, lo cual corresponde con la excreción habitual de enzimas hacia el medio de cultivo durante este tipo de fermentación.

Por otra parte, en los cultivos de *P. ostreatus* y *P. pulmonaris* se produjo una caída brusca del pH, lo cual se debe fundamentalmente a la utilización del ion amonio como fuente principal de nitrógeno para el crecimiento celular y producción de

ligninasas (147). En estos casos el ion amonio estaría siendo consumido rápidamente provocando un descenso del pH al inicio de la fermentación por la liberación de protones. Esta sensibilidad al pH demuestra que la actividad de lacasa y Mn-P aumenta a medida que el ion amonio se va consumiendo, indicando que el consumo o limitación de por la fuente de nitrógeno es un aspecto importante en la producción de las enzimas lignolíticas, y que en este caso esta producción estaría asociada al crecimiento celular en ambos hongos, para posteriormente decaer posiblemente por el efecto del pH y la acumulación de metabolitos.

En el caso de la fermentación de *P. eryngii* se presentó un incremento de pH hasta un valor de 6.12; esto se debe, probablemente, al efecto de las proteínas excretadas hacia el medio extracelular y a los metabolitos de degradación del sustrato celulósico que induce a la producción de lacasa y Mn-P.

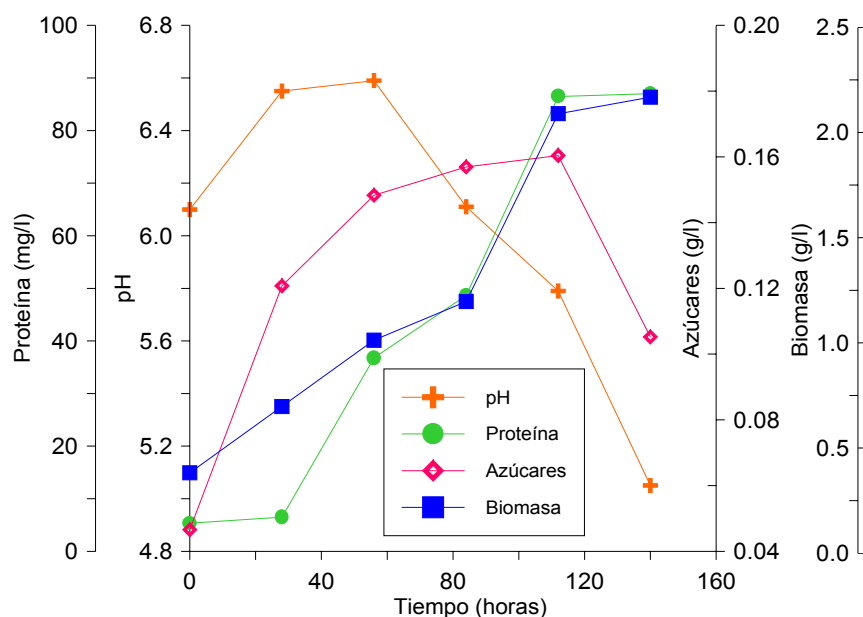
Para las tres cepas, el crecimiento celular correspondió al típico de los hongos filamentosos, con un valor máximo de crecimiento celular para *P. ostreatus* de 2.063 g/L; *P. eryngii* 2.018 g/L y *P. pulmonaris* 1.149 g/L en el tiempo de fermentación estudiado. Esto sugiere que se está produciendo una disminución del rendimiento celular para el sustrato celulósico al utilizar *P. pulmonaris*, o que el carbono disponible para este hongo es consumido a una menor velocidad, lo cual se corresponde con la baja expresión de enzimas lignolíticas.

Al evaluar la capacidad entre las tres cepas empleadas para la producción de enzimas lignolíticas, se determinó que para el salvado de trigo, el *P. ostreatus* obtuvo los mayores valores de q_p para cada una de las enzimas detectadas.

3.2.2 Fermentación utilizando como sustrato paja de trigo. El medio de cultivo y las condiciones iniciales para el proceso fermentativo con paja de trigo se encuentran detalladas en el anexo G.

Las figuras 9, 10 y 11 muestran el comportamiento de los *Basidiomycetes*: *P.ostreatus*, *P. pulmonaris* y *P. eryngii*, para un periodo fermentativo de 140 horas utilizando paja de trigo como sustrato lignocelulósico. Los máximos valores de concentración celular se obtuvieron a las 140 horas de fermentación presentándose un crecimiento en biomasa de 2,16g/L, 1,95g/L y 1,14g/L para *P.ostreatus*, *P. eryngii* y *P. pulmonaris* respectivamente, a partir de este tiempo se inicia la fase estacionaria de crecimiento celular. La producción de proteína extracelular que está asociada al crecimiento celular alcanza valores máximos también a las 140 horas de iniciado el proceso fermentativo.

Figura 9. Cinética de crecimiento celular, producción de proteínas y azúcares reductores para *Pleurotus Ostreatus* empleando como sustrato paja de trigo.



Fuente: Autora del proyecto

Como se puede observar en la figura 12, los tres microorganismos presentaron un aumento en la actividad de Mn-P durante la fermentación, alcanzando su máximo en la fase exponencial de crecimiento para luego disminuir en el transcurso de la

misma. En cuanto a la actividad de Lacasa los microorganismos *P.ostreatus* y *P. pulmonaris* presentaron un incremento en la actividad de esta enzima, mientras que *P. eryngii* no presentó actividad.

En estas figuras también se puede observar un incremento en el valor de pH durante el proceso de fermentación para *P. eryngii* hasta 6.6 y de 6.8 para *P. pulmonaris* mientras que *P. ostreatus* mostró un descenso en su valor hasta 5,0 alrededor de las 140 horas de iniciada la fermentación.

Figura 10. Cinética de crecimiento celular, pH , producción de proteína y azúcares reductores para *pleurotus pulmonaris* empleando como sustrato paja de trigo.

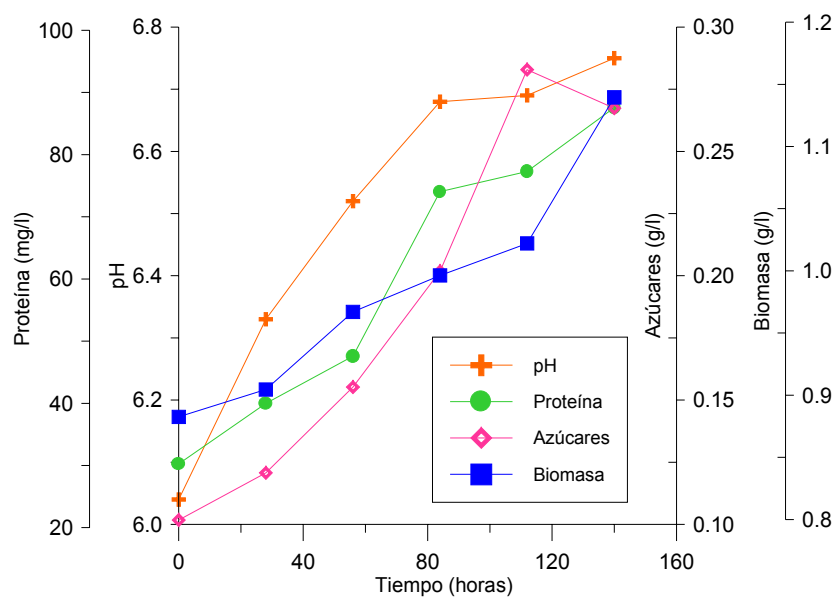
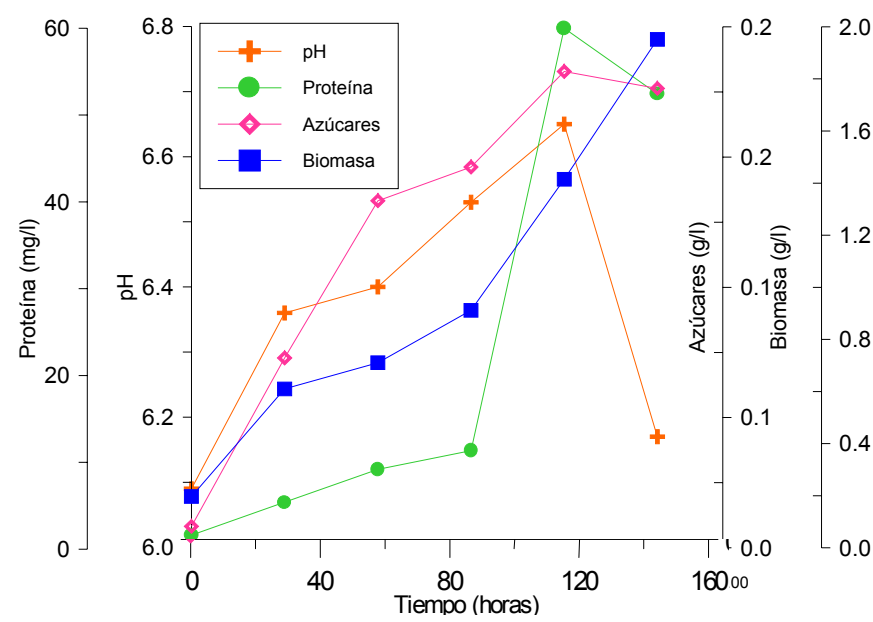
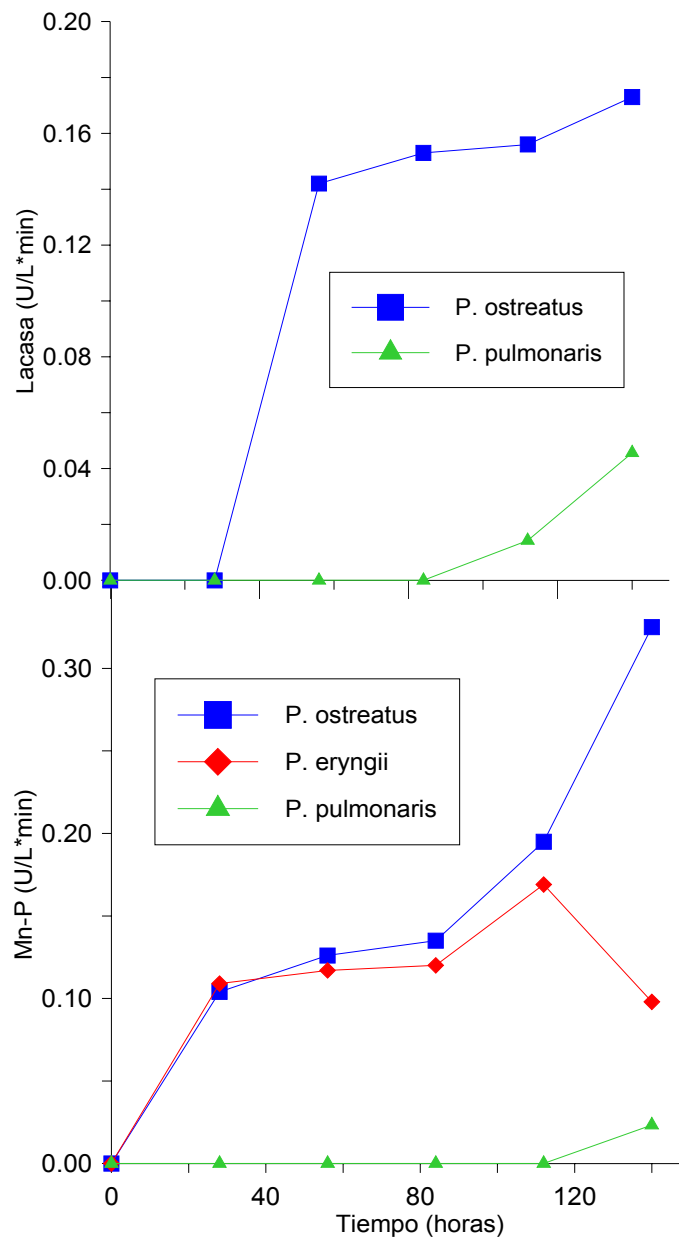


Figura 11. Cinética de crecimiento celular, pH , producción de proteína y azúcares reductores para *pleurotus Eryngii* empleando como sustrato paja de trigo.



Fuente: Autora del proyecto

Figura 12. Actividades específicas de Lacasa y Manganese Peroxidasa para los Basidiomycetes: *Pleurotus Ostreatus*, *Pleurotus Pulmonaris* y *Pleurotus Eryngii* empleando como sustrato paja de trigo.



Fuente: Autora del proyecto

Los parámetros cinéticos para los tres microorganismos se muestran en la tabla 5, los valores de productividad específica (q_p), rendimiento de actividad en biomasa y actividad específica más altos fueron para *P.ostreatus*.

Tabla 5. Parámetros cinéticos de comparación obtenidos para *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus pulmonaris* empleando como sustrato paja de trigo

Basidiomycete	Enzima	Actividad Enzimática (u/g sustrato seco)*	q_p^* (u/g sustrato seco·día)	$Y_{p/xmáx}$ (u/g biomasa)	Azúcares Reductores (g/l)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Lacasa	1.075×10^{-2}	2.154×10^{-3}	2.832×10^{-2}	0.1605
	Li-P	-	-	-	
	Mn-P	5.691×10^{-2}	1.140×10^{-2}	1.499×10^{-1}	
<i>Pleurotus Eryngii</i>	Lacasa	-	-	-	0.1863
	Li-P	-	-	-	
	Mn-P	2.69×10^{-2}	7.399×10^{-3}	8.66×10^{-2}	
<i>Pleurotus pulmonaris</i>	Lacasa	7.985×10^{-3}	1.60×10^{-4}	4.00×10^{-3}	0.2829
	Li-P	-	-	-	
	Mn-P	4.081×10^{-3}	8.175×10^{-4}	2.04×10^{-2}	

Fuente: Autora del proyecto

*Valores máximos: calculados con relación al tiempo en el cual se obtuvo la máxima productividad específica para cada actividad enzimática.

La producción de proteína en todos los casos va asociado al crecimiento celular, obteniéndose los valores más bajos para *Pleurotus pulmonaris*, este microorganismo presentó un comportamiento similar cuando se utilizó salvado de trigo como sustrato celulósico. De igual forma, los máximos valores de

concentración de proteína se obtienen al inicio de la fase estacionaria, es decir, a las 112 horas de llevada a cabo la fermentación.

Los valores de pH se mantuvieron constantes entre 6.0 y 6.7 en las cepas de *P. pulmonaris* y *P. eryngii*, sin embargo, *P. ostreatus* presentó una disminución notable de pH de 6.0 a 5.0. Estos valores obtenidos durante la fermentación con paja de trigo están asociados, probablemente, a la producción de proteína y al consumo de la fuente de nitrógeno por parte de los microorganismos, debido a que el perfil del pH obtenido para *P. ostreatus* y *P. eryngii* es similar al obtenido en la fermentación llevada a cabo con salvado de trigo.

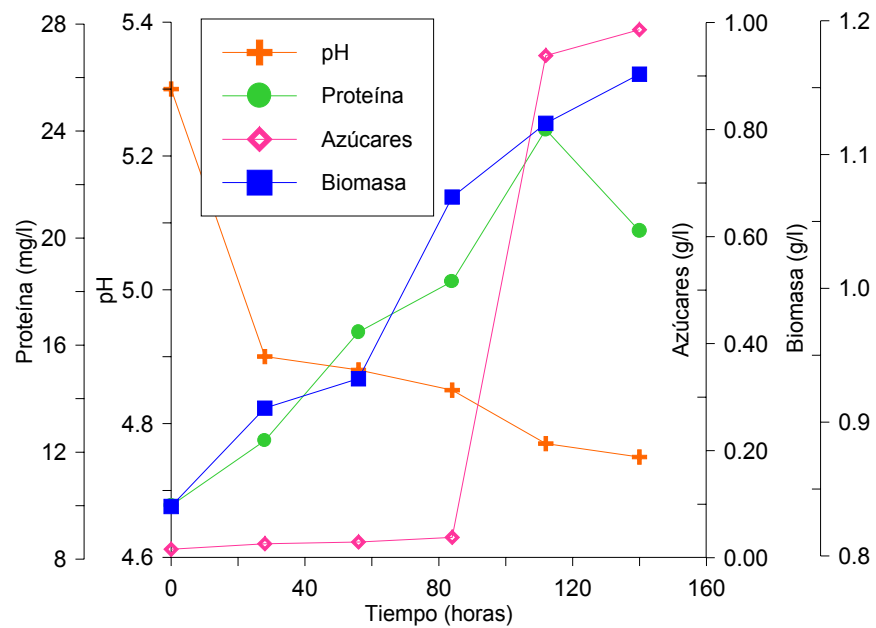
Por otro lado, la producción de proteína y la actividad de lacasa y Mn-P están asociadas al crecimiento celular, obteniéndose mayores valores para *P. ostreatus*, sin embargo, la actividad de lacasa comienza su expresión a las 60 horas de fermentación, presentando sus valores máximos de actividad desplazados hacia la fase estacionaria de crecimiento del microorganismo, indicando el carácter inducible de estas enzimas lignolíticas. Los tres microorganismos presentaron actividad para Mn-P, sin embargo *P. pulmonaris* solo presentó actividad a las 140 horas de fermentación, mientras que *P. ostreatus* y *P. eryngii* iniciaron su expresión a las 28 horas y sus máximos valores se obtuvieron a las 112 horas de llevado a cabo el proceso fermentativo. Al igual que en la fermentación con salvado de trigo, la actividad de Li-P no se expresó durante todo el cultivo celular.

3.2.3 Fermentación utilizando como sustrato de tuza de mazorca. El medio de cultivo y las condiciones iniciales del proceso fermentativo con tuza de mazorca se describen en el anexo G.

La cinética del crecimiento al igual que la producción de ligninasas para los tres microorganismos se muestran en las figuras 13, 14 y 15 en las que también se puede observar un decrecimiento en los valores de pH durante el proceso

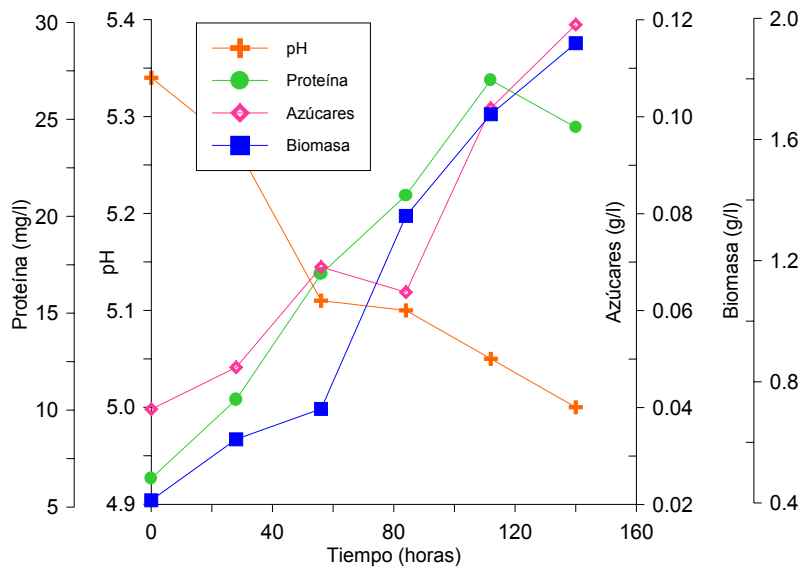
fermentativo para los tres Basidiomycetes obteniéndose valores de 3.53, 5.0 y 4.75 para *P. ostreatus*, *P. eryngii* y *P. pulmonaris* respectivamente a las 140 horas de fermentación.

Figura 13. Cinética de crecimiento celular, producción de proteínas y azúcares reductores para *Pleurotus Ostreatus* empleando como tuza de mazorca.



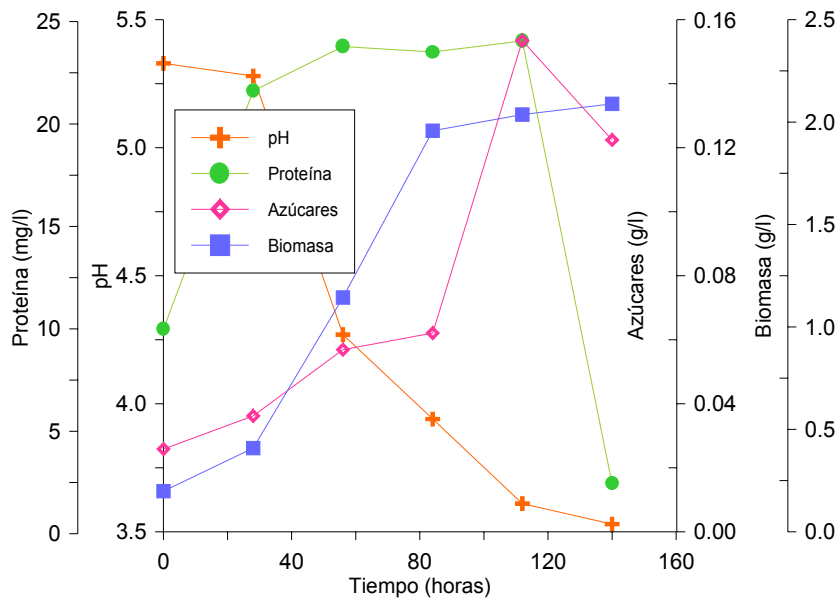
Fuente: Autora del proyecto

Figura 14. Cinética de crecimiento celular, pH , producción de proteína y azúcares reductores para *pleurotus pulmonaris* empleando como sustrato tuza de mazorca.



Fuente: Autora del proyecto

Figura 15. Cinética de crecimiento celular, pH , producción de proteína y azúcares reductores para *pleurotus Eryngii* empleando como sustrato tuza de mazorca.

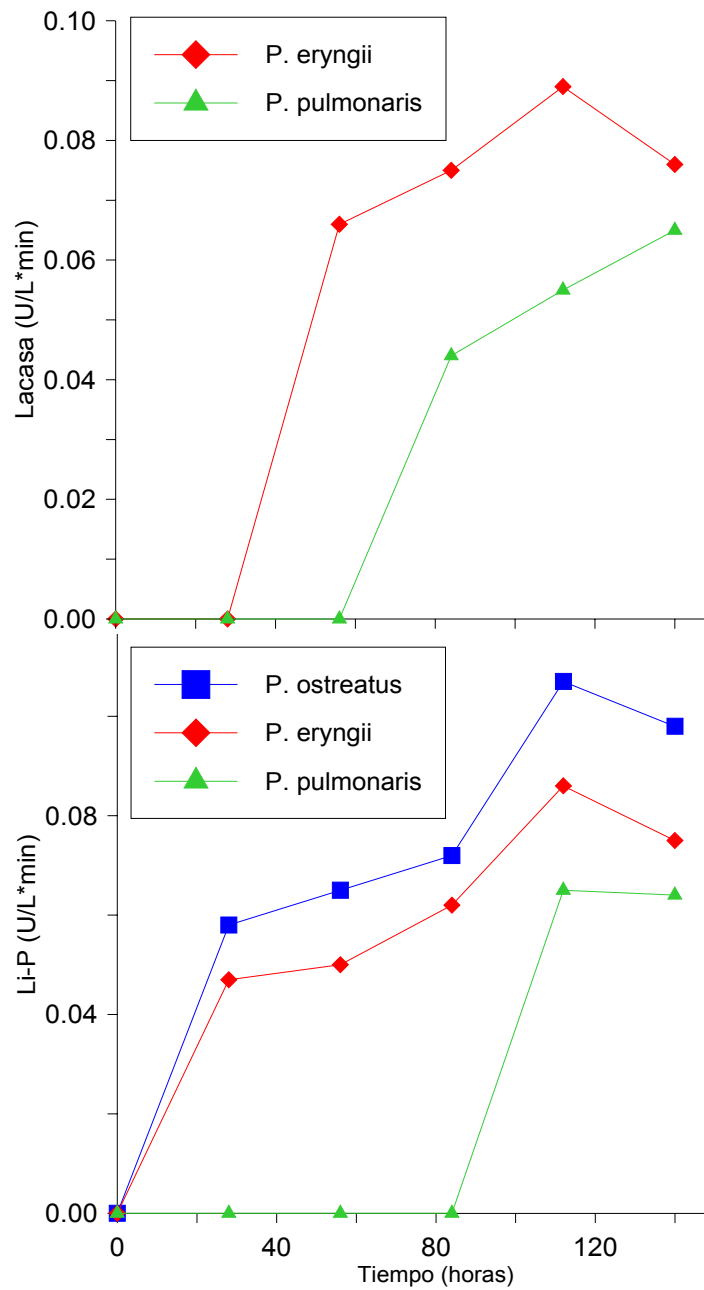


Fuente: Autora del proyecto

En cuanto a la producción de proteína extracelular se observó, para todos los casos, valores máximos a las 112 horas de fermentación con valores de 24.05 mg/L, 27.02 mg/L y 24.05 mg/L para *P. ostreatus*, *P. eryngii* y *P. pulmonaris* respectivamente, disminuyendo durante la fase estacionaria de crecimiento celular en biomasa donde se obtuvieron los máximos valores de 2.090 g/L, 1.918 g/L y 1.160 g/L para *P. ostreatus*, *P. eryngii* y *P. pulmonaris* respectivamente, también a las 112 horas.

En todos los casos la actividad de Li-P (figura 16) aumentó durante la fermentación alcanzando su máximo en la fase logarítmica de crecimiento a las 112 horas, mientras que *P. ostreatus* no presentó actividad enzimática de Lacasa ni Mn-P con este sustrato.

Figura 16. Actividades específicas de Lacasa, Lignina Peroxidasa para los Basidiomycetes: *Pleurotus Ostreatus*, *Pleurotus Pulmonaris* y *Pleurotus Eryngii* empleando como sustrato tuza de mazorca.



Fuente: Autora del proyecto

En la tabla 6 se muestran los parámetros cinéticos para los tres microorganismos, de acuerdo con estos, los valores máximos se presentaron para *Pleurotus eryngii*.

Tabla 6. Parámetros cinéticos de comparación obtenidos para *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus pulmonaris* empleando como sustrato tuza de mazorca

Basidiomycete	Enzima	Actividad Enzimática (u/g sustrato seco)	q_p^* (u/g sustrato seco·día)	$Y_{p/xmáx}$ (u/g biomasa)	Azúcares Reductores (g/l)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Lacasa	-	-	-	0.1535
	Mn-P	-	-	-	
	Li-P	2.55×10^{-3}	6.369×10^{-4}	5.253×10^{-3}	
<i>Pleurotus eryngii</i>	Lacasa	2.01×10^{-3}	5.297×10^{-4}	5.289×10^{-3}	0.1190
	Mn-P	-	-	-	
	Li-P	2.04×10^{-3}	5.119×10^{-4}	5.109×10^{-3}	
<i>Pleurotus pulmonaris</i>	Lacasa	1.31×10^{-3}	3.274×10^{-4}	5.160×10^{-3}	0.9865
	Mn-P	-	-	-	
	Li-P	1.55×10^{-3}	3.869×10^{-4}	5.503×10^{-3}	

Fuente: Autora del proyecto

*Valores máximos: calculados con relación al tiempo en el cual se obtuvo la máxima productividad específica para cada actividad enzimática.

En la experiencia de fermentación utilizando tuza de mazorca como sustrato celulósico, es de gran importancia resaltar el hecho de encontrar además de lacasa, Li-P ya que esta no ha sido reportada en las fermentaciones con los otros dos sustratos utilizados. En la figura 16 se observa que los tres *Basidiomycetes* estudiados expresaron actividad para esta enzima, sin embargo, *P. pulmonaris*

solo presentó actividad al inicio de la fase estacionaria de crecimiento celular, posiblemente por una represión catabólica que pudo inhibir dicha actividad correspondiendo esto a los altos contenidos de azúcares reductores producidos por este microorganismo. Por otro lado, *P. ostreatus* y *P. eryngii* presentaron actividad durante toda la fase de crecimiento celular.

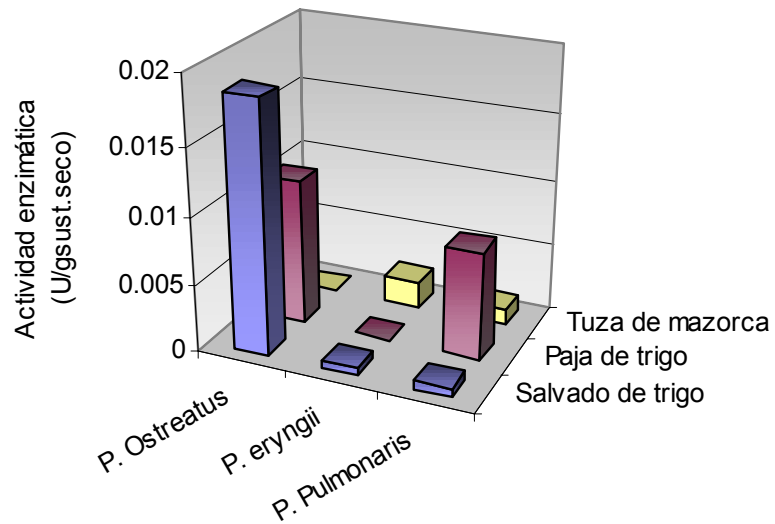
A partir de los resultados obtenidos durante la fermentación sobre tuza de mazorca, se observó que los hongos obtuvieron valores máximos de las enzimas lignolíticas a las 112 horas de fermentación. En las cepas de *P. ostreatus* y *P. eryngii* estos valores tuvieron proporcionalidad con los valores de $Y_{P/X}$ los cuales relacionan el consumo de sustrato con la formación de biomasa.

Comparando los resultados obtenidos al utilizar salvado de trigo como sustrato (tabla 4 y figura 8) con los obtenidos al emplear tuza de mazorca, es de resaltar que se obtuvieron valores más bajos de actividad específica de lacasa, mientras que Mn-P no expresó actividad alguna durante la fermentación realizada con este sustrato, mientras que *P. eryngii* presentó un efecto buffer del sustrato con variaciones de pH entre 5.3 y 5.0 durante las 140 horas de llevada a cabo la fermentación.

Se observó también para las experiencias con tuza de mazorca, un descenso en el valor de pH para los tres microorganismos en un rango de 5.3 a 3.5 para *P. pulmonaris* y *P. ostreatus*. Comparando los valores obtenidos con salvado de trigo solo se observa una pequeña diferencia con *P. eryngii* el cual incrementó su pH hasta 6.1.

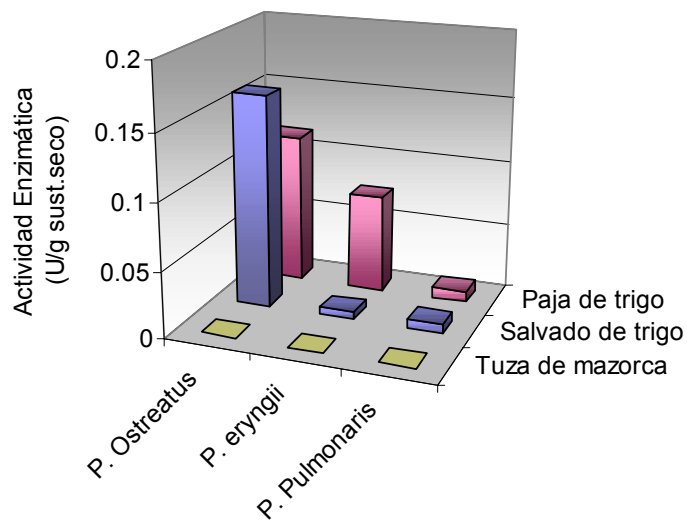
Las figuras 17, 18 y 19 muestran las actividades específicas máximas para *P. ostreatus*, *P. eryngii* y *P. pulmonaris* en los sustratos paja de trigo, tuza de mazorca y salvado de trigo, este último utilizado como sustrato de referencia.

Figura 17. Valores máximos de actividad enzimática de la casa presentados por los *Basidiomycetes* *P. ostreatus*, *P. eryngii*, *P. pulmonaris* sobre los sustratos paja de trigo, tuza de mazorca y salvado de trigo.



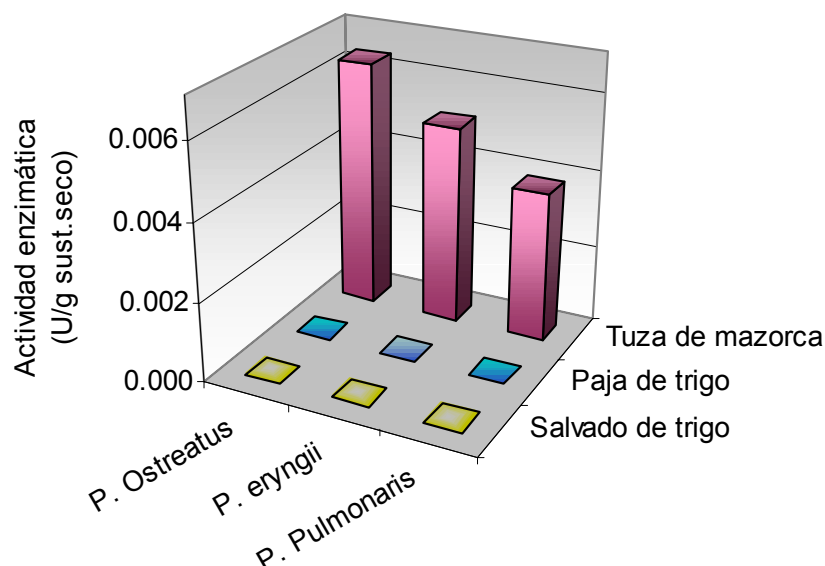
Fuente: Autora del proyecto

Figura 18. Valores máximos de actividad enzimática de manganeso peroxidasa presentados por los *Basidiomycetes* *P. ostreatus*, *P. eryngii*, *P. pulmonaris* sobre los sustratos paja de trigo, tuza de mazorca y salvado de trigo.



Fuente: Autora del proyecto

Figura 19. Valores máximos de actividad enzimática de lignina peroxidasa presentados por los *Basidiomycetes* *P. ostreatus*, *P. eryngii*, *P. pulmonaris* sobre los sustratos paja de trigo, tuza de mazorca y salvado de trigo.



Fuente: Autora del proyecto

Como se puede observar tanto en las figuras como en la tabla 7, el ***Pleurotus ostreatus*** presentó los mejores valores de Actividad específica, productividad y crecimiento celular para la casa, y manganeso peroxidasa, comparadas con los valores obtenidos con salvado de trigo, cuando se utiliza la paja de trigo como sustrato lignocelulósico.

Tabla 7. Valores de productividad específica (q_P) obtenidos para las diferentes enzimas lignolíticas producidos por los *Basidiomycetes* en estudio

Basidiomycete	Salvado de trigo			Paja de trigo			Tuza de mazorca		
	q _P (U/g sustrato seco*día)								
	lacasa	Mn-P	Li-P	lacasa	Mn-P	Li-P	Lacasa	Mn-P	Li-P
<i>P. ostreatus</i>	0.037	0.161	-	0.0215 4	0.1140	-	-	-	0.00637
<i>P. eryngii</i>	0.0010	0.0055	-	-	0.074	-	0.0053	-	0.00511
<i>P. pulmonaris</i>	0.0011	0.0066	-	0.0016	0.0082	-	0.0033	-	0.00386

Fuente: Autora del proyecto

Las experiencias de selección demostraron que los sustratos son consumidos como fuente de carbono por los tres microorganismos principalmente para la producción de biomasa, proteína extracelular e inducen la producción de lacasa, Mn-P y Li-P y teniendo en cuenta que la productividad específica (q_P) es el parámetro cinético adecuado para evaluar o comparar la capacidad de diversas cepas para producir un determinado metabolito (151), al comparar los resultados obtenidos utilizando salvado de trigo (tabla 7 y figuras 17,18 y 19), con los obtenidos empleando paja de trigo y tuza de mazorca, es de destacar que se obtuvieron mayores valores de U/g y q_P para la enzimas lacasa y Mn-P de la cepa de ***Pleurotus ostreatus*** con la paja de trigo. Sin embargo se observó que en las experiencias con tuza de mazorca, con respecto al salvado de trigo, se expresó actividad para Li-P en las tres cepas de *Pleurotus*, esto posiblemente se deba a las diferencias en la composición química (mayor contenido de lignina y celulosa) y factores físicos (porosidad del sustrato) que pueden favorecer la producción de esta enzima.

Los aspectos mencionados anteriormente nos indican que la producción de ligninasas con estos hongos filamentosos es altamente dependiente de la composición de fuente de carbono, nitrógeno y pH del medio de cultivo.

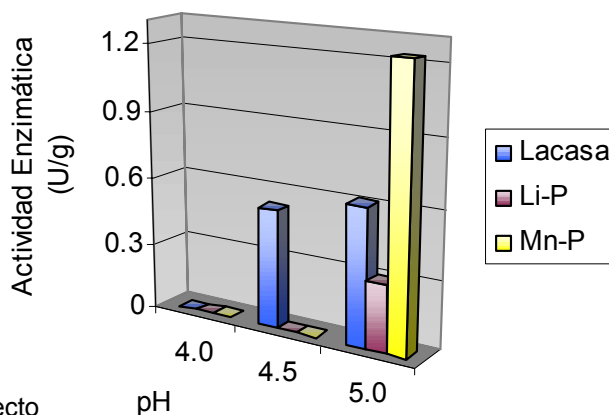
3.3 FORMULACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Esta experiencia tuvo por objeto la formulación de un medio de cultivo para el crecimiento microbiano y la producción de enzimas lignolíticas por *Pleurotus ostreatus* sobre paja de trigo, utilizando la técnica de fermentación semi-sólida, teniendo en cuenta las condiciones de pH inicial y el efecto inductor de la fuente de carbono y de nitrógeno.

3.3.1 Estudio del efecto del pH inicial del medio de cultivo en la producción de enzimas lignolíticas. El medio de cultivo para el estudio del efecto del pH inicial en la producción de enzimas lignolíticas se muestra en el anexo G.

De acuerdo con lo establecido en (2.3.5.1), se trabajaron tres medios de cultivo para observar el efecto de la concentración de iones H^+ en el tiempo sobre la síntesis de enzimas lignolíticas (lacasa, Li-P y Mn-P) por *Pleurotus ostreatus* con paja de trigo. Teniendo en cuenta que el pH óptimo de crecimiento de los hongos filamentosos se encuentra en el intervalo entre 4,0 y 5,0 (3), se trabajaron condiciones de pH iniciales de 4,0, 4,5 y 5,0 después de llevada a cabo la esterilización.

Figura 20. Efecto de las condiciones iniciales de pH en la producción de enzimas lignolíticas por *Pleurotus ostreatus* sobre paja de trigo



Fuente: Autora del proyecto

En la figura 20 se presentan las actividades específicas máximas de lacasa, Mn-P y Li-P, obtenidas durante un periodo fermentativo de 120 horas para diferentes condiciones de pH inicial empleadas sobre el sustrato paja de trigo. También se puede observar un aumento significativo de los valores de U/g para las actividades de lacasa, lignina y manganeso peroxidasa en condiciones de pH inicial 5.0. No se detectó actividad para ninguna de las enzimas lignolíticas bajo condiciones de pH inicial 4.0.

Tabla 8. Efecto del pH en la producción de enzimas de *Pleurotus ostreatus* empleando como sustrato paja de trigo

Enzima	q_p^*			Actividad Enzimática			$Y_{p/x}$			Azúcares reductores (g/l)		
	4.0	4.5	5.0	4.0	4.5	5.0	4.0	4.5	5.0	4.0	4.5	5.0
PH												
Lacasa	-	0.175	0.307	-	0.530	0.613	-	1.532	0.178	0.157 8	0,163	0,180
Mn-P	-	-	0.630	-	-	1.230	-	-	0.087			
Li-P	-	-	0.29	-	-	0.30	-	-	0.360			

Fuente: Autora del proyecto

*Valores máximos: calculados con relación al tiempo en el cual se obtuvo la máxima productividad específica para cada actividad enzimática.

En la tabla 8 se registran los valores máximos de los parámetros cinéticos obtenidos en este trabajo para la cepa de *Pleurotus ostreatus*, al comparar los valores obtenidos durante el proceso fermentativo para cada una de las condiciones iniciales de pH empleadas, se observó que para un pH inicial de 5.0 se presentaron los máximos valores de productividad específica (q_p), Actividad (AE) y rendimiento de biomasa en producto ($Y_{P/X}$).

En esta experiencia se produjo una diferencia notable en el nivel de síntesis de enzimas para los tres valores de pH evaluados (4.0, 4.5 y 5.0) con este microorganismo. En los medios de cultivo trabajados con el pH inicial de 4.0 y 4.5 no se observó actividad para Mn-P y Li-P, sólo se presentó una baja actividad de lacasa para el medio con pH 4.5; esto probablemente se deba a la variación del pH en el medio de cultivo de 1.2 unidades para el pH de 4.5 y de 1.4 unidades para el de 4.0; esta variación de pH a través del tiempo de fermentación afectó la producción de enzimas, proteína extracelular y biomasa alcanzada durante el cultivo celular, produciendo una reducción en los valores de q_P y actividad específica; así mismo se obtiene una disminución del rendimiento celular, esta disminución en el valor de $Y_{P/X}$ puede deberse a una represión por acumulación de metabolitos ácidos en el medio de cultivo, lo que indica que el *Pleurotus ostreatus* es sensible al cambio de pH en el cultivo celular, lo que haría disminuir la velocidad de síntesis de las enzimas lignolíticas (148).

Al comparar los intervalos de pH obtenidos durante el proceso fermentativo para cada una de las condiciones iniciales empleadas, se observó que un pH de 5.0 presentó mayores valores de q_P para lacasa, Mn-P y Li-P (Tabla 8). Así mismo la producción de biomasa celular fue de 2.019 g/L que se ajusta al valor del diseño del cultivo de 2 g/L.

La cinética de variación del pH es específica y depende marcadamente del tipo de microorganismo (3). Para el caso del *Pleurotus ostreatus* la condición del pH inicial de 5.0 presentó el menor intervalo de pH, 0.7 unidades, con respecto a las demás condiciones trabajadas, favoreciendo de esta forma la producción de las enzimas lacasa, Mn-P y Li-P.

3.3.2 Estudio de la composición del medio de cultivo en la cepa seleccionada. Esta experiencia tuvo por objeto estudiar el efecto de la

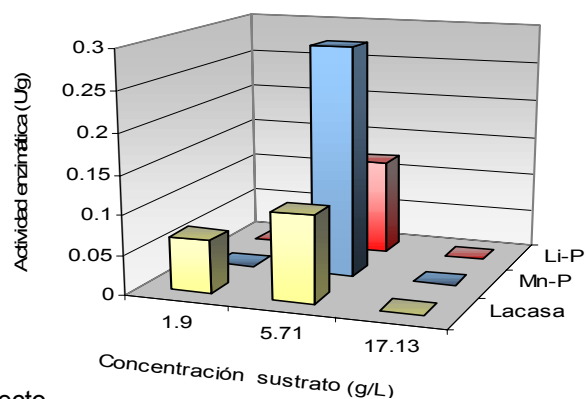
composición del medio de cultivo, en la producción de ligninasas por *P. ostreatus* sobre paja de trigo.

Los medios de cultivo fueron diseñados para obtener una concentración celular de 2g/L, con base en la composición del sustrato celulósico (paja de trigo). Además se definió como sustrato limitante la fuente de carbono y la de nitrógeno, es decir paja de trigo y sulfato de amonio, este último de grado analítico.

3.3.2.1 Estudio del efecto de la concentración de carbono en la composición del medio de cultivo para la producción de enzimas lignolíticas. Se estudió el efecto del contenido de carbono bajo condiciones de limitación y exceso de la concentración del sustrato lignocelulósico (paja de trigo). Se trabajaron concentraciones de: 1.9g/L, 5.71 g/L y 17.13g/L. La cinética de crecimiento fue llevada a cabo durante 140 horas. La composición del medio de cultivo empleado en este estudio se presenta en el anexo G.

La figura 21 presenta las máximas actividades específicas de lacasa, Mn-P y Li-P obtenidas durante el tiempo de fermentación para las concentraciones de sustrato celulósico empleado.

Figura 21. Valores máximos de actividad enzimática de lacasa, Mn-P y Li-P presentados en el proceso fermentativo con *Pleurotus ostreatus*.



Fuente: Autora del proyecto

En la tabla 9 se registran los valores máximos de las actividades específicas y productividad específica (q_p) para las tres enzimas obtenidas en este trabajo con la cepa *Pleurotus ostreatus*. Además se indica el rendimiento del sustrato para la producción de biomasa ($Y_{p/x}$) y el contenido en g/L de azúcares reductores. En la tabla se observan los valores de los parámetros cinéticos para la actividad de lacasa, Mn-P y Li-P son mayores al utilizar el medio de cultivo con una concentración de 5.71 g/L de sustrato. Al limitar o exceder la concentración de carbono, es decir, una concentración del sustrato de 1.9 g/L y 17.3 g/L, se observó un bajo rendimiento en la producción de lacasa y no se detectó actividad para Mn-P y Li-P. Igualmente se puede observar que a esta misma concentración de sustrato (5.71 g/L) se obtuvo el máximo valor de azúcares reductores.

Tabla 9. Efecto de la variación de la concentración de la fuente de carbono sobre los parámetros cinéticos de producción de enzimas lignolíticas, azúcares reductores y rendimiento

Concentración del sustrato (g/L)	Enzima	q_p (U/g.día)*	Actividad enzimática (U/g)*	$Y_{p/x}$ máximo	Azúcares reductores (g/L)
1.9	Lacasa	0.068	0.068	0.340	0.058
	Mn-P	-	-	-	
	Li-P	-	-	-	
5.71	Lacasa	0.110	0.110	0.550	0.1870
	Mn-P	0.145	0.290	1.290	
	Li-P	0.061	0.121	0.358	
17.3	Lacasa	2.60×10^{-4}	1.342×10^{-4}	4.54×10^{-3}	0.1004
	Mn-P	-	-	-	
	Li-P	-	-	-	

Fuente: Autora del proyecto

*Valores máximos: calculados con relación al tiempo en el cual se obtuvo la máxima productividad específica para cada actividad enzimática.

Las actividades específicas para lacasa, Mn-P y Li-P y el rendimiento en enzima con *Pleurotus ostreatus* (tabla 9 y figura 21) se vieron favorecidas principalmente a

una concentración normal de carbono 5.71 g/L, es decir, a la requerida en el diseño del medio de cultivo para su crecimiento a nivel de matraces. Cabe destacar la producción de Li-P a esta concentración, pues en las experiencias preliminares con este sustrato no expresó actividad, probablemente se deba a la especificidad de esta enzima con el pH ajustado al inicio de la fermentación y el cual presentó no presentó una gran variación (5.0 – 4.5) durante 140 horas de llevada a cabo la cinética de crecimiento celular.

En general, los valores de actividad enzimática con *P. ostreatus* obtenidos pueden compararse con los resultados de otros investigadores que, empleando la técnica de fermentación sólida, obtuvieron valores máximos a los 140 días de fermentación (137).

Tabla 10. Cuadro comparativo de actividades de fermentación sólida y fermentación semi-sólida para *Pleurotus ostreatus*

	Mn-P (U/g)	Li-P (U/g)	Lacasa (U/g)
<i>P. ostreatus</i>	3.7 ^a	-	0.68 ^a
	0.290 ^b	0.061 ^b	0.110 ^b

a. Valores obtenidos por Camacho a los 140 días

b. Valores obtenidos en este trabajo

Fuente: Autora del proyecto

En los medios de cultivo evaluados con limitación de la fuente de carbono (1.9 g/L) sólo favorecieron la producción de lacasa, probablemente en este caso sería insuficiente la cantidad de sustrato para el medio de cultivo utilizado, o que una mayor proporción de carbono se dirige hacia el metabolismo de manutención de *P. ostreatus*. De igual forma al exceder la fuente de carbono (17.3 g/L) se obtuvieron únicamente valores mínimos de actividad para lacasa; esta disminución

en el valor de $Y_{p/x}$ puede deberse a las limitaciones de transferencia de oxígeno en el cultivo debido a la alta cantidad de sustrato insoluble presente en el medio.

3.3.2.2 Estudio del efecto de la concentración de nitrógeno en la composición del medio de cultivo para la producción de enzimas lignolíticas.

Para el caso de la fuente de nitrógeno, se estudió el efecto de la concentración de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sobre la producción de enzimas lignolíticas. Los medios de cultivo empleados se muestran en el anexo G.

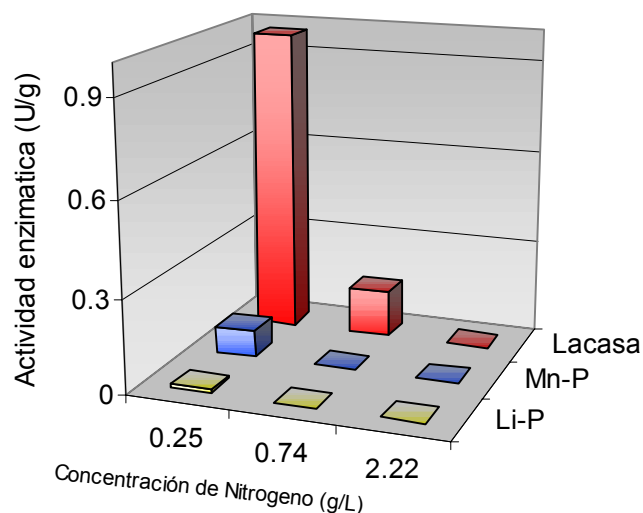
La cinética de crecimiento fue llevada a cabo durante 140 horas, utilizando concentraciones de 0.25 g/L, 0.74 g/L y 2.22 g/L de sulfato de amonio grado analítico (figura 22). Los parámetros cinéticos determinados en estas experiencias se indican en la tabla 11, en ésta se aprecia que al limitar la fuente de nitrógeno (0.25g/L) se obtienen los mayores valores de producción de ligninasas, mientras que en los cultivos que se utilizaron concentraciones más altas (0.74 y 2.22g/L) se obtuvieron valores de actividad más bajos para lacasa, y no se expresó la actividad enzimática de manganeso peroxidasa y lignina peroxidasa.

Tabla 11. Efecto de la variación de la concentración de la fuente de nitrógeno $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sobre los parámetros cinéticos de producción de enzimas lignolíticas, azúcares reductores y rendimiento

Concentración $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)	Enzima	q_p (U/g.día)*	Actividad enzimática (U/g)*	$Y_{p/x}$ máximo	Azúcares reductores (g/L)
0.25	Lacasa	0.490	0.9761	2.00	0.096
	Mn-P	4.3×10^{-2}	0.0860	8.71×10^{-2}	
	Li-P	5.6×10^{-3}	0.0119	2.4×10^{-2}	
0.74	Lacasa	0.075	0.150	2.15×10^{-2}	0.097
	Mn-P	-	-	-	
	Li-P	-	-	-	
2.22	Lacasa	5.48×10^{-3}	5.48×10^{-3}	1.80×10^{-2}	0.068
	Mn-P	-	-	-	
	Li-P	-	-	-	

*Valores máximos: calculados con relación al tiempo en el cual se obtuvo la máxima productividad específica para cada actividad enzimática.

Figura 22. Valores máximos de actividad enzimática de lacasa, Mn-P y Li-P presentados en el proceso fermentativo en el estudio del efecto de la variación de la concentración de la fuente de nitrógeno.



Fuente: Autora del proyecto

Es claro que la fuente de nitrógeno es un factor determinante en la síntesis de las enzimas lignolíticas, lo cual ha sido estudiado por varios investigadores (148,146) quienes determinaron que las fuentes de nitrógeno de tipo amonio, como sulfato o nitrato, favorecen la producción de enzimas por hongos filamentosos.

Como se observa en, la figura 22 y la tabla 11 los mayores valores de actividad de lacasa, Mn-P y Li-P se presentan a una concentración de sulfato de amonio de 0.25 g/L, al limitar el cultivo; esto probablemente se deba a que estas enzimas se expresan en condición de limitación de nutrientes (carbono-nitrógeno), en este caso nitrógeno, ya que una vez que se consume la fuente de amonio, el microorganismo requiere de más nutriente para su crecimiento, y por lo tanto necesita degradar las fracciones de lignina presentes en el medio de cultivo, lo

cual induce la producción de estas enzimas. Mientras que al utilizar concentraciones más elevadas de sulfato de amonio (0.74 y 2.22 g/L) se observa una disminución en las actividades de dichas enzimas, como posible causa de la baja producción a estas concentraciones se puede suponer que un exceso de sulfato estimula el metabolismo del nitrógeno el cual probablemente compite con la producción de las enzimas, ya que estas pueden requerir de los mismos cofactores inhibiéndose por lo tanto la producción de las enzimas. Corroborando lo expuesto por Kirk y colaboradores (1978) (12), al suponer una competencia metabólica entre enzimas lignolíticas y el metabolismo microbiano.

Por lo tanto al comparar los resultados de los parámetros cinéticos se observa que el medio de cultivo con limitación de la fuente de nitrógeno (sulfato de amonio) se obtiene mejores valores de productividad específica (q_P) y rendimiento de enzima ($Y_{P/X}$) para las enzimas lacasa, Mn-P y Li-P.

3.3.2.3. Estudio del efecto de Inductores y surfactantes en la producción de enzimas lignolíticas. La actividad enzimática de lacasa en cultivos con especies de *Pleurotus* puede incrementarse por la adición al medio de cultivo de compuestos aromáticos en concentraciones pequeñas (146). Investigadores como Muñoz y colaboradores demostraron que la lacasa se induce por la adición de alcohol Veratrílico sobre paja de trigo y utilizando diferentes especies de *Pleurotus*.

Las concentraciones de inductores utilizadas en este trabajo, sobre los medios de cultivo evaluados, se basaron en las investigaciones realizadas por Souza y colaboradores (150), quienes evaluaron el efecto de diversos compuestos fenólicos y aromáticos, entre ellos el alcohol Veratrílico y Dimetoxifenol, sobre diferentes especies de *Pleurotus*.

Al comparar los resultados obtenidos de los parámetros cinéticos (tabla 12), se observa que al adicionar alcohol veratrílico al medio de cultivo en una concentración de 0.25 mM se favorece la inducción de la actividad presentando también valores más altos de actividad enzimática que cuando se estudiaron los efectos inductores de pH y la concentración de carbono en el medio de cultivo. Sin embargo Mn-P presentó un bajo valor de actividad y no se detectó actividad alguna para Li-P.

El medio de cultivo que contenía Dimetoxifenol a una concentración de 0.25 mM, también favoreció la expresión de lacasa pero se obtuvieron valores más bajos de actividad comparados con los obtenidos con alcohol veratrílico. Es importante notar que a concentraciones más altas de inductores sobre el medio (0.5 mM), no se detectó actividad enzimática alguno presentándose una inhibición parcial o total del crecimiento.

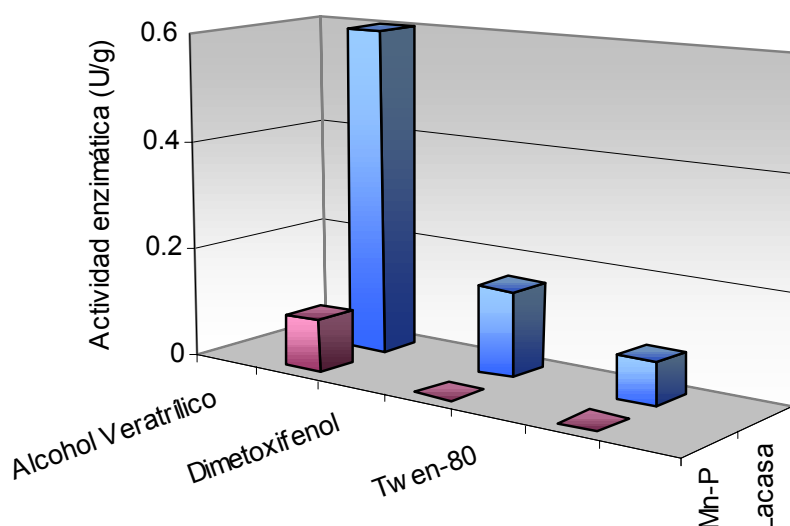
Tabla 12. Parámetros cinéticos obtenidos en el estudio del efecto de inductores sobre la producción de enzimas lignolíticas por *Pleurotus ostreatus*

Inductor		Enzima	q _p (U/g.día)*	Actividad enzimática (U/g)*	Y _{p/x} máximo	Azúcares reductores (g/L)
Alcohol Veratrílico	0.25 mM	Lacasa	0.3186	0.641	0.168	0.196
		Mn-P	0.048	9.5 x10 ⁻²	0.081	
	0.5 mM	Lacasa	-	-	-	
		Mn-P	-	-	-	
Dimetoxifenol	0.25 mM	Lacasa	7.86x10 ⁻²	0.157	0.341	0.146
		Mn-P	-	-	-	
	0.5 mM	Lacasa	-	-	-	
		Mn-P	-	-	-	
Twen-80	0.01%p/v	Lacasa	0.0381	7.62 x10 ⁻²	0.123	0.135
		Mn-P	-	-	-	
	0.1%p/v	Lacasa	-	-	-	
		Mn-P	-	-	-	

*Valores máximos: calculados con relación al tiempo en el cual se obtuvo la máxima productividad específica para cada actividad enzimática.

En el presente trabajo el Tween 80 fue utilizado como surfactante para evaluar su efecto sobre la excreción de las enzimas lignolíticas, en concentraciones de 0.01% - 0.1 % p/v, que fue adicionado al medio de cultivo al inicio de la fermentación; como se observa en la tabla 12 a una baja concentración favoreció únicamente la actividad para lacasa, mientras que a una concentración más alta de surfactante sobre el medio de cultivo se produjo una inhibición de las enzimas de interés.

Figura 23. Valores máximos de actividad enzimática de lacasa y Li-P presentados en el proceso fermentativo en el estudio del efecto de inductores



Fuente: Autora del proyecto

En la figura anterior se presentan las máximas actividades enzimáticas obtenidas durante el proceso fermentativo para lacasa y lignina peroxidasa. De acuerdo con los resultados obtenidos se observa un efecto inductor mayor de la actividad de lacasa y lignina peroxidasa, mientras que manganeso peroxidasa no expresó actividad para ninguno de los medios utilizados.

CONCLUSIONES

Se determinó para los microorganismos *P. ostreatus*, *P. eryngii* y *P. pulmonaris* el crecimiento y producción de enzimas lignolíticas utilizando como sustrato desechos agroindustriales de cultivos tropicales (paja de trigo, tuza de mazorca y salvado de trigo) encontrados en la región de Santander.

Se encontró que la producción de enzimas lignolíticas para los sustratos empleados mediante la técnica de fermentación en sustrato semisólido (FSsS), es sensible a la concentración de azúcares reductores, condiciones de pH y dependiente del tipo de inductor presente tanto en la composición química del sustrato sólido como en el medio de cultivo en general, favoreciendo o inhibiendo la producción de dichas enzimas.

La producción de mayores niveles de enzimas lignolíticas depende del tipo de sustrato celulósico empleado en el medio de cultivo como fuente única de carbono.

Se alcanzaron mayores valores de productividad específica (q_P), actividad enzimática (U/g) y rendimiento de enzimas ($Y_{P/X}$) a nivel de matraces en el cultivo que contenía paja de trigo como fuente de carbono y el hongo *Pleurotus ostreatus* (CBS 411,71).

Se determinó el efecto del pH inicial sobre el crecimiento celular y la producción de enzimas lignolíticas para *P. ostreatus*, utilizando paja de trigo como sustrato; obteniéndose los mejores niveles de expresión de las actividades enzimáticas de lacasa, Mn-P y Li-P a un valor de pH de 5.0.

Se presentaron mejores valores de producción de enzimas lignolíticas para *P. ostreatus* a una concentración de 5.71 g/L de la fuente de carbono (paja de trigo). Al aumentar o disminuir la concentración del sustrato lignocelulósico (1.9 y 17.3 g/L) se observó una clara disminución sobre la producción de dichas enzimas.

Al evaluar el efecto inductor de la fuente de nitrógeno sobre la producción de las enzimas lacasa, Mn-P y Li-P para *Pleurotus ostreatus*, se observaron los mejores niveles de expresión de estas enzimas al utilizar la concentración más baja de sulfato de amonio (0.25 g/L) en el medio de cultivo.

La presencia simultánea de alcohol veratrílico y de paja de trigo en los medios de cultivo favorecieron la expresión de lacasa por parte de *Pleurotus ostreatus*, obteniéndose mayores valores de actividad enzimática que al emplear dimetoxifenol y Tween 80.

Al utilizar altas concentraciones de los inductores, alcohol veratrílico y dimetoxifenol a 0.5 mM sobre el medio de cultivo, se presentó una inhibición parcial o total del crecimiento celular de la cepa de *Pleurotus ostreatus*.

Finalmente, se demuestra que es posible la producción de ligninasas por fermentación sumergida a nivel de matraces mediante el empleo de la cepa *Pleurotus ostreatus* como microorganismo y paja de trigo como sustrato.

RECOMENDACIONES

Para mejorar la producción de ligninasas con el hongo filamentoso *Pleurotus ostreatus* se recomienda realizar los siguientes estudios complementarios:

- Biosíntesis de enzimas lignolíticas empleando un mayor rango de sustratos lignocelulósicos a los empleados en este estudio.
- Evaluar el efecto de las diferentes sales presentes en el medio de cultivo y la realización de un diseño experimental que analice el efecto de dichas sales entre sí.
- Determinar el efecto de otros inductores como colorantes de tipo azo, compuestos aromáticos, PAH's, PCBs y algunos metales como cobre y cadmio en la producción de enzimas lignolíticas.
- Evaluar el efecto de diferentes valores de pH y temperatura sobre el crecimiento y producción de ligninasas mediante fermentación semi-sólida a nivel de fermentador. Se pretende con estas experiencias optimizar el crecimiento celular y la producción de enzimas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Demain, A.L.(1990). In: Microbial Enzymes and Biotechnology (Ed. Fogarty W.), Applied Science Publishers, London, pp 331-352.
2. Aidoo, K., R. Hendry, and J. Wood (1982). Adv. Appl. Microb. 28, 201.
3. Rimbault, M. (1988). In: Solid State Fermentation in conversion of agroindustrial raw materials (Ed., M. Rimbault), ORSTOM- Montpellier, France, pp 5-13.
4. Lambert, P. (1983) In: Filamentous fungi. Vol. 1. (Ed. Smith, J., Berry, D. and Kristiansen, B.), Edward Arnold, London, pp. 210-237.
5. Ladisch, M.R. (1979). Process Biochem. 14, 21.
6. Enari, M. (1990). In: Microbial Enzymes and Biotechnology (Ed.. Fogarty W.), Applied Science Publishers, London, pp 183-223.
7. Kirk, T.K., W.J. Connors, and J.G. Zeikus. (1977) Recent Adv. in Phytochem., 11, 369.
8. Evans, C.S., I.M. Gallagher, P.T. Atkey, and D.A. Wood. (1991). Biodegradation, 2, 25.
9. Betts, W.B., R.K. Dart, A.S. Ball, and S.L. Pedlar (1991). In: Biodegradation: Natural and Synthetic Materials.

10. Eriksson, K.E., R.A., Blanchette and P. Ander (1990). In: Microbial and Enzymatic degradation of wood and wood components, Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp.253-307.
11. Fletcher, A. (1993). J. Biotechnol. 30, 49.
12. Kirk, T.K., and R.L. Farrell (1987). Annu. Rev. Microbiol. 41, 465.
13. Gold, M.H., H. Wariishi, and K. Valli (1989). ACS Symp. Ser. 389, 127.
14. Higuchi, T. (1993). J. Biotechnol. 30, 1.
15. Thurston, C.F. (1994). Microbiology 140, 19.
16. Kuwahara, M.J., M.K., Glenn, M.A., Morgan, and M.H., Gold . (1984). FEBS Lett. 169, 247.
17. Tien, M. and T.K. Kirk (1983). Science 326, 520.
18. Sannia, G., P., Limongi, E. Cocca , F. Buonocore, G. Nitti, and P. Giardina (1991). Biochim. Biophys. Acta 1073, 114.
19. Eggert, C., U. Temp, and K.E. Eriksson (1996). Appl. Environ. Microbiol. 62, 1151.
20. Srebotnik, E., K.A. Jensen, and K.E. Hammel (1994). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 12794.
21. Reinhammar, B., and B.G. Malstrom (1981) In: Copper proteins (metals ions in Biology), (T.G. Spiro, Ed.) John Wiley, New York, USA, pp 109-149.

22. Rehman, A.U., and C.F. Thurston (1992). *J. Gen. Microbiol.* 138, 1251.
23. Aramayo, R., and W.E. Timberlake (1990). *Nucleic Acids Res.* 18, 3415.
24. Williamson, P.R. (1994) *J. Bacteriol.* 176, 656.
25. Liu, L., J.F.D. Dean, W.E. Friedman and K.E. Eriksson. (1994). *Plant. J.* 6, 213.
26. Bourbannais, R., M.G. Paice, I.D. Reid, P. Lanthier, and M. Yaguchi (1995). *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1876.
27. Evans, C., R.G. Veness, and M. Ullah (1998). *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 71, 357.
28. Agosin, E., J.J. Daudin, and E. Odier (1985) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22, 132.
29. Kuhad, R.C., A.Singh and K.E.L. Eriksson (1997). In: "Biotechnology in the Pulp and Paper Industry" (Ed. K.E.L. Eriksson) Springer Verlag, Heidelberg, Germany, pp.45-125.
30. Eriksson, K.E.L. (1990) *Wood Sci. Technol.* 24, 79.
31. Gilbert, I.G, G.T. Tsao (1983) *Annu Rep. Ferm. Proc.* 6, 323.
32. Weimer, P.J. (1992) *Crit. Rev. Biotechnol.* 12, 189.
33. Atalla, R.H. and D.L. van der Hart (1984) *Science* 223, 283.

34. French, A.D: (1989) In: "Cellulose and wood: Chemistry and Technology" (Ed. C. Schuerch), John Wiley, New York, U.S.A. pp 65.
35. Béguin, P. and J.P Aubert (1994) FEMS Microbiol. Rev. 13, 25.
36. Wood T.M. (1988) Methods Enzymol. 160, 19.
37. Knull, L.H. and G.E. Inglett (1980) J.Agric. Food Chem. 28, 917
38. Gordon, A.H., J.A. Lomax and A. Chesson (1983) J. Sci. Food Agri. 34, 1341.
Ford, C.W. (1986) Carbohydr Res. 147, 101
39. Brice, R.E., and I.M. Morrison (1983) Carbohydr. Research 101, 93.
40. Eriksson Ö., D.A.I. Goring, and B.O. Lindgren (1980) Wood Sci. Technol. 14, 267.
41. Chesson, A. H. Gordon and J.A. Lomax (1983) J. Sci. Food. Agric. 34, 1330.
42. Das, N.M. S.C. Das, A.K. Sarkar and A.K. Mukharjee (1984) Carbohydr. Res. 129, 197.
43. McNeil M., P. Alberstein, L. Taiz and R.L Jones (1975) Plant Physiol. 55, 64.
44. Mora, F., J. Comtat, F. Barnoud, F. Pla and P. Noe (1986) J. Wood Chem. Technol. 6, 147.
45. Argyropoulos D.S. and S.B. Menachem (1997). In: "Biotechnology in the Pulp and Paper Industry" (Ed. K.E.L. Eriksson) Springer Verlag, Heidelberg, Germany, pp.127-158.

46. Amer, G.I. and S.W. Drew (1980) *Annu Rep. Ferment. Proc.* 4, 67.
47. Adler, E. (1980) *Wood Sci Technol.* 11, 169.
48. Hatakeyama, T. and H. Hatakeyama (1982) *Polymer* 23, 475.
49. Watanabe, T., J. Ohnishi, Y. Yamasaki, S. Kaitzu and T. Koshijima (1989) *Agric. Biol. Chem.* 53, 2233.
50. Whitemore, F. (1982) *Phytochemistry* 21, 315.
51. Eslyn, W.E. and T.L. Highley (1976) *Phytopathology* 66, 1010.
52. Tuor, U., K. Winterhalter and A. Fietcher (1995) *J. Biotechnol.* 41,1.
53. Otjen, L., R.A. Blanchette, M. Effland and G.F. Leatham (1987) *Holzforshung* 41, 343.
54. Mounfort, D.O. (1987) *FEMS Microbiol. Rev.* 46, 401.
55. Wubah, D.A. , D.E. Akin and W.S. Borneman (1993) *Crit Rev. Microbiol.* 19, 99.
56. Akin, D.E., C.E. Lyon, W.R. Windham and L.L. Rigsby (1989) *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 611.
57. Trinci, A.P.J., D.R. Davies, K. Gull, M.I. Lawrenec, B.B. Nielsen, A. Rickers and M.K. Theodorou (1994) *Mycol. Res.* 98, 129.

58. Liese, W. (1970) *Ann Rev. Phytopathol.* 8,231.
59. Blanchette, R.A., J.B. Sutherland and D.L. Crawford (1981) *Can J. Bot.* 59, 1.
60. Muñoz, C., F. Guillén, A.T. Martinez and M.J. Martinez (1997) *Appl Environ Microbiol.* 63, 2166.
61. Gold, M.H. and M. Alic (1993) *Microbiol. Rev.* 57, 605.
62. Thurston, C.F. (1994) *Micrbiol.* 140, 19.
63. Hatakka, A. (1994) *FEMS Microbiol. Rev.* 13, 125.
64. Youn, H-D, Y.C. Hah and S.O. Kang (1995) *FEMS Microbil Lett.*
65. Böckle, B., M.J. Amrtínez, F. Guillén and A.T. Martínez (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 923.
66. Blanchette, R.A: (1991) *Annu Rev. Phytopathol.* 29, 381.
67. Pévié, F.H. and M.N. Gold (1991) *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2240.
68. Perez, J. and T.W. Jeffries (1992) *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2402.
69. Ribbons, D.W. (1970) *FEBS Lett.* 8, 101.
70. Vicuña, R. B. Gonzalez, D. Seelendreund, C. Rüttimann and L. Salas (1993) *J. Biotechnol.* 30, 9.
71. Zimmerman, W. (1990) *J. Biotechnol.* 13, 119.

72. Shoemaker, H.E. and M.S.A. Leisola (1990) *J. Biotechnol.* 13, 101
73. Higuchi, T. (1990) *Wood Sci. Technol.* 24, 23.
74. De Jong, E., J.A. Field and J.A.M De Bont (1994) *FEMS Microbiol Rev.* 13, 153.
75. Edwards, S.L., R. Raag, H. Wariishi, M. H. Gold and T.L. Poulos (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 750.
76. Pointek, K., T. Glumoff and K. Winterhalter (1993) *FEMS Lett.* 315, 119.
77. Poulos, T.L., S.L. Edwards, H. Wriishi and M.H. Gold (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 4429.
78. Sundaramoorthy, S. , K. Kishi, M.H. Gold and T.L. Poulos (1994) *J. Mol. Biol.* 238, 845.
79. Glenn,J.K., M.A. Morgan, M.B. mayfield, M. Kuwahara and M.H. Gold (1983) *Biochem. Biophys Res Commun* 114, 1077.
80. Palmer, J.M., P.J. Harvey, H.E. Shoemaker, H.W.H. Schmidt and M.S.A. Leisola (1987) *FEBS Lett* 220, 149.
81. Renganatan, V., M.H,. Gold (1986) *Biochemsitry* 25, 1626.
82. Cai, D. And M. Tien (1989) *Biochem. Biophys Res Commun* 162, 464.
83. Cai, D. And M. Tien (1992) *J. Biolo. Chem.* 267, 11149.

84. Wariishi, H., J. Huang, H.B. Dunford and M.H. Gold (1991). J. Biol. Chem. 266, 20694.
85. Hammel, K. (1989). Enzyme Microb. Technol. 11, 776.
86. Field, J.A., E. De Jong, G.F. Costa and J.A.M. de Bont (1993) Trends in Biotech. 11,44.
87. Hammel, K.E. and M.A. Moen (1991) Enzyme Microb. Technol. 13, 15.
88. Barr, D.P., M.N.M. Shah, T.A. Grover, and S.D. Aust (1992) Arch. Biochem Biophys. 298, 480.
89. Kuwahara, M., J.K. Glenn, M.A. Morgan and M.H. Gold (1984) FEBS Lett 169, 247.
90. Wariishi, H., K. Valli and M.H. Gold (1992) J. Biol. Chem. 267, 23688.
91. Martínez, A.T., S. Camarero, F. Guillén, A. Gutierrez, C. Mulñoz, E. Varela, M.J.
92. Martínez, J.M. Barrasa, K. Ruel and M. Pelayo (1994) FEMS Microbiol Rev. 13, 265.
93. Bao, W.L., Y. Fukushima, A. Jensen, M.A. Moen and K.E. Hammel (1994) FEBS Lett. 354, 297.
94. Eggert, C., U. Temp and K.E.L. Eriksson (1996) Appl. Environ Microbiol. 62, 1151.

95. Youn, H.D., Y.C. Hah, S.O.Kang (1995) FEMS Microbiol. Lett. 132, 183.
96. Garzillo, A.M.V., S. Dipaolo, G. Burla and B. Buonocore (1992) Phytochemistry 31, 3685.
97. White N.A. and L. Body (1992) J. Gen . Microbiol. 138, 2589.
98. Vasdev, K. and R.C. Kuhad (1994) Folia Microbiologica 38, 326.
99. Sariaslani, F.S. (1989) Crit. Rev. Biotechnol. 9, 171.
100. Higuchi, T. (1990) Wood Sci Technol. 24, 23.
101. Kawai, S., T. Umezawa, M. Shimada and T. Higuchi (1988) FEBS Lett. 236, 309.
102. Bourbonnais, R. and M.G. Paice (1992) Appl Microbiol. Biotechnol. 36, 823.
103. Gutierrez-Rojas, M., R. Auria, J.C. Benet and S. Revah (1995) Chem. Engin. J. 60, 189
104. Smits, J.P., H.M. van Sonsbeek, J. Tramper, W. Knol, W. Geelhoed, M. Peeters and A. Rinzema (1999) Bioprocess Eng. 20, 391.
105. Cannel, E. and M. Moo-Young (1980) Process Biochem. 6, 2.
106. Lonsane, B.K., N.P. Ghildyal, S. Budiatman and S.V. Ramakrishna (1985) Enzyme Microb. Technol. 7, 258.
107. Bonnarne, P. and W. Jeffries (1990) Appl. Environ. Microbiol. 56, 210.

108. Couto, S. and M.R. Rodríguez (1998) *Biodegradation*, 9, 143.
109. Feijoo, G., C. Dosoretz and J.M. Lema (1995) *J. Biotechnol.* 42, 247.
110. Jäger, A., S. Croan and T.K. Kirk (1985) *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 1274.
111. Kirk, T.K., S. Croan, M. Tien, and R.L. Farrell (1986) *Enzyme Microb. Technol.* 8, 27
112. Li, D., M. Alic, and M.H. Gold (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3447.
113. Kirk, T.K., E. Schultz, W.J. Connors, L.F. Lorenz and J.G. Zeikus (1978) *Arch. Microbiol.* 117, 277.
114. Onysko, K.A. (1993) *Biotechnol. Adv.* 11, 179.
115. Farrel, R.L. (1987) *Phil Trans R. Soc. London A321*, 549.
116. Arebeloa, M., J. Leseleuc, G. Goma and J.C. Pommier (1992) *TAPPI J.* 75, 215.
117. Reid, D. And M.G. Paice (1993) *FEMS Microbiol. Rev.* 13, 369.
118. Kondo, R., K. Harazono, K. Sakai (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4359.
119. Nagarajan, G. And G. Annadurai (1999). *Bioprocess Eng.* 20, 435
120. Spadaro, J.T., M.H. Gold and V. Renganathan (1992) *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2397.

121. Paszcynski, A, R.L. Crawford (1991) *Biochem Biophys. Res. Commun* 178, 1056.
122. Esposito, E., Cnhos, V.P. and N.P. Duran (1991) *Biotechnol. Lett.* 13, 571
123. Eaton, D.C. (1985) *Enzyme Microb. Technol.* 7, 194.
124. Novotny, C., B.R.M. Vyas, P. Erbanova, A. Kubatova and A. Sasek (1997) *Folia Microbiologica* 42, 136.
125. Filed, J., E. De Jong, G. Feijoo-Costa, and J.A.M. de Bont (1992) *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2219.
126. Field, J., R.H. Vledder, J.G. van Zelst and W. Tulkens (1996) *Enzyme Microb. Technol.* 18, 300.
127. Majcherczyk, A., C. Johannes and A. Hüttermann (1998) *Enzyme Microb. Technol.* 22, 335.
128. Kamra, D.N. and F. Zadrazil (1986) *Agric. Wastes* 18, 1.
129. Valmaseda, M., M.J. Martínez and A.T. Martínez (1991) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35, 817.
130. Kerem, Z. and Y. Hadar (1993) *Enzyme Microb. Technol.* 15, 785.
131. Bano, Z., M.N. Shashireka and S. Rajaratham (1993) *Enzyme Microb. Technol.* 15, 985.

132. Schlosser, D., R. Grey and W. Fritsche (1997) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 412.
133. Tien, M. And T.K., Kirk (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 2280.
134. Pease, E.A., S.D. Aust and M. Tien (1991) *Biochem Biophys. Res. Commun.* 179, 897
135. Bourbonnais, R. and M.G. Paice (1990) *FEBS Lett* 236, 309.
136. Rimbault, M. and D. Alazard (1980) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 9, 199.
137. Camarero, S., M.J. Martínez and A.T. Martínez (1996) In: "Advances in solid state fermentation" (Ed. S. Roussos, B.K. Lonsane, M. Rimbault and G. Viniegra-González). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 335-345.
138. Bourbonnais, R. and M.G. Paice (1990) *FEBS Lett.* 267, 99.
139. Rodríguez, S., M.A. Longo, C. Cameselle and A. Sanromán (1999) *Bioprocess Eng.* 20, 531.
140. Linko, S. (1988) *HJ. Biotechnol.* 9, 163.
141. Rogalski, J., A.L. Dawidowicz and M. Wojtas-Wasilewska (1992). *Acta Biotechnol.* 12, 191.
142. Duarte, P., A. M. Diseño Montaje y Puesta en Marcha de un Taller de Fabricación de papel artesanal a partir de la hoja de piña, Tesis de Grado, Escuela de Química, Bucarmanga, 1999.

143. Bradford (1976), Anal . Chem 72, 248-254.
144. Miller (1959), Anal. Chem 31,426.
145. Stickland, (1954), J. Gen. Microbiol. 5, 698-703.
146. Cohen,R. and Persky, L.(2002) Appl Microbial Biotechnol.582-590.
147. Larios, G., García, J. And Huitron, C. (1989). Biotechnol. Lett. 11, 729-734.
148. Leuchtenberger, A.,Frieze, E. And Ruttolff, H. (1989). Biotechnol.Lett. 11,255
149. Acevedo, F.et al (1992). Apuntes IV curso latinoamericano de Biotecnología, pp1-22. Ediciones Universitarias, Valparaíso, Chile.
150. De Souza, D., Peralta,R. (2004). J. Basisc Microbiol.129.136.

ANEXOS

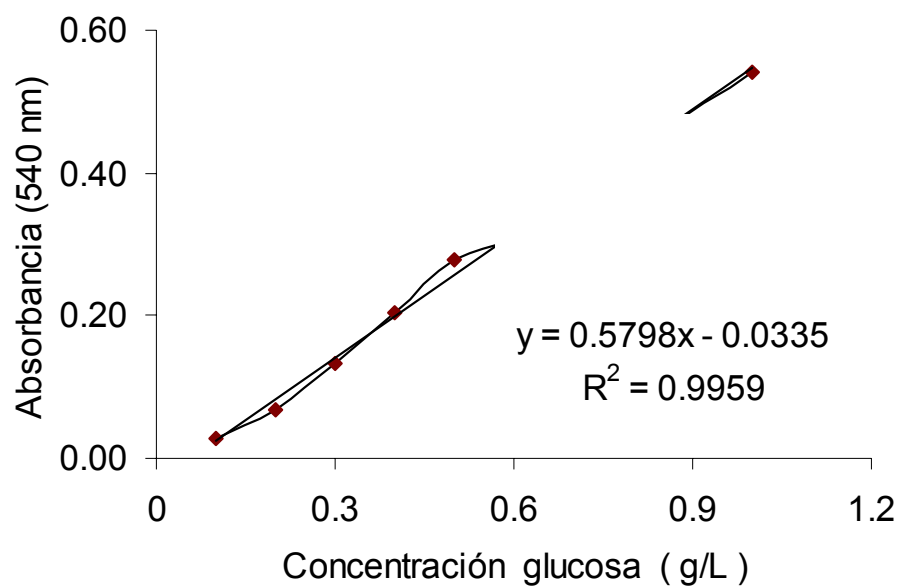
Anexo A. Caracterización de la composición elemental, contenido de celulosa y lignina de Salvado de trigo, Tuza de mazorca y paja de trigo

SUSTRATO	%C	%H	%N	%S	%O	% LIGNINA	% CELULOSA
Salvado de trigo	43.26	5.20	4.54	0	47.00	6.8	17.93
Tuza de mazorca	42.90	4.66	1.83	0	50.61	10.55	28.34
Paja de Trigo	32.10	2.63	0.64	---	---	17.62	48.07

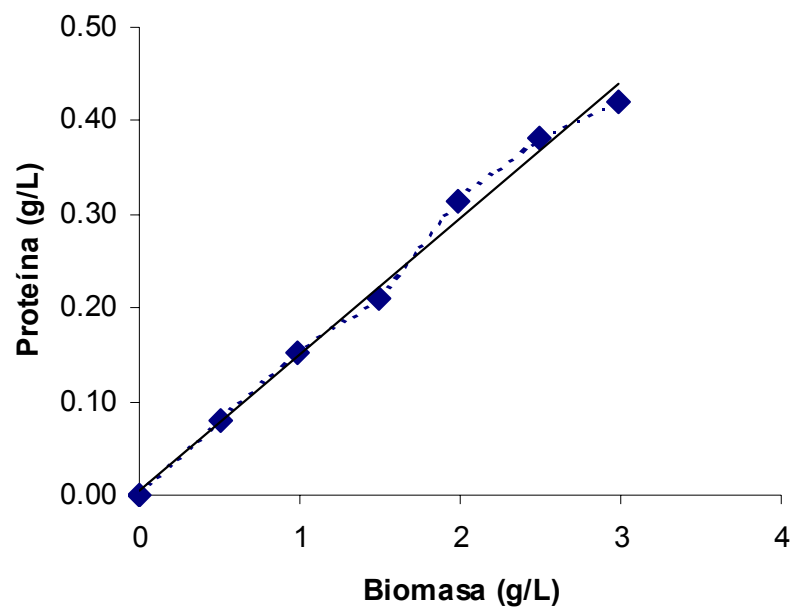
--- valor no determinado

Equipo: Analizador elemental automático EA/NA1110 Thermo Quest (colaboración del director del laboratorio de biotecnología ambiental Rolando Chamy, Escuela de Ingeniería Bioquímica-Universidad Católica de Valparaíso, Chile)

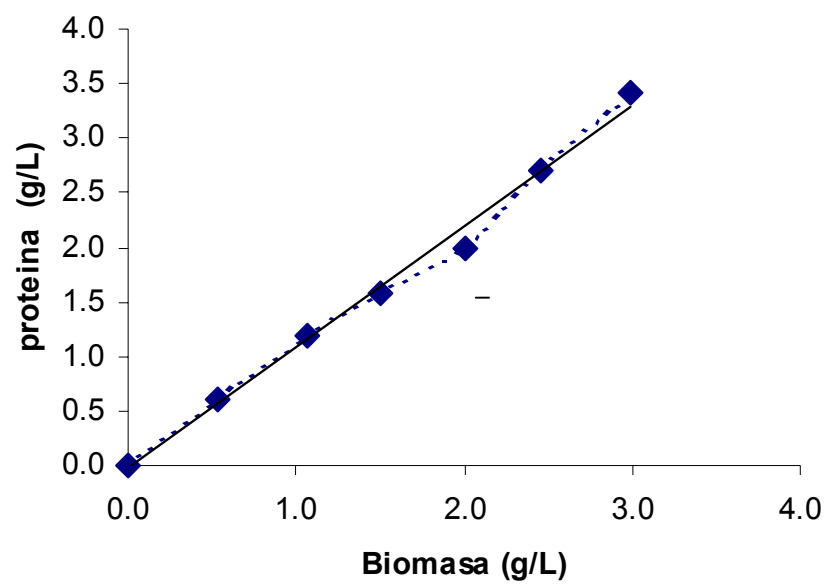
Anexo B. Curva de calibración para determinación de la concentración de azúcares reductores por el método del ácido dinitrosalisílico (DNS)



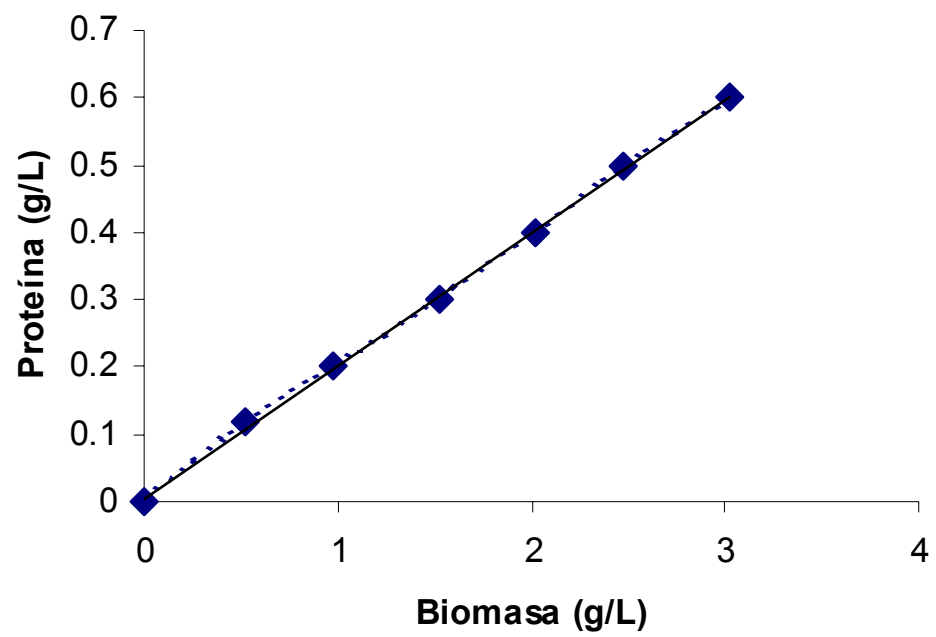
Anexo C. Curva de calibración para determinación de la concentración de proteína extracelular por el método de Bradford (Proteína patrón Albúmina)



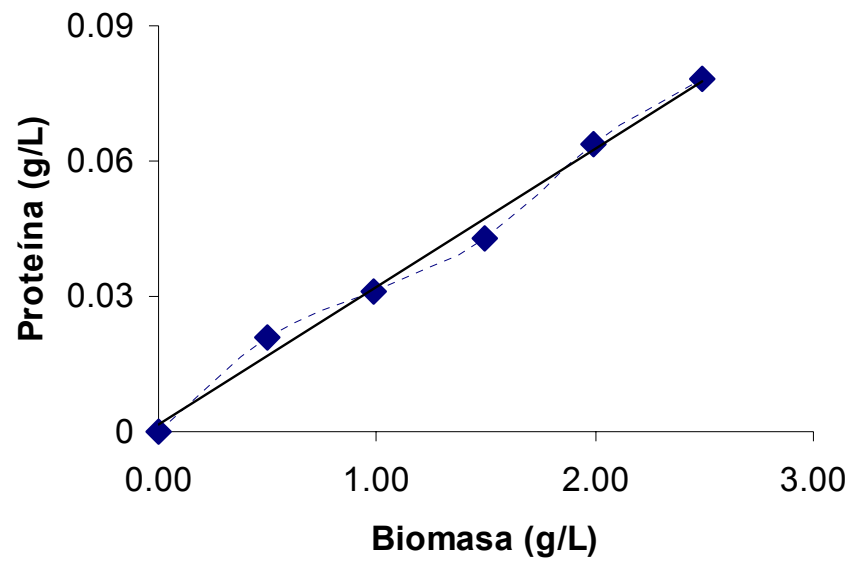
Anexo Da. Curva de calibración para determinación de la concentración de proteína intracelular por el método de Stikland para *Pleurotus pulmonaris*



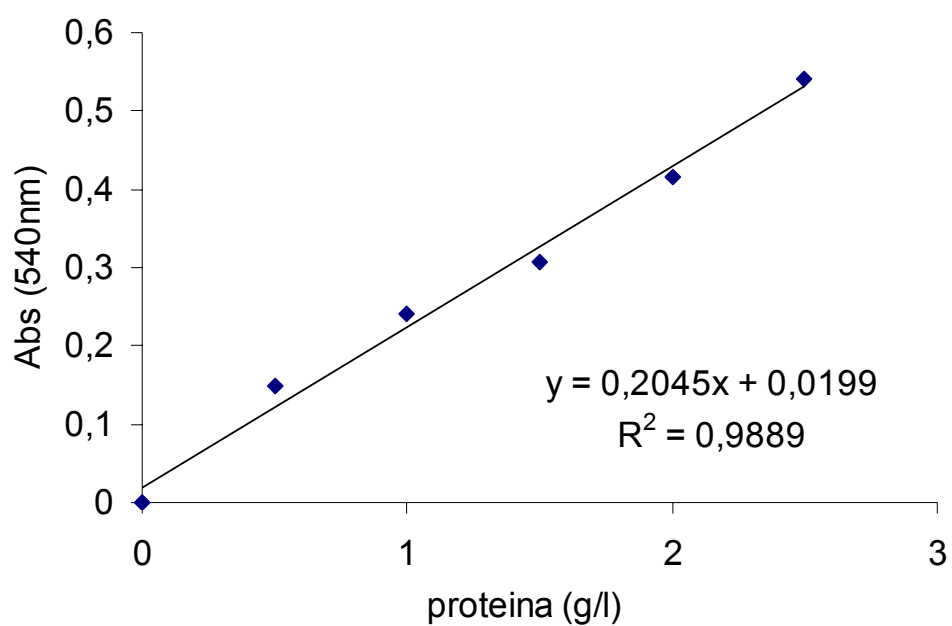
Anexo Db. Curva de calibración para determinación de la concentración de proteína intracelular por el método de Stikland para *Pleurotus Eryngii*



Anexo Dc. Curva de calibración para determinación de la concentración de proteína intracelular por el método de Stikland para *Pleurotus Ostreatus*



Anexo E. Curva de calibración para la determinación de concentración de proteína por el método Stickland (modificado del método de Biuret)



Anexo F. Composición de los medios de cultivos sólidos con Agar-papa-dextrosa y Agar-malta

Medio de cultivo con Agar-papa-dextrosa	
Componente	Concentración (g/L)
Agar-papa-dextrosa	40
Extracto de malta	5
Fosfato monobásico de potasio	5
Medio de cultivo con Agar malta	
Agar-malta	40

Anexo G. Composición de la solución nutriente y condiciones iniciales en el proceso fermentativo para la producción de enzimas lignolíticas utilizando paja de trigo, tuza de mazorca y salvado de trigo como sustratos

Composición de solución nutriente	
Compuesto	Unidades (g/L)
Sustrato lignocelulósico	*
Fuente de carbono (paja de trigo)	.
Fuente de Nitrógeno (NH ₄) ₂ SO ₄	.
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.7425
KH ₂ PO ₄	0.15
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.023
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.068
MnSO ₄	6.18x10 ⁻⁴
CaCl ₂	0.0825
CuSO ₄ 5H ₂ O	5.66 x10 ⁻⁴
Condiciones iniciales	
pH inicial	5.5 [†]
Humedad inicial	77%
Temperatura	28°C
Volumen de reacción	50 mL

*Se emplearon concentraciones de 4.92 g/L, 5.71 g/L y 10.30 g/L de Salvado de trigo, Paja de trigo y Tuza de mazorca respectivamente.

**Para la variación de la fuente de carbono se utilizaron concentraciones de paja de trigo de 5.71 g/L, 1.9 g/L y 17.3 g/L.

***Como fuente de nitrógeno se empleó (NH₄)₂SO₄ en concentraciones de 0.25 g/L, 0,74 g/L y 2.22 g/L.

†En el estudio del efecto del pH se utilizaron valores de pH inicial de 4.0, 4.5 y 5.0

Anexo H. Composición de la solución nutriente y condiciones iniciales en el proceso fermentativo para la producción de enzimas lignolíticas empleados en el estudio del efecto de inductores y surfactantes

Composición de solución nutriente	
Compuesto	Unidades (g/L)
Paja de trigo	5.71
Fuente de Nitrógeno (NH ₄) ₂ SO ₄	0.25
KH ₂ PO ₄	0.15
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.023
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.068
MnSO ₄	6.18x10 ⁻⁴
CaCl ₂	0.0825
CuSO ₄ 5H ₂ O	5.66 x10 ⁻⁴
Surfactantes	
Alcohol Veratrílico	0.025mM
Dimetoxifenol	0.025 mM
Twen-80	0.01%p/v
Condiciones iniciales	
pH inicial	5.0
Humedad inicial	77%
Temperatura	28°C

**Anexo I. Ecuaciones para el cálculo de los parámetros cinéticos:
productividad específica (q_p), actividad enzimática específica (AE) y
rendimiento de formación de biomasa en producto ($Y_{P/X}$)**

Parámetro cinético	Ecuación	Unidades
AE	$\frac{U}{L \times \text{min} \times g(\text{sust. seco})}$	U/g
q_p	$\frac{U/g}{\text{tiempo}(\text{días})}$	U/ g.día
$Y_{P/X}$	$\frac{\Delta P}{\Delta X}$	U/g célula

U: Unidad enzimática ($\mu\text{moles/min}$)

P: Producto formado, referido a la actividad (U/L)

X: concentración de biomasa (g/L)