

**EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIGNOLÍTCAS POR  
HONGOS DE PUDRICIÓN BLANCA EN FERMENTACIÓN SEMISÓLIDA,  
UTILIZANDO DESECHOS AGROINDUSTRIALES COMO SUSTRATO**

**ALEJANDRA MARINA DUARTE PUENTES**

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

**EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIGNOLÍTCAS POR  
HONGOS DE PUDRICIÓN BLANCA EN FERMENTACIÓN SEMISÓLIDA,  
UTILIZANDO DESECHOS AGROINDUSTRIALES COMO SUTRATO**

**ALEJANDRA MARINA DUARTE PUENTES**

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

**Director**

**RODRIGO TORRES SAEZ  
Bioquímico MSc.**

**Codirector**

**WILLIAM LARROTA  
Ing. Químico MSc.**

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

**A mi hijo  
Daniel Fernando....  
....la razón de todos mis propósitos.**

## **AGRADECIMIENTOS**

- Al director de Tesis, codirector y las calificadoras por su colaboración y aportes.
- A Sandra Milena Pinto, por ser acompañante, ayuda y apoyo en esta causa común.
- A mi familia por su apoyo incondicional.
- A todos aquellos que en algún momento, participaron, apoyaron y contribuyeron de muchas formas a la realización y culminación de esta tesis.

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág
INTRODUCCIÓN	15
1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	18
1.1 INTRODUCCIÓN	18
1.2 ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE LOS COMPUESTOS LIGNOCELULÓSICOS.	19
1.2.1 Estructura y composición de la celulosa	21
1.2.2 Estructura y composición de la hemicelulosas	23
1.2.3 Estructura y composición de la lignina	24
1.3 MICROORGANISMOS INVOLUCRADOS EN LA DEGRADACIÓN DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS	27
1.3.1 Hongos	27
1.3.2 Bacterias	29
1.3.3 Microorganismos degradadores de lignina	30
1.4 ENZIMAS LIGNOLÍTICAS	32
1.4.1 Lignina Peroxidasa (Li-P)	32
1.4.2 Manganeso Peroxidasa (Mn-P).	33
1.4.3 Lacasa	34
1.5 PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIGNOLÍTICAS POR FERMENTACIÓN	36

1.6	POSIBILIDADES BIOTECNOLÓGICAS DE LAS ENZIMAS LIGNOLÍTICAS	38
2	MATERIALES Y MÉTODOS	42
2.1	MATERIALES	42
2.1.1	Microorganismos	42
2.1.2	Sustratos	42
2.1.3	Reactivos	43
2.2	METODOLOGÍA ANALÍTICA	43
2.2.1	Determinación de azúcares reductores. Método DNS (Miller, 1959).	43
2.2.2	Determinación de proteína extracelular	44
2.2.3	Determinación de la concentración celular (Stickland, 1954).	45
2.2.4	Determinación de la actividad enzimática de Lacasa	47
2.2.5	Determinación de la actividad enzimática de Manganese Peroxidasa. (Honda 1992).	48
2.2.6	Determinación de la actividad enzimática de lignina Peroxidasa (Hofrichter, 1999).	48
2.2.7	Determinación de Lignina	49
2.2.7.1	Preparación del sustrato libre de extraíbles	49
2.2.7.2	Determinación de lignina (klason) y celulosa (Kurschner y Hoffer).	49
2.2.7.3	Determinación del Contenido de Humedad (Rodriguez, 1978).	50
2.2.8	Análisis elemental de los sustratos celulósicos	50
2.3	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	50
2.3.1	Conservación y propagación de las cepas.	50
2.3.2	Preparación de los medios de Cultivo	51
2.3.2.1	Esterilización	51
2.3.3	Experiencias preliminares de producción de ligninasas	51
2.3.4	Selección del sustrato celulósico y cepa productora	52

2.3.5	Formulación del medio de cultivo	52
2.3.5.1	Estudio del Efecto del pH	52
2.3.5.2	Estudio de la composición del medio de cultivo en la cepa seleccionada	53
2.3.5.3	Estudio del efecto de inductores y surfactantes en la producción de enzimas lignolíticas	53
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
3.1		
	EXPERIENCIAS PRELIMINARES DE PRODUCCIÓN DE LIGNINASAS	54
3.2	SELECCIÓN DEL SUSTRATO CELULÓSICO Y CEPA PRODUCTORA	54
3.2.1	Fermentación utilizando como sustrato salvado de trigo	55
3.2.2	Fermentación utilizando como sustrato paja de trigo	60
3.2.3	Fermentación utilizando como sustrato de tuza de mazorca	75
3.3	FORMULACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO	72
3.3.1	Estudio del efecto del pH inicial del medio de cultivo en la producción de enzimas lignolíticas.	73
3.3.2	Estudio de la composición del medio de cultivo sobre la producción de enzimas lignolíticas por <i>Trametes versicolor</i>	75
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	76
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	78
3.3.2.3	Estudio del efecto de Inductores y surfactantes en la producción de enzimas lignolíticas	79

4.	CONCLUSIONES	83
5.	RECOMENDACIONES	85
	BIBLIOGRAFÍA	86
	ANEXOS	95

## LISTA DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Composición de algunas maderas y residuos lignocelulósicos agroindustriales	20
Tabla 2. Tipos de Enzimas oxidativas producidas por hongos de pudrición blanca	31
Tabla 3. Aplicaciones potenciales de las enzimas y microorganismos lignolíticos	40
Tabla 4. Parámetros cinéticos obtenidos en la producción de enzimas lignolíticas por los hongos <i>Phanerochaete chrysosporium</i> y <i>Trametes versicolor</i> utilizando salvado de trigo como sustrato	58
Tabla 5. Parámetros cinéticos de comparación obtenidos para <i>Phanerochaete chrysosporium</i> y <i>Trametes versicolor</i> , empleando como sustrato paja de trigo	63
Tabla 6. Parámetros cinéticos de comparación obtenidos para <i>Phanerochaete chrysosporium</i> y <i>Trametes versicolor</i> , empleando como sustrato tuza de mazorca	68
Tabla 7. Valores de productividad específica ( $q_p$ ) obtenidos para las diferentes enzimas lignolíticas producidos por los <i>Basidiomycetes</i> en estudio, en cada uno de los diferentes sustratos utilizados	70

Tabla 8.	Efecto del pH en la producción de enzimas lignolíticas por <i>Trametes versicolor</i> empleando como sustrato paja de trigo	73
Tabla 9.	Efecto de la variación de la concentración de la fuente de carbono sobre los parámetros cinéticos de producción de enzimas lignolíticas para <i>Trametes versicolor</i> .	76
Tabla 10.	Efecto de la variación de la concentración de la fuente de nitrógeno ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) sobre los parámetros cinéticos de producción de enzimas lignolíticas, azúcares reductores y rendimiento para <i>Trametes versicolor</i> .	77
Tabla 11.	Parámetros cinéticos obtenidos en el estudio del efecto de inductores y surfactantes sobre la producción de enzimas lignolíticas para <i>Trametes versicolor</i> .	79

## LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Estructura química de la celulosa	21
Figura 2. Estructura microscópica y submicroscópica de la celulosa	22
Figura 3. Precursores primarios de la lignina	25
Figura 4. Modelo esquemático de la lignina de abeto	26
Figura 5. Gráficas de crecimiento celular, producción de proteínas y azúcares reductores para <i>Phanerochaete Chrysosporium</i> empleando salvado de trigo como sustrato	55
Figura 6. Gráficas de crecimiento celular, pH , producción de proteína y azúcares reductores para <i>Trametes versicolor</i> empleando salvado de trigo como sustrato	56
Figura 7. Actividades específicas de Lacasa, Manganese Peroxidasa (Mn-P) para los cultivos de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> y <i>Trametes versicolor</i> en salvado de trigo	58
Figura 8. Gráficas de crecimiento celular, producción de proteínas y azúcares reductores para <i>Phanerochaete chrysosporium</i> empleando paja de trigo como sustrato	62
Figura 9. Gráficas de crecimiento celular, pH , producción de proteína y azúcares reductores para <i>Trametes versicolor</i> empleando paja de trigo como sustrato	62

- Figura 10. Actividades específicas de Lacasa, Manganese Peroxidasa (Mn-P ) y Lignina Peroxidasa (Li-P) para los hongos : *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor* empleando paja de trigo como sustrato 53
- Figura 11. Gráficas de crecimiento celular, producción de proteínas y azúcares reductores para *Phanerochaete chrysosporium* empleando tuza de mazorca como sustrato 66
- Figura 12. Gráficas de crecimiento celular, pH , producción de proteína y azúcares reductores para *Trametes versicolor* empleando tuza de mazorca como sustrato 66
- Figura 13. Actividades específicas de Manganese Peroxidasa, Lacasa, y Lignina Peroxidasa para los Basidiomycetes: *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor* utilizando tuza de mazorca como sustrato 68
- Figura 14. Valores máximos de productividad específica de Manganese Peroxidasa obtenidos en las fermentaciones con *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor* sobre los sustratos paja de trigo, tuza de mazorca y salvado de trigo 70
- Figura 15. Valores máximos de productividad específica de Lacasa obtenidos en las fermentaciones con *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor* sobre los sustratos paja de trigo, tuza de mazorca y salvado de trigo 70
- Figura 16. Valores máximos de productividad específica de Lignina Peroxidasa obtenidos en las fermentaciones con *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor* sobre los sustratos paja de trigo, tuza de mazorca y salvado de trigo 71

- Figura 17. Efecto de las condiciones iniciales de pH en la producción de enzimas lignolíticas por *Trametes versicolor* sobre paja de trigo 73
- Figura 18. Valores máximos de productividad específica de Lacasa, Manganeso Peroxidasa y Lignina Peroxidasa presentados en las fermentaciones de la etapa de diseño de medio con paja de trigo para *Trametes versicolor* 76
- Figura 19. Valores máximos de productividad específica de Lacasa, Manganeso Peroxidasa y Lignina Peroxidasa en el estudio del efecto de la variación de la concentración de la fuente de nitrógeno para *Trametes versicolor*. 79
- Figura 20. Valores máximos de productividad específica de Lacasa y Manganeso Peroxidasa obtenidos en el estudio del efecto de inductores y surfactantes para *Trametes versicolor*. 82

## INTRODUCCIÓN

El empleo de los desechos agroindustriales como sustrato en la producción de enzimas de interés industrial son una alternativa bastante atractiva, debido a que presentan grandes cantidades de celulosa, hemicelulosa, pectina y lignina, que son inductores en la síntesis de enzimas hidrolíticas (Raimbault. 1988; Ladisch, 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, Guillén. 1997).

El objetivo general de este trabajo de investigación fue la evaluación de la capacidad de los hongos del género *Basidiomycetes* de pudrición blanca *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor* de crecer sobre desechos agroindustriales y producir las enzimas lignolíticas tipo 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.

Inicialmente se realizó la preselección del mejor sustrato celulósico y de la mejor cepa productora de enzimas lignolíticas entre los dos 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 *Trametes versicolor* y la paja de trigo, con los que se obtuvieron valores de productividad específica de  $9,471 \times 10^{-6}$  U/g<sub>célula</sub>×hora para Lacasa a las 84 horas,  $2,169 \times 10^{-6}$  U/g<sub>célula</sub>×hora para Manganese Peroxidasa y  $5,885 \times 10^{-6}$  U/g<sub>célula</sub>×hora para Lignina Peroxidasa 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 *Trametes versicolor*, obteniéndose la expresión de Li-P en los tres casos. Estos resultados demostraron el carácter inducible de la producción de enzimas lignolíticas.

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  $1,832 \times 10^{-4}$  U/g<sub>célula</sub>×hora de productividad

específica para Lacasa y  $1,195E-04U/g_{célula} \times hora$  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 *Trametes versicolor*.

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), facilitando 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 enzimas lignolíticas por fermentación semi-sólida a nivel de matraces mediante el empleo de la cepa *Trametes versicolor* y paja de trigo como sustrato a un pH inicial de 5,0 en el medio de cultivo.

## **1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **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.

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. (Kuhad. R.C., 1997)

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. 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. (Eriksson, K., 1990)

## **1.2. ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE LOS MATERIALES 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 (Eriksson, K., 1990).

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

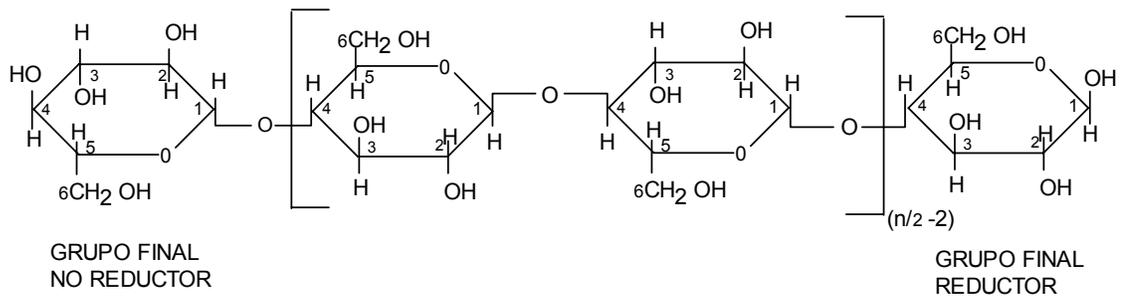
**Tabla 1. Composición de algunas maderas y residuos lignocelulósicos agroindustriales (Kuhad. R.C., 1997).**

Residuo	% Peso Seco			
	Hexosas	Pentosas	Lignina	Cenizas
<b>Maderas Duras</b>				
Abedul	47	20	23	0,2
Madera de Algodón	46	19	24	0,6
Roble	48	18	28	0,4
Alamo	45	19	20	0,1
<b>Maderas Blandas</b>				
Pino Blanco	44	11	28	0,1
Pino Jack	41	10	27	0,1
Arbol de Piña	57	8	24	0,4
Abeto rojo	43	12	27	0,2
Abeto blanco	44	10	27	0,3
<b>Residuos Agroindustriales</b>				
Bagazo de caña	33	30	29	4
Desechos de cebada	40	20	15	11
Mazorca de Maíz	42	39	14	2
Paja de avena	41	16	11	12
Tallos de algodón	42	12	15	6
Cáscaras de nueces	38	36	16	5
Cáscaras de arroz	32	24	13	18
Paja de trigo	30	24	18	10

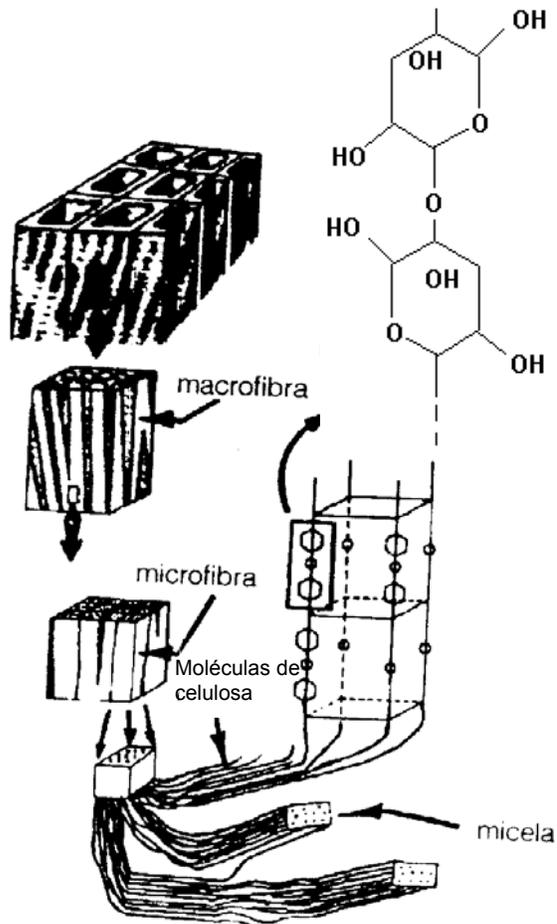
La madera y los residuos lignocelulósicos están conformados por células o fibras. La madera es un material poroso que consiste en una matriz de paredes de fibras. La pared de fibra tiene tres constituyentes principales: celulosa, hemicelulosa y lignina.

### 1.2.1. Estructura y composición de la celulosa

La celulosa es un homopolímero lineal de monómeros de glucosa unidos a través de enlaces  $\beta$ -1,4-glicosídicos (figura 1) (Gilbert, 1983). 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) (Weimer, 1992).



**Figura 1. Estructura Química de la celulosa.**



**Figura 2. Estructura microscópica y submicroscópica de la celulosa.**

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*) (Beguin, 1994). El grado de cristalinidad de la celulosa del algodón es cercano al 70%, mientras que para celulosas comerciales varía de 30-70%. 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 (Eriksson, 1990).

### **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 las 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 (Knull,1980; Gordon,1983). Los valores de DP en la hemicelulosa varían de 100-200. La mayoría de las hemicelulosas está construidas por enlaces  $\beta$ -1,4 entre sus monómeros de azúcar pero las hemicelulosas formadas con base en galactosa están  $\beta$ -1,3 enlazadas.

Se ha propuesto que el xilano constituye una interface entre la lignina y otros carbohidratos en muchos complejos fenólico-carbohidrato (Brice 1983; Eriksson 1980), donde ellos estarían probablemente unidos a los residuos fenólicos a través de residuos arabinosil (Chesson, 1983) y/o glucuronosil (Das,1984).

Los xilanos tienden a absorber celulosa y agregarse con otros componentes hemicelulósicos. 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 (Mora,1986).

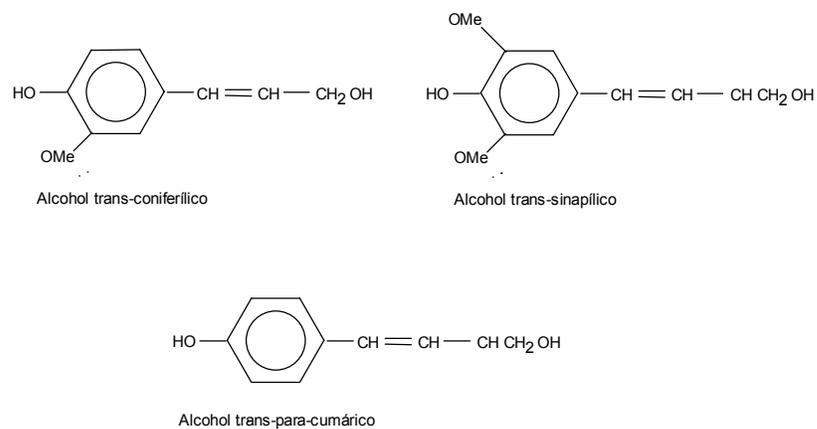
### **1.2.3. Estructura y composición de la lignina**

Después de la celulosa, la lignina es uno de los biopolímeros más abundantes del planeta. Su peso molecular puede alcanzar 100 kDa o más (Argyropoulos, 1997). 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  $2 \times 10^{10}$  toneladas al año (Eriksson, 1990; Argyropoulos, 1997).

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 (Amer, 1980). 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 (Argyropoulos, 1997).

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:  $\beta$ -aril éter y  $\alpha$ -aril éter (Adler, 1980).



**Figura 3. Precursores primarios de la lignina.**

Las ligninas presentan una estructura polimérica amorfa que no posee cristalinidad (Hatakeyama, 1982). 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 (French, 1989). Por ejemplo, se unen a glucoronoxilanos de la hemicelulosa a través de enlaces bencil-éster (Das, 1984). También se han encontrado enlaces covalentes entre las cadenas laterales de L-arabinosa o xilosa y ligninas a través de enlaces éter (Watanabe, 1989).

Muchos estudios han sugerido que los sustituyentes del esqueleto de las hemicelulosas tales como arabinosa, galactosa y ácido 4-O-metilgalacturónico 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.

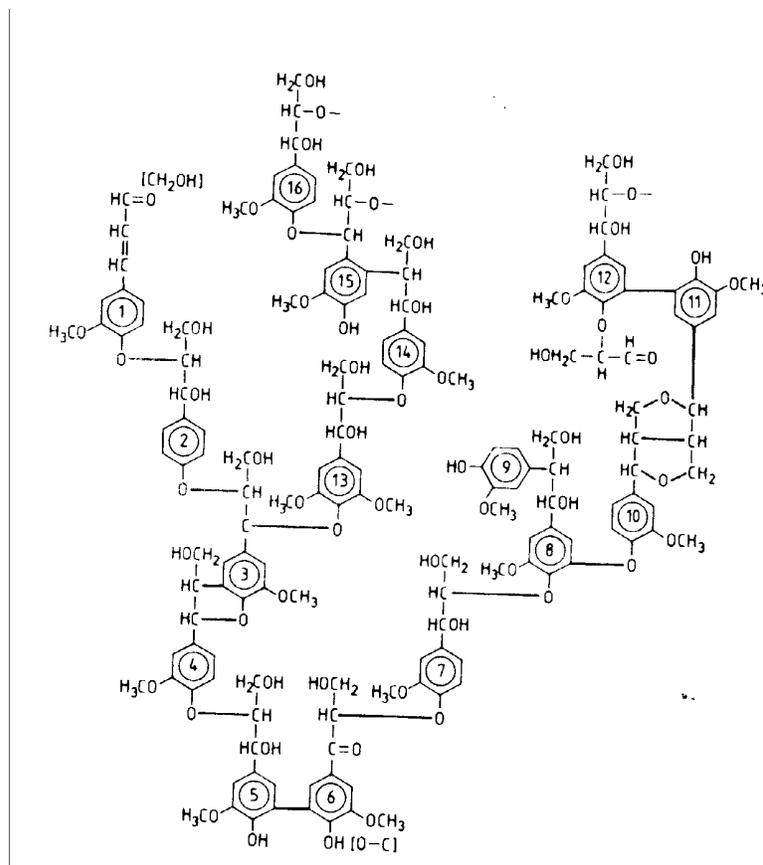


Figura 4. Modelo esquemático de la lignina de abeto.

### 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.

Muchos microorganismos obtienen el carbono y/o sus requerimientos energéticos a partir de estos residuos, que son modificados antes de entrar en la célula ya sea por un proceso de despolimerización o transformación de los desechos.

#### 1.3.1. Hongos

Los grupos de hongos degradadores de madera 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 (Eriksson y col, 1990; Kuhad y col, 1997).

Se destacan entre los hongos de pudrición suave: **Aspergillus niger**, **Fusarium Oxysporum**, **Trichoderma viride (reesei)** y **Chaetomium cellulolyticum**, entre otros (Eriksson y col, 1990, Kuhad y col, 1997). 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 blandas (Tour y col ,1995).

Entre los hongos de pudrición parda se destacan ***Poria placenta***, ***Tyromyces balsemeus***, ***Comiophora puteana***, ***Gloephyllum trabeum***, entre otros. 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. 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 (Eriksson y col, 1990; Kirk & Farrel, 1987; Kuhad y col, 1997).

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***. La mayoría de los hongos pertenecen al género de los ***Basidiomycetes*** a excepción de ***Ustulina vulgaris*** que es ***Ascomycete***. penetran célula a célula (Eriksson, 1990).

Estos hongos son capaces de atacar simultáneamente las fracciones de celulosa, hemicelulosa y lignina de las paredes de las células vegetales (Eriksson et al, 1990; Kuhad et al, 1997; Kanapp and Howell, 1985; Otjen et al , 1987).

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 (Otjen, 1987). Los hongos de pudrición blanca crecen en los diferentes tipos de maderas duras y blancas.

### 1.3.2. 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 a la madera de forma simultánea con los hongos, colonizando principalmente las células parenquimales. Bacterias ruminales son los principales degradadores de las paredes células de fibras vegetales. Se han estudiado algunas bacterias tales como: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* y *flivifaciens* (Kuhad, 1997). Estas especies se adhieren fuertemente a paredes de células vegetales parcialmente degradadas.

Algunos tipos de *Actinomycetes* (eubacterias filamentosas) degradan también activamente materiales lignocelulósicos. Se han reportado diferentes especies de *Streptomyces* capaces de colonizar vesículas, fibras y células parenquimales (Blanchette, 1981).

### **1.3.3. 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 (Eriksson, 1991; Kirk, 1987). 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 (Eriksson, 1991). Estos microorganismos producen una serie de enzimas oxidativas extracelulares (Tabla 2). Las enzimas más importantes son Mn-peroxidasa, Lignina Peroxidasa y lacasa. (Kirk, 1987; Kuhad, 1997; Muñoz, 1997).

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 (Eriksson, 1990). 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, el Mn se ha encontrado depositado en la madera blanca podrida (Eriksson, 1990; Blanchette, 1991), y se ha reportado que juega un rol regulatorio en la degradación de lignina y la expresión de lacasa, Mn-P y Li-P (Pévié, 1991; Perez, 1992).

Los hongos de pudrición suave degradan eficientemente polisacáridos de la madera pero metabolizan la lignina lenta e incompletamente (Kuhad, 1997).

La mayoría de los hongos de pudrición suaves producen enzimas las cuales demetoxilan ácido vanílico en la presencia de NADH y oxígeno para formar ácidos orgánicos y formaldehído. 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**

Hongos de pudrición blanca AAO	LiP	Enzimas oxidativas		
		MnP	Lacasa	
<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 radiatas</i>	X	X	X	
<i>Phlebia tremellosus</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 sajo-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:** Manganeso Peroxidasa, **AAO:** Aril alcohol oxidasa

**X:** Indica presencia de actividad enzimática

Los hongos de pudrición parda prefieren degradar madera de coníferas. Entre los hongos degradadores de lignina se destacan las especies de **Polyporus** (Tour,1995). Estos hongos causan extensa degradación de los polisacáridos, pero degradan parcialmente la lignina. 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 (Vicuña, 1993). 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 (Zimmerman, 1990).

#### **1.4. ENZIMAS LIGNOLÍTICAS**

El complejo sistema enzimático de las enzimas lignolíticas está conformado por peroxidasas, lacasas y oxidasas productoras de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dentro de estas enzimas las lacasas y peroxidasas se definen como fenol oxidasas (Eriksson, 1990). 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. 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 (Edwards, 1993; Poulos, 1993). Estos estudios han mostrado que MnP presenta un alto grado de similitud estructural con Li-P (Sundaramoorthy, 1994).

##### **1.4.1. Lignina Peroxidasa (Li-P)**

Esta enzima (ligninasa, EC 1.11.1.14) se descubrió en cultivos lignolíticos de *P. chrysosporium* (Tien,1983; Glenn,1983), 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  $\beta$ -O-4 eter y  $C_{\alpha}$ - $C_{\beta}$  de compuestos modelos diméricos de lignina. La enzima cataliza también la decarboxilación de ácido fenilacético, oxidación de alcoholes  $C_{\alpha}$ -aromáticos a compuestos  $C_{\alpha}$ -oxo-aromáticos, hidroxilación, formación de quinonas y apertura de anillos aromáticos (Palmer, 1987).

LiP 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 (Renganatan, 1986; Cai,1992). En el ciclo catalítico el Fe (III) unido a la fracción proteica de LiP es oxidado por  $H_2O_2$  al compuesto I y luego se produce la reducción del compuesto I con alcohol veratrílico (Wariishi;1991) al compuesto II.

Debido a su alto potencial redox, LiP 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 (Evasns,1991; Betts,1991; Hammel,1989). La enzima puede depolimerizar soluciones diluidas de lignina, oxidar y degradar una variedad de dímeros y oligómeros similares a lignina *in vitro* (Higuchi, 1990) y catalizar la producción de especies activadas.

#### **1.4.2. Manganeso Peroxidasa (Mn-P)**

Esta peroxidasa se encuentra en los cultivos lignolíticos de *P. chrysosporium* y fue descubierta por Kuwahara y colaboradores (Kuwahara, M., J.K; 1984). La enzima actúa exclusivamente como una fenoloxidasa de sustratos fenólicos usando  $Mn^{+2}/Mn^{+3}$  como un intermediario redox. Se ha demostrado que MnP es también capaz de producir  $H_2O_2$  en la oxidación de glutatión, NADPH y ácido dihidroximálico (De Jong, E; 2002). 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 (Wariishi, H;1992). Los agentes quelantes utilizados por los hongos de pudrición blanca son ácidos orgánicos tales como ácido malónico, pirúvico, oxálico y málico. MnP posee un ciclo catalítico muy similar al de LiP. Recientemente se han detectado altos niveles de Mn-P en cultivos de *P. Eryngii*.

Se ha reportado que MnP puede oxidar estructuras fenólicas y de lignina y degradar cloroligninas de alto peso molecular (Shoemaker, H.E,1990: Martínez, A.T, 1994). También es capaz de depolimerizar moléculas de lignina al romper enlaces  $C_{\alpha}-C_{\beta}$  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 (Shoemaker, H.E.,1990). También puede atacar estructuras no-fenólicas vía peroxidación lipídica (Bao, W.L.,1994).

### 1.4.3. Lacasa

Las lacasas (Bencenodiol: O<sub>2</sub> 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 (Eggert, C.,1996). Estas enzimas 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 (Reinhammar, B.,1981; Sariaslani, F.S.,1989). Estas enzimas se consideran fenoloxidasas con una especificidad amplia hacia compuestos aromáticos que contienen grupos aminos e hidroxilos (Youn, H.D.,1995). Estas enzimas han sido aisladas a partir de varios hongos y sus funciones bioquímicas se han discutido ampliamente (Thurston, C.F.1994,). 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 (Higuchi, T. ,1990).

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<sub>α</sub> y rompimiento de enlaces C<sub>α</sub> - C<sub>β</sub> (Youn, H.D.,1995). Esta enzima al igual que LiP es capaz de catalizar el rompimiento de anillos aromáticos (Kawai, S.,1988). Hasta 1990, se había considerado que la lacasa era capaz de degradar solo compuestos fenólicos modelos (Higuchi, T.,1990). 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 (Bourbonnais, R.,1992).

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 (Aramayo, R.,1990), patogenicidad y biosíntesis y degradación de lignina (Thurston, C.F.1994). 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 (Liu, L.,1994).

### **3.5. 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 (Gutierrez-Rojas, M.,1995).

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 a 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 la fermentación (Cannel, E;1980). 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.

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 (Kirk, T.K.,1987; Gold, M.H,1993). En estos estudios se ha observado que la limitación por nitrógeno 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. 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.

***P. chrysosporium*** es un hongo filamentoso, y cuando crece en cultivos líquidos agitados forma gránulos (pellets). Los pellets son formados por la agregación de las esporas inmediatamente antes y durante la germinación del hongo (Jäger, A., 1985). Las enzimas Li-P y Mn-P se producen durante el metabolismo secundario y como se mencionó antes bajo limitación por nitrógeno. Los cultivos sumergidos agitados de ***P. chrysosporium*** forman pellets miceliales que suprimen la degradación de lignina y bajan la producción de LiP (Kirk, T.K., 1978). Es por ello que la producción en fermentaciones sumergida dependen 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 la productividad de las enzimas MnP y lacasa. Sin embargo, pocos estudios se han llevado a cabo para la producción continua de enzimas lignolíticas (Rodríguez, S., 1999; Rogalski, J., 1992).

Se han realizado también estudios de biodegradación utilizando hongos del género *Pleurotus* para la remoción de lignina de madera, paja de trigo y arroz (Valmaseda, M., 1991). 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. 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 (Bano, Z., 1993). 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 (Bourbonnais, R., 1990).

## 1.5. POSIBILIDADES BIOTECNOLÓGICAS DE LAS ENZIMAS LIGNOLÍTICAS

Las enzimas lignolíticas producidas por hongos de pudrición blanca poseen un amplio espectro de especificidades 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). 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. Para ello se han usado enzimas como; Mn-P, Li-P y lacasa (Arebeloa, M., 1992).

Las enzimas lignolíticas pueden usarse también en procesos de decoloración de efluentes contaminados con colorantes. Se ha usado para este propósito Li-P y lacasa como también Mn-P de diversos tipos de hongos de pudrición blanca. 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 (Evans, C., 1998). Estos hongos se caracterizan por tolerar y/o detoxificar algunos pesticidas así como mezclas de químicos a concentraciones que serían tóxicas para otros microorganismos (Field, J.A., 1993).

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. 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***. Se ha investigado también la capacidad de las enzimas lignolíticas en biotransformar hidrocarburos poliaromáticos (PAH's) (Majcherczyk, A., 1998). 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 (Field, J., 1996).

**Tabla 3. Aplicaciones potenciales de las enzimas y microorganismos lignolíticos.**

<b>Área Industrial</b>	<b>Campo de Aplicación</b>
Alimentos	Producción de hongos comestibles, mejoramiento de la digestibilidad de madera y residuos agroindustriales para alimentación animal.
Pulpa y Papel	Biopulpaje y bi blanqueo de pulpa de celulosa, modificación de fibras de la pulpa, delignificación de chips de madera para reducir el 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.

---

El potencial de los hongos de pudrición blanca se ha ampliado también al procesamiento de residuos lignocelulósicos para la producción de alimentos. Se ha logrado disminuir el contenido de lignina con hongos del género ***Pleurotus*** y aumentar considerablemente la digestibilidad de los residuos agroindustriales (Valmaseda, M., 1991). 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 de 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 dos hongos de pudrición blanca del género *Basidiomycetes*: *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725; y *Trametes versicolor* IJFM A136 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 y una temperatura de 28 °C.

2.1.2. **Sustratos.** Las experiencias de fermentación se realizaron utilizando como sustratos insolubles los desechos agroindustriales de los cultivos de trigo y maíz (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. La adecuación de los sustratos se hizo mediante un secado al aire, después una molienda en molino de cuchillas utilizando mallas de 2 mm; hasta obtener material particulado, que posteriormente fue separado en un tamiz serie Tyler entre mallas 40/60, correspondiente a un tamaño de partícula de 800 micras y por último se empacaron en recipientes cerrados para mantener

constante la humedad residual. También se realizó la caracterización de los sustratos en cuanto a su composición elemental, contenido de celulosa y lignina que se presentan en las tablas del anexo A.

**2.1.3. Reactivos.** Se emplearon los siguientes reactivos de grado analítico:  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$  (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 METODOLOGÍA ANALÍTICA**

**2.2.1 Determinación de azúcares reductores. Método DNS (Miller, 1959).** La determinación de azúcares reductores se realizó utilizando el 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 a baño maría.
- 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 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 Albúmina de suero bobino 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 la presencia en el cultivo de sustrato insoluble y a las características morfológicas de los microorganismos (formación de pellets) se presentó dificultad en la obtención de una muestra homogénea y representativa para determinar por peso seco la concentración celular.

La determinación de la concentración celular se realizó de forma indirecta determinando cantidad de proteína intracelular en la biomasa y sustrato obtenidos por filtrado y lavado del contenido total de un matraz que corresponde a una muestra en el tiempo (50 ml).

La proteína intracelular se determinó utilizando 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 obtenidos 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 Anexos Da y Db) que correlaciona la absorbancia a 540 nm y la concentración de proteína celular para cada una de las cepas utilizadas, respectivamente. A su vez estas curvas se obtuvieron previamente correlacionando en una curva de calibración la absorbancia a 540 nm y concentración de albúmina a 540 nm (ver anexo E).

#### **Procedimiento.**

- Centrifugar un volumen dado 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 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  $\mu$ l). La oxidación del ABTS fue seguida por el incremento de la absorbancia a 420 nm ( $\xi_{420} = 36.000 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ).

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

**2.2.5 Determinación de la actividad enzimática de Manganeso Peroxidasa. (Honda, 1992).** La actividad de Manganeso 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  $\text{MnSO}_4$ , 0,1 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  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 Manganeso peroxidasa fue calculada restando el valor de la actividad en ausencia de  $\text{MnSO}_4$

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  $\text{H}_2\text{O}_2$  y 50 a 100  $\mu$ L de solución de

enzima. La reacción fue iniciada con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la formación del veratril aldehído fue monitoreada a 310 nm ( $\xi_{310} = 9.300 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ).

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

### **2.2.7. Determinación de Lignina. (Rodríguez, 1978).**

**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 por la norma TAPPI T 13m-54. Las muestras fueron tratadas inicialmente con ácido sulfúrico 24 N y posteriormente con una solución de éste al 3% (v/v) hasta la sedimentación de la lignina para su respectiva cuantificación. Los resultados fueron expresados como porcentaje de lignina, promedio de tres determinaciones.

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 (Rodríguez, 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. Los resultados se obtienen como porcentajes de C, H, N, O y S. Anexo A.

## **2.3 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**2.3.1 Conservación y propagación de las cepas.** Las cepas de *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor* 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 *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes*

*versicolor* 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.** Para las experiencias con cada uno de los sustratos sólidos (desechos celulósicos) se diseñaron los respectivos medios de cultivo para obtener una concentración celular de 2g/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 recipientes de 500 mL que contenían 50 mL de medio de cultivo, la solución para preparar los inóculos líquidos y el material de vidrio empleado durante la inoculación, fueron esterilizados 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 sustrato sólido y de la mejor cepa productora se realizaron fermentaciones para cada una de 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. Para 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 día); 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. 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 estudió la influencia de diferentes concentraciones de Carbono en el medio de cultivo sobre la producción de enzimas lignolíticas, utilizando concentraciones de 5,71 g/L, 17,13 g/L y 1,9 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 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.

**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 DISCUSION**

#### **3.1 EXPERIENCIAS PRELIMINARES DE PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIGNOLÍTICAS.**

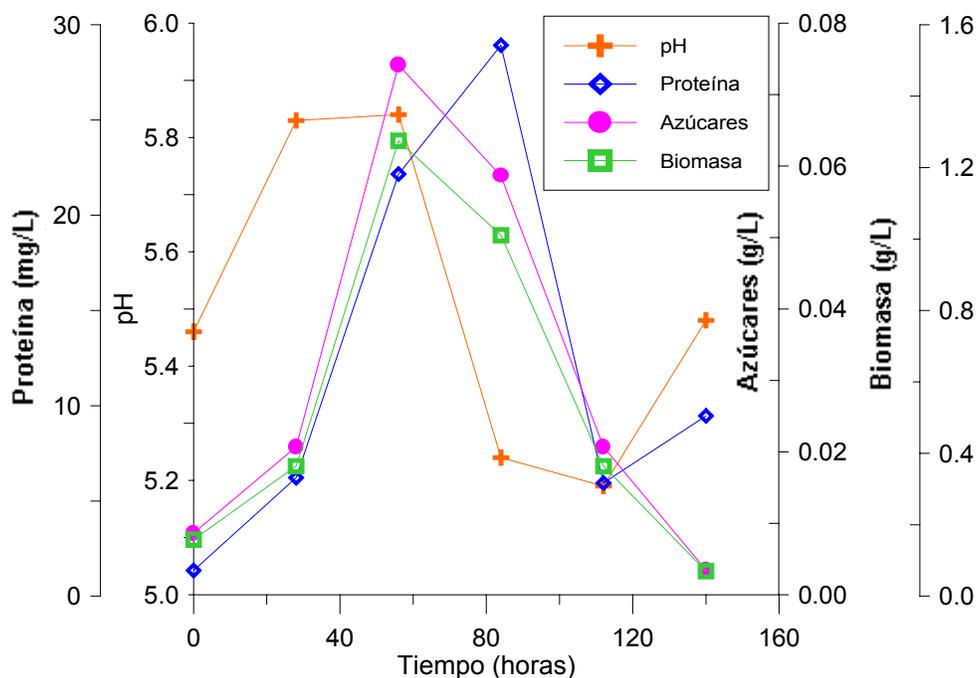
Con el fin de observar las características del cultivo y producción de las enzimas lignolíticas, se llevaron a cabo experiencias preliminares con *Phanerochaete Chrysosporium* y *Trametes versicolor*. Estas experiencias permitieron verificar el crecimiento celular en el medio de cultivo propuesto inicialmente en 2.3.3. Los dos hongos filamentosos crecieron normalmente con pH inicial 5,5. 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 las enzimas lignolíticas.

#### **3.2 SELECCIÓN DEL SUSTRATO CELULÓSICO Y CEPA PRODUCTORA**

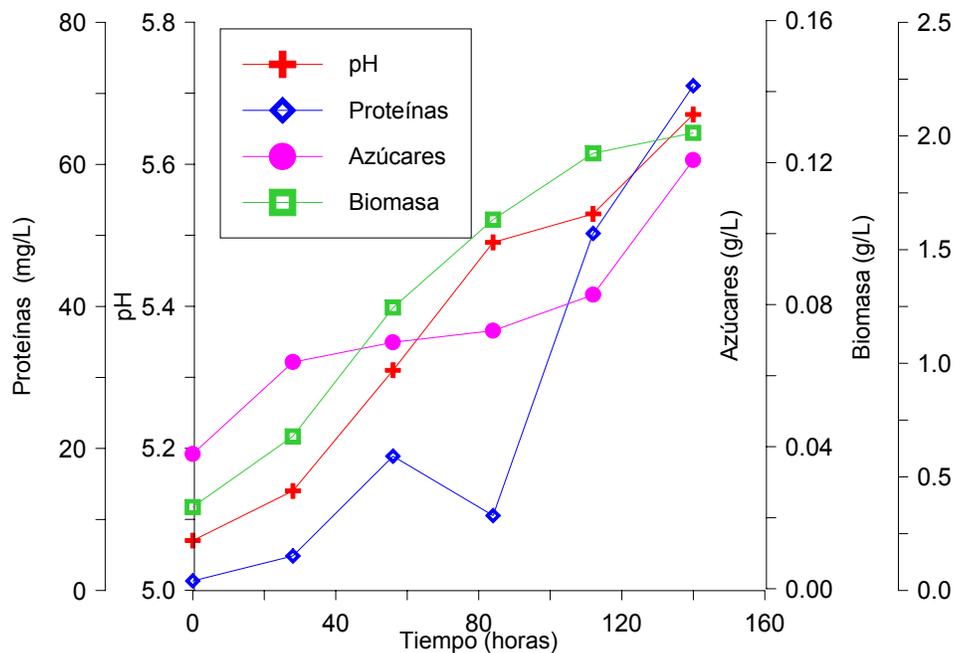
Esta experiencia tuvo por objetivo el estudio de la capacidad de los hongos del género *Basidiomycetes*: *Phanerochaete Chrysosporium* y *Trametes versicolor*, de crecer y producir las enzimas lacasa, manganeso peroxidasa (Mn-P) y lignina peroxidasa (Li-P) sobre los sustratos agroindustriales: paja de 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 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 y 6, se muestran las cinéticas de crecimiento celular, producción de proteína, azúcares y pH para los *Basidiomycetes*: *Phanerochaete Chrysosporium* y *Trametes versicolor*, durante un tiempo de fermentación de 140 horas empleando como sustrato salvado de trigo.



**Figura 5. Gráficas de crecimiento celular, producción de proteínas y azúcares reductores para *Phanerochaete Chrysosporium* empleando salvado de trigo como sustrato.**



**Figura 6. Gráficas de crecimiento celular, pH, producción de proteína y azúcares reductores para *Trametes versicolor* empleando salvado de trigo como sustrato.**

En las gráficas de las figuras se observa el comportamiento cinético para un cultivo por lotes, donde solo hay intercambio de gases (aireación, producción de CO<sub>2</sub>, etc.) con los alrededores. Una vez iniciada la fermentación, esta transcurre de forma característica presentando diferentes fases en cuanto al crecimiento celular, producción de proteínas y azúcares reductores, lo que evidencia la degradación del sustrato celulósico por parte de los microorganismos.

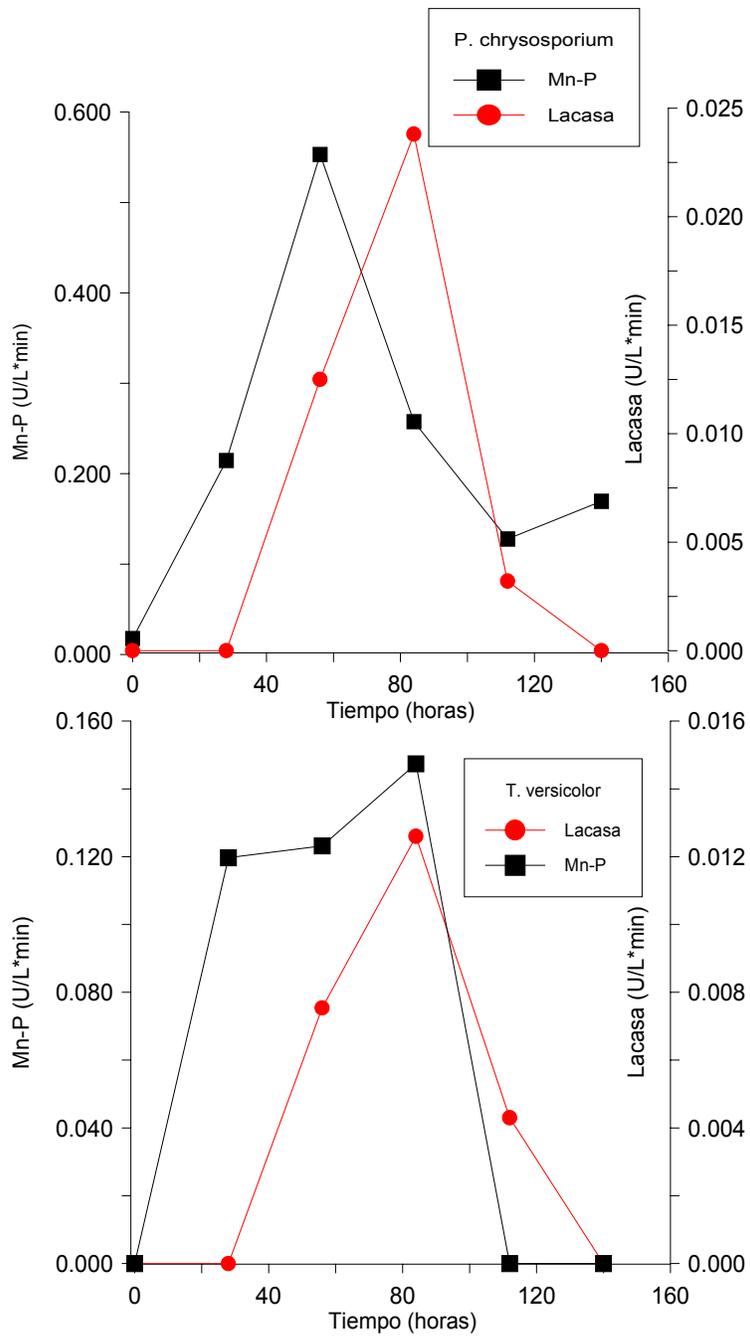
En la figura 5 se observa la cinética de crecimiento de *Phanerochaete chrysosporium* alcanzándose una concentración celular de 1,27 g/L alrededor de las 56 horas, seguida de una caída que indica que el cultivo entró en fase de muerte, característica de las fermentaciones de este tipo de microorganismos. Igual comportamiento presentó la producción de azúcares reductores y proteína extracelular cuyos valores máximos fueron 0,074 g/L y 28,92 mg/l

respectivamente. La concentración celular alcanzada por *Phanerochaete chrysosporium* es un 36,5% menor a 2 g/L que fue el valor estimado en el diseño del medio de cultivo. Esto sugiere que se produjo una disminución del rendimiento celular para el sustrato celulósico o que el carbono disponible para este hongo es consumido a una menor velocidad

Por otro lado en la figura 6 se observa que *Trametes versicolor* alcanza una concentración celular de 2,01 g/L a las 140 horas de cultivo. El aumento constante en la producción de biomasa muestra que la fase exponencial de crecimiento se mantuvo a lo largo de todo el tiempo de la fermentación. La producción de proteína extracelular y azúcares reductores se ve asociada al crecimiento celular alcanzando valores máximos de 71,08 mg/L y 0,1207 g/L respectivamente a las 140 horas de la fermentación.

En la figura 7 se puede observar que en el cultivo de *Phanerochaete chrysosporium* se presentó actividad de Mn -P, alcanzando 0.5531 U/L×min en el final de la fase exponencial de crecimiento (56 horas) para posteriormente disminuir al igual que el contenido de proteína después de las 84 horas de cultivo. Para el *Trametes versicolor* se observó 0.1474 U/L×min de Mn-P a las 84 horas de fermentación. Con respecto a la actividad enzimática de Lacasa, en las dos cepas se encontraron los valores más altos a las 84 horas.

En la Tabla 4 se registran los valores máximos de las actividades específicas AE (U/g sustrato seco), productividades específicas  $q_p$  (U/g sustrato seco×h) y rendimientos de actividad en biomasa  $Y_{P/X}$  (U/g célula) para cada una de las enzimas lignolíticas utilizando como sustrato el salvado de trigo.



**Figura 7. Actividades específicas de Lacasa, Manganese Peroxidasa (Mn-P) para los cultivos de *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor* en salvado de trigo.**

A partir de los valores obtenidos en este proceso, se observó que los valores máximos de AE,  $q_p$ , y  $Y_{p/x}$  para Mn-P se obtuvieron durante las primeras 56 horas y para Lacasa se dieron a las 84 horas para los dos hongos, lo cual sugiere que la producción de enzimas se encuentra relacionada con el crecimiento de los Basidiomycetes, corroborando lo expuesto por Hatakka, 1994; Erikson y col, 1990; Warishii y col, 1992; quienes afirman que estas enzimas son de carácter inducible, en la presencia de pequeñas cantidades de compuestos fenólicos (material lignocelulósico). La actividad de Li-P no fue detectada durante las fermentaciones realizadas con salvado de trigo.

**Tabla 4. Parámetros cinéticos obtenidos en la producción de enzimas lignolíticas por los hongos *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor* utilizando salvado de trigo como sustrato.**

Basidiomycete	Enzima	Tiempo de max $q_p^*$ (horas)	AE (u/g)*	$q_p^*$ máx (u/g .hora)	$Y_{p/x}$ máx (u/g de biomasa)	A Reduc máx (g/l)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Lacasa	84	0,0048	$5,759 \times 10^{-5}$	0,024	0,074
	Mn-P	56	0,1124	$2,007 \times 10^{-3}$	0,434	
	Li-P	-	-	-	-	
<i>Trametes versicolor</i>	Lacasa	84	0,0026	$3,049 \times 10^{-5}$	0,008	0,083
	Mn-P	28	0,0243	$8,689 \times 10^{-4}$	0,177	
	Li-P	-	-	-	-	

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

Otro efecto que pudo alterar la producción de las enzimas fue la variación del pH. Para la fermentación con *Phanerochaete chrysosporium* el pH se mantuvo relativamente constante entre 5,46 y 5,19 con un máximo de 5,84, asociado con el incremento en la producción de proteínas, para después descender hasta 5,48. En el cultivo de *Trametes versicolor* se presentó un incremento continuo del pH

hasta el final de la fermentación, llegando a un valor de 5,67, debido 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.

Cabe destacar que para el *P. chrysosporium* García y Torres (2001) reportaron valores menores de  $q_p$  para Mn-P en las experiencias en fermentación sólida que los obtenidos en este trabajo.

Al evaluar la capacidad entre las dos cepas empleadas para la producción de enzimas lignolíticas, se observó que *Phanerochaete chrysosporium*, en salvado de trigo, obtuvo los mayores valores de  $q_p$  para cada una de las enzimas detectadas

**3.2.2 Fermentación utilizando 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 8 y 9 muestran el comportamiento de los *Basidiomycetes: Phanerochaete Chrysosporium* y *Trametes versicolor* para un periodo fermentativo de 140 horas utilizando paja de trigo como sustrato lignocelulósico.

La producción de proteína y azúcares reductores en todos los casos se vio asociada al crecimiento celular, pero en esta oportunidad los dos microorganismos presentaron perfiles característicos de este tipo de fermentaciones donde se puede apreciar una fase de crecimiento y una fase estacionaria; lo contrario a lo mostrado cuando se utilizó salvado de trigo como sustrato, donde *P. chrysosporium* no presentó fase estacionaria y *T. Versicolor* se mantuvo en fase de crecimiento a lo largo de toda la fermentación.

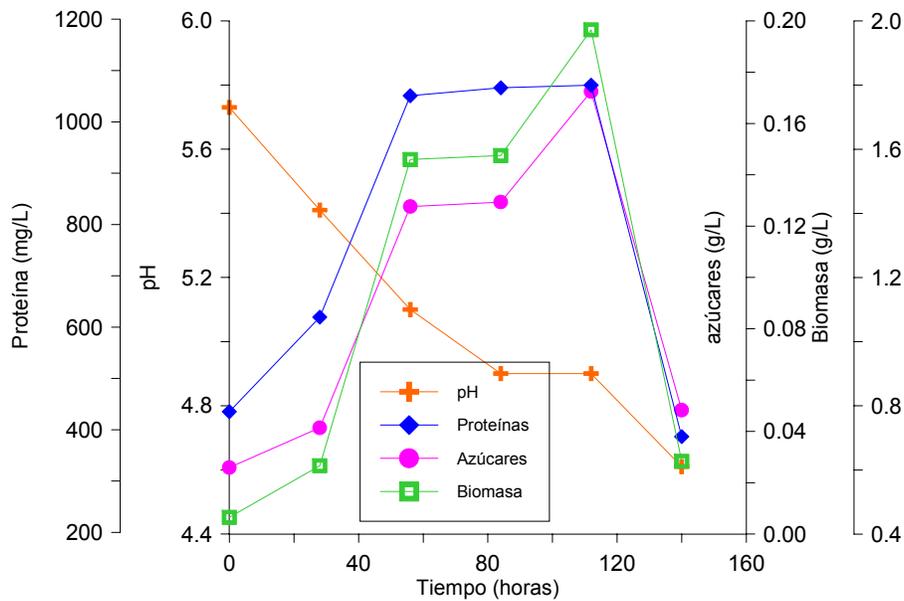
Para el hongo *Phanerochaete Chrysosporium* se obtuvo una concentración celular de 1.97 g/L a las 112 horas de fermentación y para *Trametes versicolor* a las 56 horas se obtuvo 1.58 g/L de biomasa, a partir de este tiempo se inicia la fase estacionaria de crecimiento celular. La producción de proteína extracelular alcanzó valores máximos a las 112 horas de iniciado el proceso fermentativo.

En estas figuras también se puede observar una disminución en el valor de pH para *Phanerochaete Chrysosporium* hasta 4,61 y en 4,83 para *Trametes versicolor* en el final de la fermentación; debido a la producción de proteína y al consumo de la fuente de nitrógeno por parte de los microorganismos.

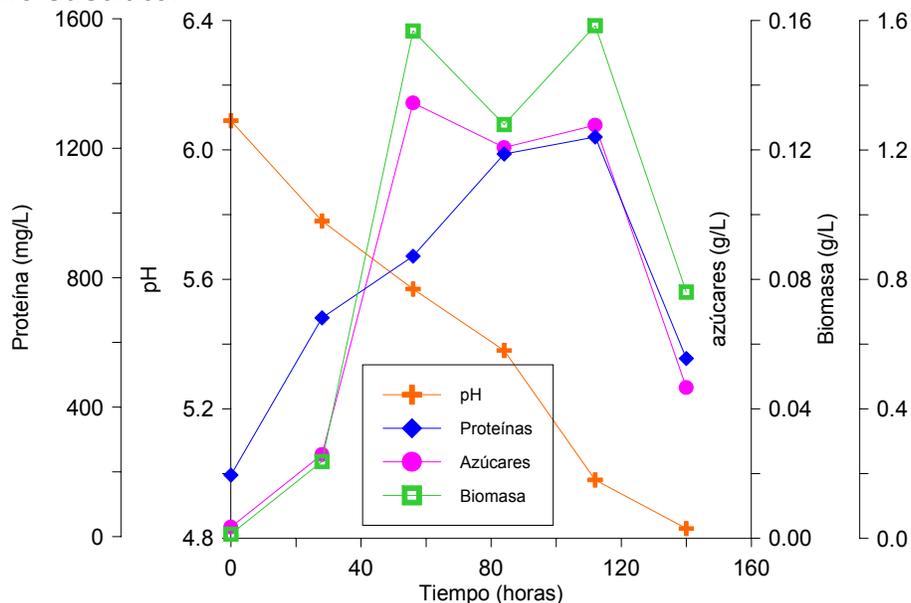
Con respecto a la actividad enzimática para los dos microorganismos, que se muestra en la figura 10; estos expresaron actividad de Mn-P, Lacasa y Li-P durante la fermentación; para *T. Versicolor* se ve claramente asociada al inicio de producción de proteínas (figura 9). Las dos cepas mostraron en una sola oportunidad actividad de Mn-P; el *P. Chrysosporium* lo hizo al final de la fermentación y *T. Versicolor* hacia la mitad de la fermentación.

En cuanto a la actividad de Lacasa los microorganismos mostraron un valor máximo inicial para luego disminuir. La actividad de Li-P fue expresada, por los dos microorganismos, durante la fermentación con paja de trigo contrario al comportamiento con salvado de trigo donde no se registro.

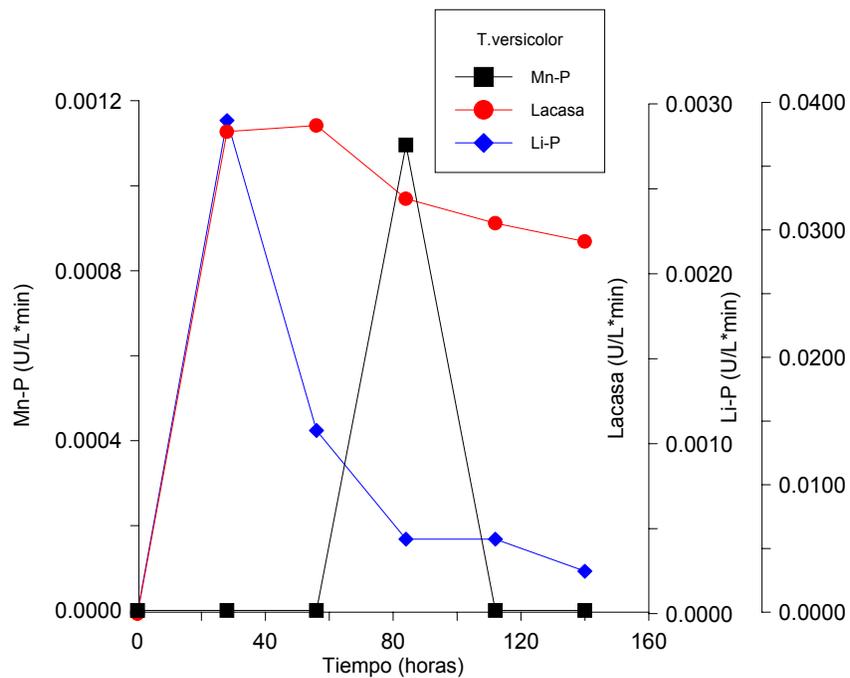
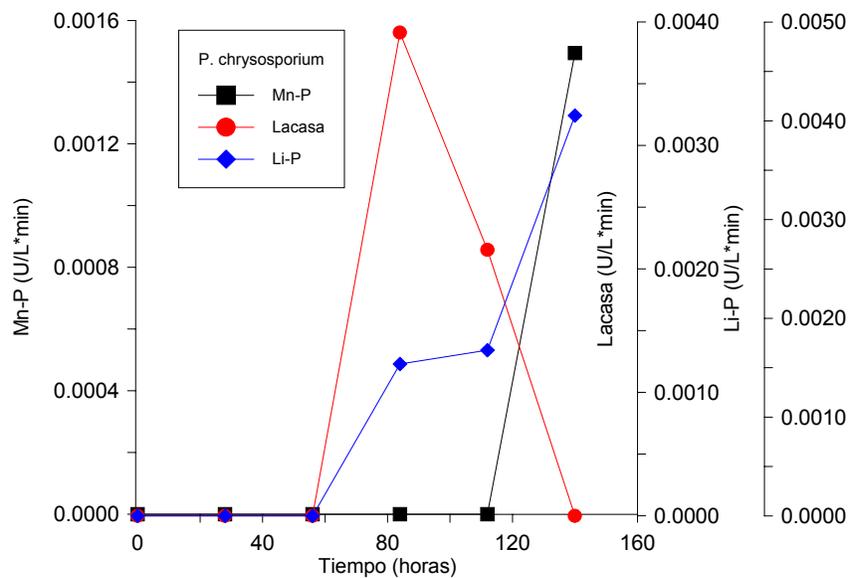
En la Tabla 5 se registran los valores máximos de las actividades específicas AE (U/g sustrato seco), productividades específicas  $q_p$  (U/g sustrato seco×h) y rendimientos de actividad en biomasa  $Y_{P/X}$  (U/g célula) para cada una de las enzimas lignolíticas utilizando como sustrato paja de trigo.



**Figura 8. Gráficas de crecimiento celular, producción de proteínas y azúcares reductores para *Phanerochaete chrysosporium* empleando paja de trigo como sustrato.**



**Figura 9. Gráficas de crecimiento celular, pH , producción de proteína y azúcares reductores para *Trametes versicolor* empleando paja de trigo como sustrato.**



**Figura 10. Actividades específicas de Lacasa, Manganeso Peroxidasa (Mn-P) y Lignina Peroxidasa (Li-P) para los hongos : *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor* empleando paja de trigo como sustrato.**

**Tabla 5. Parámetros cinéticos de comparación obtenidos para *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor*, empleando como sustrato paja de trigo.**

Basidiomycete	Enzima	Tiempo de max $q_p^*$ (horas)	AE (u/g)*	$q_p^*$ máx (u/g .hora)	$Y_{p/x}$ máx (u/g de biomasa)	A Reduc máx (g/l)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Lacasa	84	$8 \times 10^{-4}$	$9,471 \times 10^{-6}$	0,002	0,1725
	Li-P	140	$8 \times 10^{-4}$	$5,885 \times 10^{-6}$	0,006	
	Mn-P	140	$3 \times 10^{-4}$	$2,169 \times 10^{-6}$	0,002	
<i>Trametes versicolor</i>	Lacasa	56	$6 \times 10^{-4}$	$1,043 \times 10^{-5}$	0,012	0,1345
	Li-P	28	$7,8 \times 10^{-4}$	$2,801 \times 10^{-4}$	0,162	
	Mn-P	84	$2 \times 10^{-4}$	$2,651 \times 10^{-6}$	$9 \times 10^{-4}$	

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

No se encontró reporte bibliográfico a cerca de la producción de enzima lignolíticas utilizando paja de trigo como sustrato; por lo tanto su análisis se hizo por comparación con los resultados obtenidos en este trabajo con salvado de trigo mostrados en la sección 3.2.1.

Comparativamente se observa una clara disminución de los tres parámetros cinéticos cuando se usa paja de trigo como sustrato, pero es de resaltar el incremento de la concentración de azúcares reductores que evidencia la degradación del sustrato y la aparición de la expresión de Li-P, lo que no se observó con salvado de trigo. Esto puede deberse a que la paja de trigo presenta valores superiores en contenido de lignina y celulosa (ver anexo A) que el salvado de trigo, lo que puede generar que se tuviese en el medio de cultivo una fuente de carbono fácilmente metabolizable, lo que no favoreció la producción de las enzimas en mayores unidades de actividad.

Los valores de productividad específica ( $q_p$ ), son mayores para *T. Versicolor*. Para las tres enzimas debido que su producción se inició en la primera mitad de la fermentación, lo que sugiere la presencia de sustancias inductoras que están asociadas al metabolismo celular pero no al crecimiento microbiano.

Los rendimientos de actividad en biomasa y actividad específica en Lacasa y Mn-P fueron más altos para *P. chrysosporium*. Para Li-P *T. Versicolor* presentó el mayor rendimiento de actividad en biomasa debido a que la producción de la enzima se dio en los inicios de la fermentación (28 horas) cuando todavía el microorganismo se encontraba en la fase inicial de adaptación y el contenido celular era bajo.

Es de resaltar que en experiencias realizadas por García y Torres (2001) usando paja de trigo como sustrato, pero en fermentación sólida, reportan valores de actividad específica y productividad específica superiores a los encontrados en este trabajo, pero no lograron actividad de lignina Peroxidasa en ninguna de las dos cepas y de Lacasa en *P. chrysosporium*, hecho que si se consiguió en este trabajo.

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

Las curvas de crecimiento al igual que la producción de enzimas para los tres microorganismos se muestran en las figuras 11, 12 y 13.

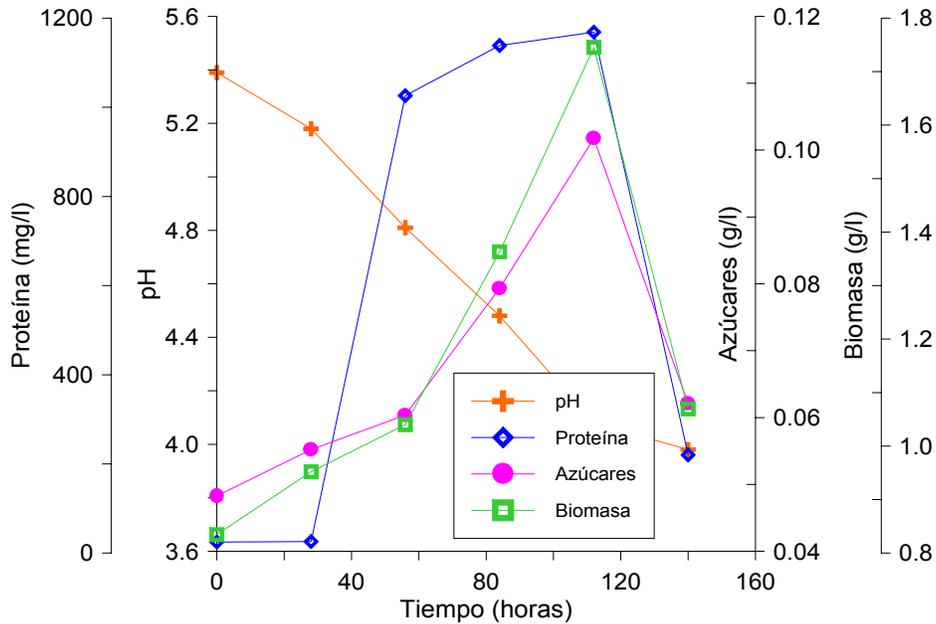


Figura 11. Gráficas de crecimiento celular, producción de proteínas y azúcares reductores para *Phanerochaete chrysosporium* empleando tuza de mazorca como sustrato.

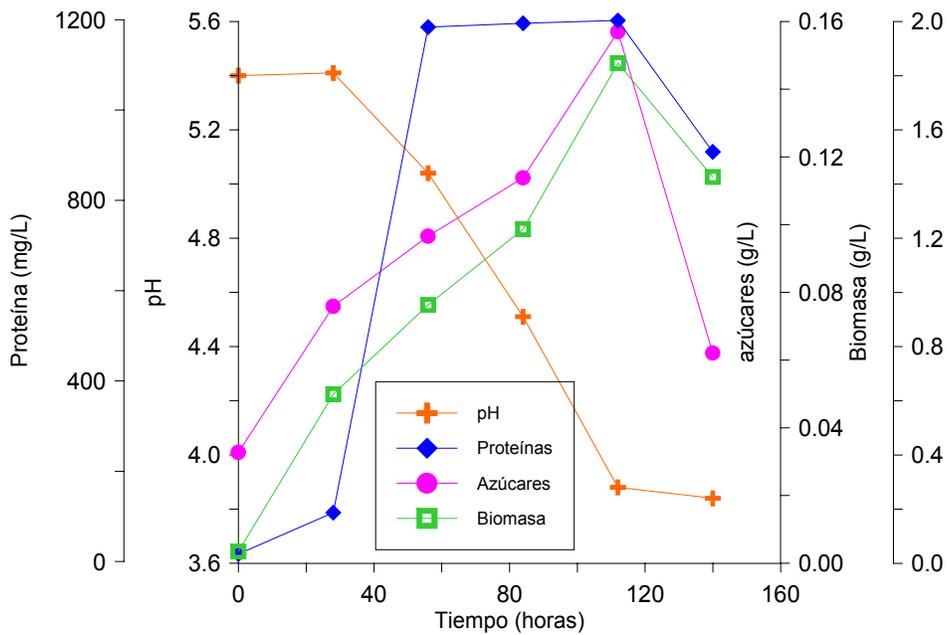


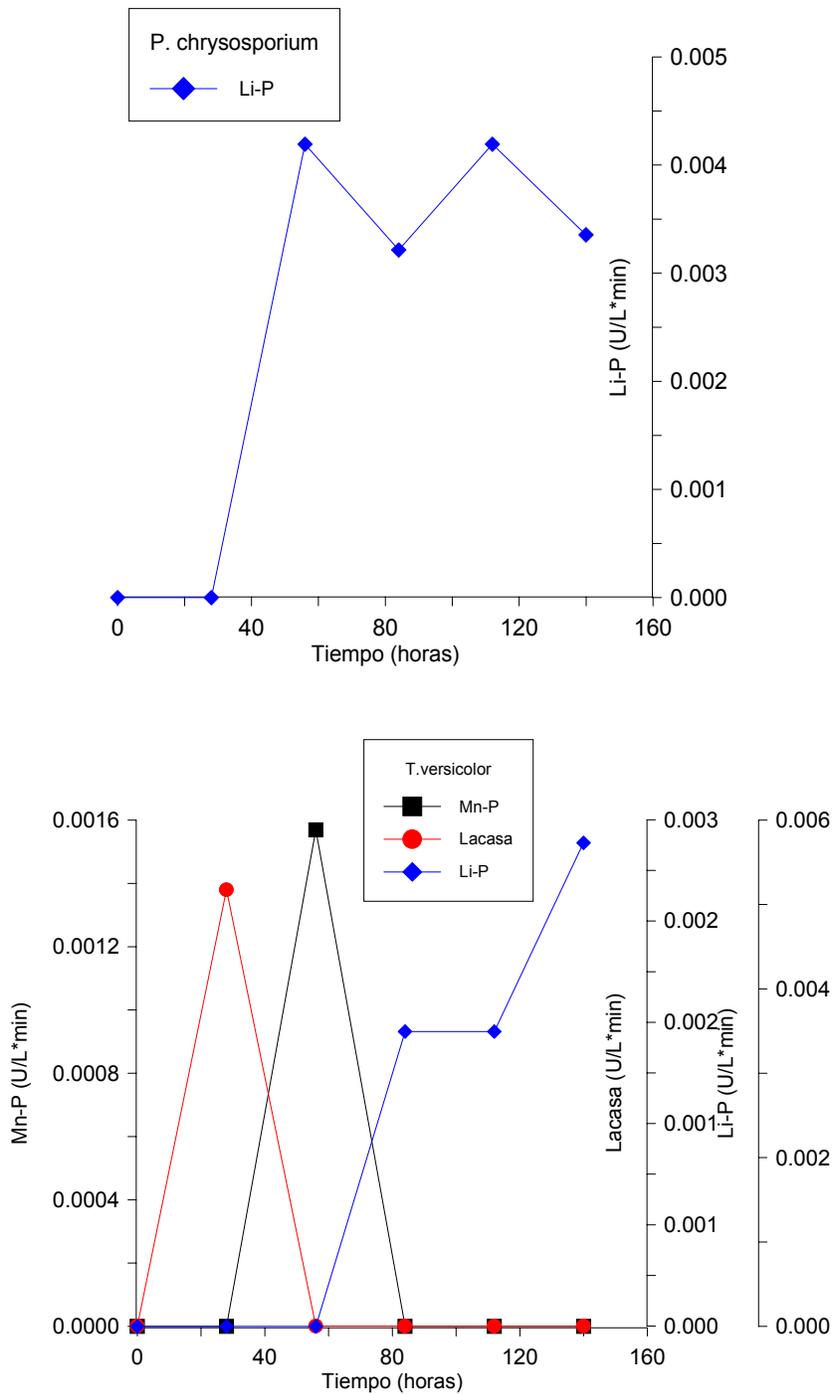
Figura 12. Gráficas de crecimiento celular, pH , producción de proteína y azúcares reductores para *Trametes versicolor* empleando tuza de mazorca como sustrato.

Las dos cepas presentaron perfiles de crecimiento y producción de proteínas y azúcares muy similares alcanzando los valores máximos para todos los parámetros a las 112 horas de fermentación con valores en Biomasa de 1.745 g/L para *P. chrysosporium* y 1.85 g/L para *T. Versicolor*; proteínas y azucares de 1168.65 mg/L y 0.102 g/L para *P. chrysosporium*, 1198.38 mg/L y 0.157 g/L para *T. Versicolor* respectivamente.

En las graficas 11 y 12 también se puede observar un decrecimiento en los valores de pH durante el proceso fermentativo para los Basidiomycetes: *Phanerochaete Chrysosporium* y *Trametes versicolor* obteniéndose valores de 3.98 y 3.84 respectivamente a las 140 horas de fermentación.

En cuanto a la producción de las enzimas lignolíticas según lo que se observa en la figura 13 *P. chrysosporium* solo presentó actividad de Li-P claramente asociada a la producción de proteínas, iniciando en el primer tercio de la fermentación y manteniéndose hasta el final. *T. Versicolor* presentó actividad de Lacasa y Mn-P de forma temprana a las 28 y 56 horas de iniciada la fermentación; la actividad de Li-P aparece sobre las 84 horas de cultivo. La posible presencia de compuestos de tipo fenólico en el medio de cultivo pueden originar la expresión de forma temprana de las enzimas pero reprimiéndose muy posiblemente debido al descenso en el pH que es un factor muy decisivo en la producción de estas enzimas.

En la Tabla 6 se registran los valores máximos de las actividades específicas AE (U/g sustrato seco), productividades específicas  $q_p$  (U/g sustrato seco $\times$ h) y rendimientos de actividad en biomasa  $Y_{P/X}$  (U/g célula) para cada una de las enzimas lignolíticas utilizando como sustrato tuza de mazorca..



**Figura 13. Actividades específicas de Manganeso Peroxidasa, Lacasa, y Lignina Peroxidasa para los Basidiomycetes: *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor* utilizando tuza de mazorca como sustrato.**

**Tabla 6. Parámetros cinéticos de comparación obtenidos para *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor* , empleando como sustrato tuza de mazorca.**

Basidiomycete	Enzima	Tiempo de max $q_p^*$ (horas)	AE (u/g)*	$q_p^*$ máx (u/g .hora)	$Y_{p/x}$ máx (u/g de biomasa)	Azúcares Reduc máx (g/l)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Lacasa	-	-	-	-	0,1018
	Li-P	56	$9 \times 10^{-4}$	$1,522 \times 10^{-5}$	0,004	
	Mn-P	-	-	-	-	
<i>Trametes versicolor</i>	Lacasa	28	$4 \times 10^{-4}$	$1,564 \times 10^{-5}$	0,0035	0,1570
	Li-P	84	$7 \times 10^{-4}$	$8,456 \times 10^{-6}$	0,0028	
	Mn-P	56	$3 \times 10^{-4}$	$5,695 \times 10^{-6}$	0,0016	

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

Comparando los resultados obtenidos al utilizar salvado de trigo como sustrato Tabla 4 con los obtenidos con tuza de mazorca, es de destacar que aunque son mayores los resultados de AE ,  $q_p$  para las enzimas Lacasa y Mn-P de la cepa T. Versicolor en el salvado de trigo , se presentó actividad de Li-P en las dos cepas ya que esta no ha sido reportada en los otros dos sustratos utilizados, Vares (1996).

Con el objetivo de seleccionar el desecho agroindustrial que favorezca la producción de enzimas lignolíticas del tipo Lacasa, Manganese Peroxidasa y Lignina Peroxidasa mediante la técnica de fermentación semisólida se evaluó la capacidad de las cepas *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor* , Las figuras 14, 15 y 16 y la Tabla 7 muestran las productividades específicas máximas para las cepas estudiadas, en los sustratos paja de trigo, tuza de mazorca y salvado de trigo, este último utilizado como sustrato de referencia.

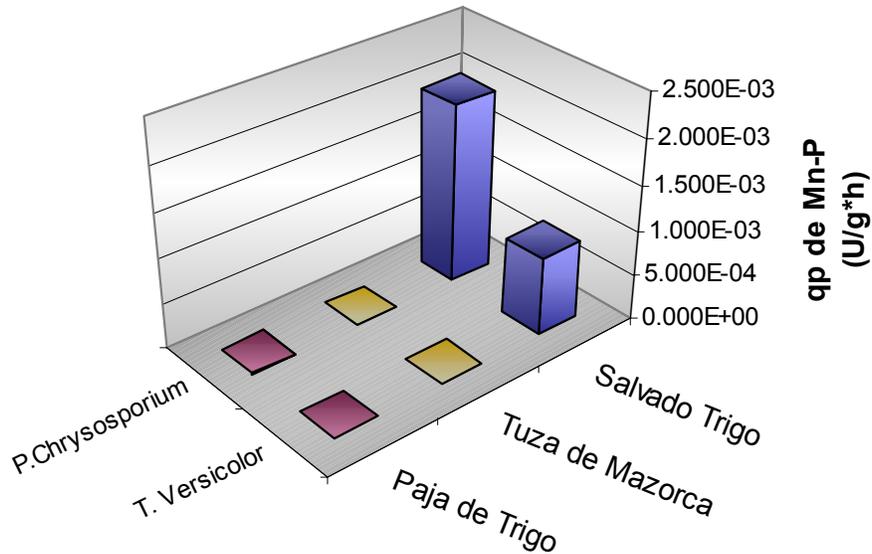


Figura 14. Valores máximos de productividad específica de Manganese Peroxidasa obtenidos en las fermentaciones con *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor* sobre los sustratos paja de trigo, tuza de mazorca y salvado de trigo.

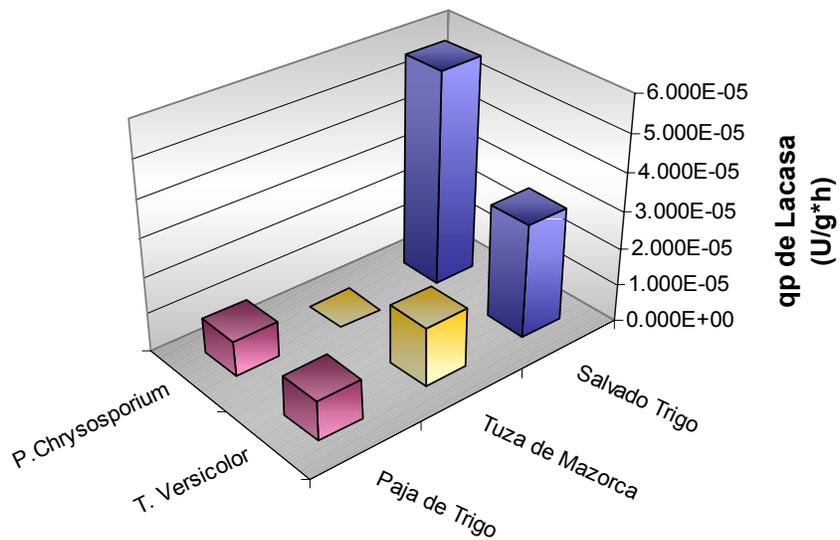


Figura 15. Valores máximos de productividad específica de Lacasa obtenidos en las fermentaciones con *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor* sobre los sustratos paja de trigo, tuza de mazorca y salvado de trigo.

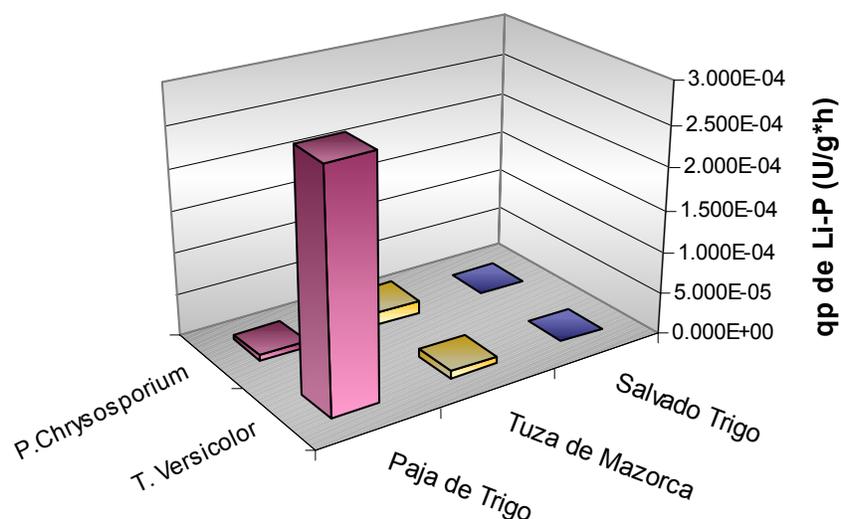


Figura 16. Valores máximos de productividad específica de Lignina Peroxidasa obtenidos en las fermentaciones con *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor* sobre los sustratos paja de trigo, tuza de mazorca y salvado de trigo.

Tabla 7. Valores de productividad específica ( $q_p$ ) obtenidos para las diferentes enzimas lignolíticas producidos por los *Basidiomycetes* en estudio, en cada uno de los diferentes sustratos utilizados.

		Cepa Productora		
		P. Chrysosporium	T. Versicolor	
Qp (U/g sustrato seco×h)	Mn-P	Salvado Trigo	2,007E-03	8,689E-04
		Paja de Trigo	2,169E-06	2,651E-06
		Tuza de Mazorca	-	5,695E-06
	Lacasa	Salvado Trigo	5,759E-05	3,049E-05
		Paja de Trigo	9,471E-06	1,043E-05
		Tuza de Mazorca	-	1,564E-05
	Li-P	Salvado Trigo	-	-
		Paja de Trigo	5,885E-06	2,801E-04
		Tuza de Mazorca	1,522E-05	8,456E-06

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. Se tendrá 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 (Acevedo y colaboradores, 1992).

Al comparar los resultados obtenidos utilizando salvado de trigo (tabla 7 y figuras 14, 15 y 16), 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 con la cepa de *Trametes versicolor* en tuza de mazorca. Sin embargo se observó que con paja de trigo la cepa presentó mayor actividad de Lignina Peroxidasa que para las otras dos enzimas; esto posiblemente se debe 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. Estas razones favorecieron la elección de la cepa de *Trametes versicolor* como la mejor cepa productora de enzimas lignolíticas y la paja de trigo como el mejor sustrato.

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

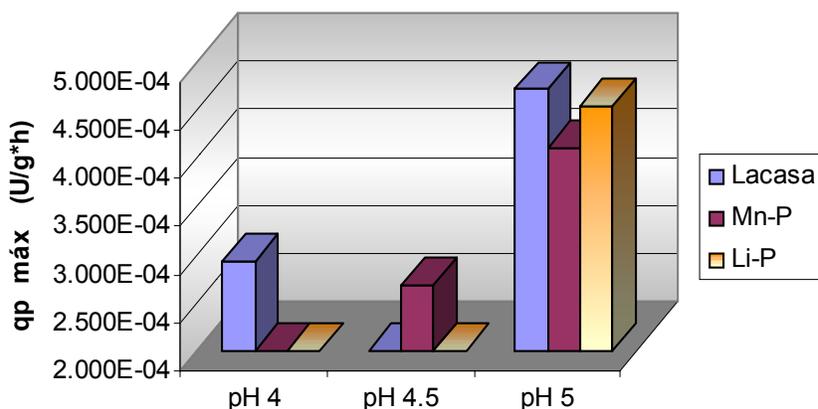
### **3.3 FORMULACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO**

Esta experiencia tuvo por objeto la formulación de un medio de cultivo para el crecimiento microbiano y la producción de enzimas lignolíticas por *Trametes versicolor* 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.

Teniendo en cuenta que el pH óptimo de crecimiento de los hongos filamentosos se encuentra en el intervalo entre 4,0 y 5,0 (Raimbault, 1998), se trabajaron condiciones de pH iniciales de 4,0, 4,5 y 5,0 después de llevada a cabo la esterilización.



**Figura 17. Efecto de las condiciones iniciales de pH en la producción de enzimas lignolíticas por *Trametes versicolor* sobre paja de trigo.**

En la figura 17 se presentan las productividades 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  $Q_p$  para las actividades de lacasa, lignina y manganeso peroxidasa en condiciones de pH

inicial 5,0. A pH de 4,0 y 4,5 solo se detectó actividad de Lacasa y Manganeso Peroxidasa respectivamente.

**Tabla 8. Efecto del pH en la producción de enzimas lignolíticas por *Trametes versicolor* empleando como sustrato paja de trigo.**

pH	Enzima	$q_p$ (U/g×hora)*	Actividad enzimática (U/g)*	$Y_{p/x}$ máximo	Azúcares reductores (g/L)
4	Lacasa	2,918E-04	5,902E-03	2,440E-02	0,090548
	Mn-P	-	1,475E-02	-	
	Li-P	-		1,639E-01	
4.5	Lacasa	-		-	0,226802
	Mn-P	2,684E-04	1,074E-02	8,467E-02	
	Li-P	-		-	
5	Lacasa	4,707E-04	3,765E-03	1,969E-02	0,134529
	Mn-P	4,094E-04	3,275E-03	1,712E-02	
	Li-P	4,526E-04	5,432E-02	2,246E-01	

\*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 *Trametes versicolor*, 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 ( $q_p$ ), para las tres enzimas. En cuanto a la Actividad Específica (AE) y el rendimiento en biomasa ( $Y_{P/x}$ ) para Li-P el máximo se obtiene a pH inicial de 5,0; a diferencia de las enzimas Lacasa y Mn.P que los máximos de estos parámetros se obtienen al pH inicial de 5,0.

En estas 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 Lacasa y Li-P, y sólo se presentó una baja actividad de Mn-P para el medio con pH 4,5; esto probablemente se debe 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 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 para Li-P y Mn-P, menos para Lacasa, que aunque se logra el valor mas alto de actividad a pH de 4,0 la productividad es mayor a pH de 5,0 debido a que la actividad enzimática de Lacasa se logra de forma mas temprana en este pH.

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 1,381 g/L, disminuida en un 30% del valor fijado en el diseño del medio de cultivo de 2 g/L.

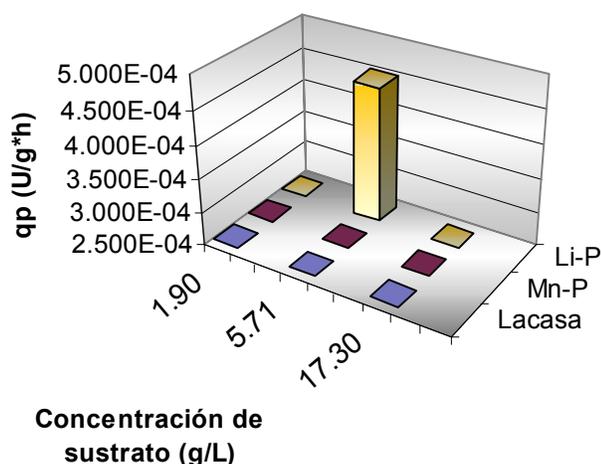
La cinética de variación del pH es específica y depende marcadamente del tipo de microorganismo (Raimbauh, 1998). Para el caso del *Trametes versicolor* la condición del pH inicial de 5,0 presentó el menor intervalo de variación de pH, 0,7 unidades, con respecto a las demás condiciones trabajadas, favoreciendo 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 sobre la producción de enzimas lignolíticas por *Trametes versicolor*.** Esta experiencia tuvo por objeto estudiar el efecto de la composición del medio de cultivo, en la producción de

enzimas lignolíticas por *Trametes versicolor* utilizando paja de trigo en fermentación semisólida.

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.

**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 (paja de trigo). Se trabajaron concentraciones de: 17,13g/L, 5,71 g/L y 1,9g/L. El crecimiento fue monitoreado cada 28 horas hasta las 120 horas de fermentación. La composición del medio de cultivo empleado en este estudio se presenta en el anexo G.



**Figura 18. Valores máximos de productividad específica de Lacasa, Manganeso Peroxidasa y Lignina Peroxidasa presentados en las fermentaciones de la etapa de diseño de medio con paja de trigo para *Trametes versicolor*.**

La figura 18 presenta las máximas productividades específicas de Lacasa, Mn-P y Li-P obtenidas durante el tiempo de fermentación para las concentraciones de sustrato celulósico empleado.

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 *Trametes versicolor*. 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 (1.9 g/L o 17.3 g/L) no se detectó actividad para Li-P y/o Lacasa y Mn-P,.

**Tabla 9. Efecto de la variación de la concentración de la fuente de carbono sobre los parámetros cinéticos de producción de enzimas lignolíticas para *Trametes versicolor*.**

Concentración del sustrato (g/L)	Enzima	$q_p$ (U/g.hora)*	Actividad enzimática (U/g)*	$Y_{p/x}$ máximo	Azúcares reductores (g/L)
1,9	Lacasa	1,66E-06	1,33E-04	2,31E-04	0,0733
	Mn-P	-	-	-	
	Li-P	-	-	-	
5,71	Lacasa	4,71E-06	3,77E-04	1,97E-03	0,1345
	Mn-P	4,09E-06	3,28E-04	1,71E-03	
	Li-P	4,53E-04	5,43E-02	2,25E-01	
17,3	Lacasa	-	-	-	0,0905
	Mn-P	1,49E-06	1,19E-04	1,89E-03	
	Li-P	-	-	-	

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

### 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.

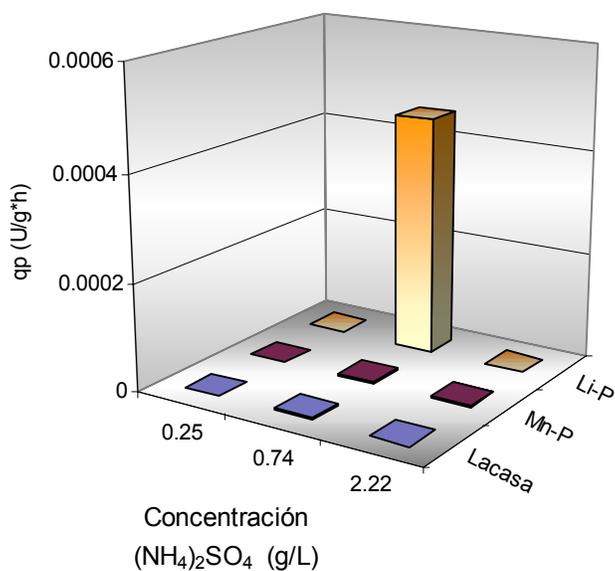
Para el caso de la fuente de nitrógeno, se estudió el efecto de la concentración de sulfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  sobre la producción de enzimas lignolíticas. Los medios de cultivo empleados se muestran en el anexo G.

La cinética de crecimiento fue llevada a cabo durante 120 horas, utilizando concentraciones de 0,25 g/L, 0,74 g/L y 2,22 g/L de sulfato de amonio grado analítico (figura 19). Los parámetros cinéticos determinados en estas experiencias se indican en la tabla 10, en ésta se aprecia que al limitar (0,25g/L) o exceder (2,22 g/L) la fuente de nitrógeno no se obtuvo actividad de Lacasa y/o Manganese Peroxidasa. Los mejores mayores valores de producción de ligninasas se obtuvieron con la concentración de 0,72 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

**Tabla 10. 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 para *Trametes versicolor*.**

Concentración $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)	Enzima	$q_p$ (U/g×hora)*	Actividad enzimática (U/g)*	$Y_{p/x}$ máximo	Azúcares reductores (g/L)
0,25	Lacasa	-	-	-	0,096
	Mn-P	-	-	-	
	Li-P	-	8,774E-03	3,243E-02	
0,74	Lacasa	4,707E-06	3,765E-04	1,969E-03	0,097
	Mn-P	4,094E-06	3,275E-04	1,712E-03	
	Li-P	4,526E-04	5,432E-02	2,246E-01	
2,22	Lacasa	-	-	-	0,068
	Mn-P	2,197E-06	1,757E-04	2,784E-03	
	Li-P	-	-	-	

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



**Figura 19. Valores máximos de productividad específica de Lacasa, Manganeso Peroxidasa y Lignina Peroxidasa en el estudio del efecto de la variación de la concentración de la fuente de nitrógeno para *Trametes versicolor*.**

**3.3.2.3. Estudio del efecto de Inductores y surfactantes en la producción de enzimas lignolíticas.** Se realizaron ensayos al nivel de bioreactores de laboratorio, con el objetivo de evaluar el efecto de los inductores: Alcohol veratrílico (250ppm) y dimetoxifenol (250ppm) y un surfactante: Twen 80 (0,01% p/v), utilizando el microorganismo seleccionado previamente. Los medios de cultivo utilizados se muestran en el anexo H.

La actividad enzimática de Lacasa en cultivos con especies de Basidiomycetes puede incrementarse por la adición al medio de cultivo de compuestos aromáticos en concentraciones pequeñas (Cohen,R. and Persky, 2002). Investigadores como Muñoz y colaboradores demostraron que la Lacasa se induce por la adición de alcohol Veratrílico sobre paja de trigo .

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

En la Tabla 11 se presentan los parámetros cinéticos obtenidos para las fermentaciones realizadas en los diferentes medios de cultivo. Los valores de los parámetros cinéticos para la actividad de Lacasa y Manganese Peroxidasa son mayores al utilizar alcohol veratrílico como inductor en comparación con los medios que contienen dimetoxifenol y twen 80.

**Tabla 11. Parámetros cinéticos obtenidos en el estudio del efecto de inductores y surfactantes sobre la producción de enzimas lignolíticas.**

Inductor		Enzima	$q_p$ (U/g.hora)*	Actividad enzimática (U/g)*	$Y_{p/x}$ máximo
Alcohol Veratrílico	0.25 mM	Lacasa	1,832E-04	7,326E-03	2,574E-03
		Mn-P	1,195E-04	9,560E-03	4,760E-04
		Li-P	-	-	-
	0.5 mM	Lacasa	-	-	-
		Mn-P	-	-	-
		Li-P	-	-	-
Dimetoxifenol	0.25 mM	Lacasa	1,322E-04	5,287E-03	1,240E-03
		Mn-P	-	-	-
		Li-P	-	-	-
	0.5 mM	Lacasa	-	-	-
		Mn-P	-	-	-
		Li-P	-	-	-
Twen-80	0.01%p/v	Lacasa	1,246E-06	9,970E-05	2,790E-05
		Mn-P	-	-	-
		Li-P	-	-	-
	0.1%p/v	Lacasa	-	-	-
		Mn-P	-	-	-
		Li-P	-	-	-

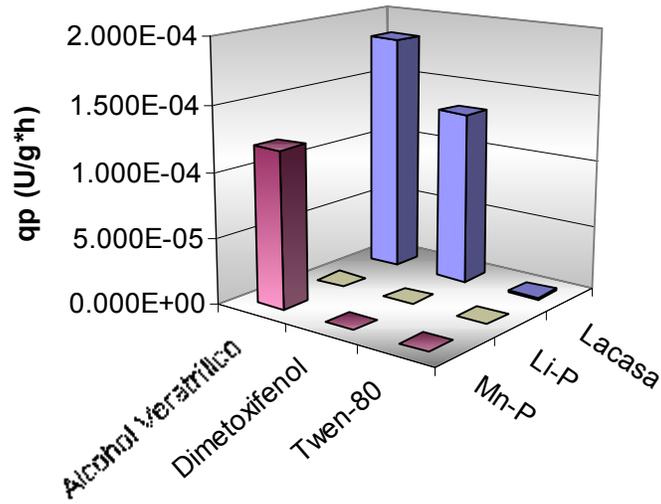
\*Valores máximos: calculados con relación al tiempo en el cual se obtuvo la máxima productividad específica para cada actividad enzimática.

Al comparar los resultados obtenidos de los parámetros cinéticos (Tabla 11), 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 aumento en los valores 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.

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. Este fue adicionado al medio de cultivo al inicio de la fermentación; como se observa en la Tabla 11 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.

En la figura 20 se presentan los valores de productividad específica obtenidas durante el proceso fermentativo para Lacasa, Lignina Peroxidasa y Manganeso Peroxidasa. De acuerdo con los resultados obtenidos se observa un efecto inductor mayor de la actividad de Lacasa y Manganeso Peroxidasa, mientras que Lignina Peroxidasa no expresó actividad para ninguno de los medios utilizados.



**Figura 20. Valores máximos de productividad específica de Lacasa y Manganeso Peroxidasa obtenidos en el estudio del efecto de inductores y surfactantes para *Trametes versicolor*.**

#### 4. CONCLUSIONES

Se determinó para los microorganismos *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor* el crecimiento y producción de enzimas lignolíticas utilizando como sustrato desechos agroindustriales (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 *Trametes versicolor*

Se determinó el efecto del pH inicial sobre el crecimiento celular y la producción de enzimas lignolíticas para 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 *Trametes versicolor* 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 *Trametes versicolor*, se observaron los mejores niveles de expresión de estas enzimas al utilizar la concentración media de sulfato de amonio que en este estudio fue de 0,74 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 *Trametes versicolor*, 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 *Trametes versicolor*.

Finalmente, se demuestra que es posible la producción de ligninasas por fermentación sumergida con sustratos insolubles del tipo celulósico a nivel de matraces mediante el empleo de la cepa *Trametes versicolor* como microorganismo y paja de trigo como sustrato.

## 5. RECOMENDACIONES

Para mejorar la producción de ligninasas con el hongo filamentoso *Trametes versicolor* 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. Adler, E. (1980) *Wood Sci Technol.* 11, 169.
2. Agosin, E., J.J. Daudin, and E. Odier (1985) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22, 132.
3. Aidoo, K., R. Hendry, and J. Wood (1982). *Adv. Appl. Microb.* 28, 201.
4. Akin, D.E., C.E. Lyon, W.R. Windham and L.L. Rigsby (1989) *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 611.
5. Amer, G.I. and S.W. Drew (1980) *Annu Rep. Ferment. Proc.* 4, 67.
6. Aramayo, R., and W.E. Timberlake (1990). *Nucleic Acids Res.* 18, 3415.
7. Arebeloa, M., J. Leseleuc, G. Goma and J.C. Pommier (1992) *TAPPI J.* 75, 215.
8. 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.
9. Atalla, R.H. and D.L. van der Hart (1984) *Science* 223, 283.
10. Bano, Z., M.N. Shashireka and S. Rajaratham (1993) *Enzyme Microb. Technol.* 15, 985.
11. Bao, W.L., Y. Fukushima, A.Jenesen, M.A. Moen and K.E. Hammel (1994) *FEBS Lett.* 354, 297.
12. Barr, D.P., M.NM. Shah, T.A. Grover, and S.D: Aust (1992) *Arch. Biochem Biophys.* 298, 480.
13. Béguin, P. and J.P Aubert (1994) *FEMS Microbiol. Rev.* 13, 25.

14. Betts, W.B., R.K. Dart, A.S. Ball, and S.L. Pedlar (1991). In: *Biodegradation: Natural and Synthetic Materials*.
15. Blanchette, R.A., J.B. Sutherland and D.L. Crawford (1981) *Can J. Bot.* 59, 1.
16. Blanchette, R.A: (1991) *Annu Rev. Phytopathol.* 29, 381.
17. Böckle, B., M.J. Amrtínez, F. Guillén and A.T. Martínez (1999) *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 923.
18. Bonnarne, P. and W. Jeffries (1990) *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 210.
19. Bourbonnais, R., M.G. Paice, I.D. Reid, P. Lanthier, and M. Yaguchi (1995). *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1876.
20. Bourbonnais, R. and M.G. Paice (1990) *FEBS Lett* 236, 309.
21. Bourbonnais, R. and M.G. Paice (1990) *FEBS Lett.* 267, 99.
22. Bourbonnais, R. and M.G. Paice (1992) *Appl Microbiol. Biotechnol.* 36, 823.
23. Bradford (1976), *Anal . Chem* 72, 248-254.
24. Brice, R.E., and I.M. Morrison (1983) *Carbohidr. Research* 101, 93.
25. Cai, D. And M. Tien (1989) *Biochem. Biophys Res Commun* 162, 464.
26. Cai, D. And M. Tien (1992) *J. Biolo. Chem.* 267, 11149.
27. 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.
28. Cannel, E. and M. Moo-Young (1980) *Process Biochem.* 6, 2.
29. Chesson, A. H. Gordon and J.A. Lomax (1983) *J. Sci. Food. Agric.* 34, 1330.
30. Couto, S. and M.R. Rodríguez (1998) *Biodegradation*, 9, 143.
31. Das, N.M. S.C. Das, A.K. Sarkar and A.K. Mukharjee (1984) *Carbohydr. Res.* 129, 197.
32. De Jong, E., J.A. Field and J.A.M De Bont (1994) *FEMS Microbiol Rev.* 13, 153.

33. Demain, A.L.(1990). In: *Microbial Enzymes and Biotechnology* (Ed. Fogarty W.), Applied Science Publishers, London, pp 331-352.
34. 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, Bucaramanga, 1999.
35. Eaton, D.C. (1985) *Enzyme Microb. Technol.* 7, 194.
36. Edwards, S.L., R. Raag, H. Wariishi, M. H. Gold and T.L. Poulos (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 750.
37. Eggert, C., U. Temp, and K.E. Eriksson (1996). *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1151.
38. Eggert, C., U.Temp and K.E.L. Eriksson (1996) *Appl. Environ Microbiol.* 62, 1151.
39. Enari, M. (1990). In: *Microbial Enzymes and Biotechnology* (Ed.. Fogarty W.), Applied Science Publishers, London, pp 183-223.
40. 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.
41. Eriksson Ö., D.A.I. Goring, and B.O. Lindgren (1980) *Wood Sci. Tchnol.* 14, 267.
42. Eriksson, K.E.L. (1990) *Wood Sci. Technol.* 24, 79.
43. Eslyn, W.E. and T.L. Highley (1976) *Phytopathology* 66, 1010.
44. Esposito, E., Cnhos, V.P. and N.P. Duran (1991) *Biotechnol. Lett.* 13, 571
45. Evans, C., R.G. Veness, and M. Ullah (1998). *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 71, 357.
46. Evans, C.S., I.M. Gallagher, P.T. Atkey, and D.A. Wood. (1991). *Biodegradation*, 2, 25.
47. Farrel, R.L. (1987) *Phil Trans R. Soc. London A321*, 549.
48. Feijoo, G., C. Dosoretz and J.M. Lema (1995) *J. Biotechnol.* 42, 247.

49. Field, J., R.H. Vledder, J.G. van Zelst and W. Tulkens (1996) *Enzyme Microb. Technol.* 18, 300.
50. Field, J.A., E. De Jong, G.F: Costa and J.A.M. de Bont (1993) *Trends in Biotech.* 11,44.
51. Fietcher, A. (1993). *J. Biotechnol.* 30, 49.
52. Filed, J., E. De Jong, G. Feijoo-Costa, and J.A.M. de Bont (1992) *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2219.
53. Ford, C.W. (1986) *Carbohydr Res.* 147, 101
54. French, A.D: (1989) In: "Cellulose and wood: Chemistry and Technology" (Ed. C. Schuerch), John Wiley, New York, U.S.A. pp 65.
55. Gracia,T.,A.M.,Torres,S, Producción de enzimas Lignolíticas por Basidiomycetes mediante la técnica de fermentación en sustrato sólido. Universidad Industrial de Santander. Escuela de Química. Tesis (pregrado), 2001.
56. Garzillo, A.M.V., S. Dipaolo, G. Burla and B. Buonocore (1992) *Phytochemistry* 31, 3685.
57. Gilbert, I.G, G.T. Tsao (1983) *Annu Rep. Ferm. Proc.* 6, 323.
58. Glenn,J.K., M.A. Morgan, M.B. mayfield, M. Kuwahara and M.H. Gold (1983) *Biochem. Biophys Res Commun* 114, 1077.
59. Gold, M.H. and M. Alic (1993) *Microbiol. Rev.* 57, 605.
60. Gold, M.H., H. Wariishi, and K. Valli (1989). *ACS Symp. Ser.* 389, 127.
61. Gordon, A.H., J.A. Lomax and A. Chesson (1983) *J. Sci. Food Agri.* 34, 1341.
62. Gutierrez-Rojas, M., R. Auria, J.C. Benet and S. Revah (1995) *Chem. Engin. J.* 60, 189.
63. Ha, H.C.; Honda, Y. ; Watanabe, T. Et al. *Appl Microbiol Biotechnol Vol 55* (2001) P 704, 711.
64. Hammel, K. (1989). *Enzyme Microb. Technol.* 11, 776.
65. Hammel, K.E. and M.A: Moen ( 1991) *Enzyme Microb. Technol.* 13, 15.

66. Hatakeyama, T. and H. Hatakeyama (1982) *Polymer* 23, 475.
67. Hatakka, A. (1994) *FEMS Microbiol. Rev.* 13, 125.
68. Higuchi, T. (1990) *Wood Sci Technol.* 24, 23.
69. Higuchi, T. (1990) *Wood Sci. Technol.* 24, 23.
70. Higuchi, T. (1993). *J. Biotechnol.* 30, 1.
71. Jäger, A., S.Croan and T.K. Kirk (1985) *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 1274.
72. Kamra, D.N. and F. Zadrazil (1986) *Agric. Wastes* 18, 1.
73. Kawai, S., T. Umezawa, M. Shimada and T. Higuchi (1988) *FEBS Lett.* 236, 309.
74. Kerem, Z. and Y. Hadar (1993) *Enzyme Microb. Technol.* 15, 785.
75. Kirk, T.K., and R.L. Farrell (1987). *Annu. Rev. Microbiol.* 41, 465.
76. Kirk, T.K., E. Schultz, W.J. Connors, L.F. Lorenz and J.G. Zeikus (1978) *Arch. Microbiol.* 117, 277.
77. Kirk, T.K., S. Croan, M.Tien, and R.L. Farrell (1986) *Enzyme Microb. Technol.* 8, 27
78. Kirk, T.K., W.J. Connors, and J.G. Zeikus. (1977) *Recent Adv. in Phytochem.*, 11, 369.
79. Knull, L.H. and G.E. Inglett (1980) *J.Agric. Food Chem.* 28, 917
80. Kondo, R., K. Harazono, K. Sakai (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4359.
81. 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.
82. Kuwahara, M., J.K. Glenn, M.A. Morgan and M.H. Gold (1984) *FEBS Lett* 169, 247.
83. Kuwahara, M.J., M.K., Glenn, M.A., Morgan, and M.H., Gold . (1984). *FEBS Lett.* 169, 247.
84. Ladisch, M.R. (1979). *Process Biochem.* 14, 21.

85. Lambert, P. (1983) In: *Filamentous fungi*. Vol. 1. (Ed. Smith, J., Berry, D. and Kristiansen, B.), Edward Arnold, London, pp. 210-237.
86. Li, D., M. Alic, and M.H. Gold (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3447.
87. Liese, W. (1970) *Ann Rev. Phytopathol.* 8,231.
88. Linko, S. (1988) *HJ. Biotechnol.* 9, 163.
89. Liu, L., J.F.D. Dean, W.E. Friedman and K.E. Eriksson. (1994). *Plant. J.* 6, 213.
90. Lonsane, B.K., N.P. Ghildyal, S. Budiartman and S.V. Ramakrishna (1985) *Enzyme Microb. Technol.* 7, 258.
91. Majcherczyk, A., C. Johannes and A. Hüttermann (1998) *Enzyme Microb. Technol.* 22, 335.
92. Martínez, A.T., S.Camarero, F. Guillén, A. Gutierrez, C. Muñoz, E. Varela, M.J. Martínez, J.M. Barrasa, K. Ruel and M. Pelayo (1994) *FEMS Microbiol Rev.* 13, 265.
93. McNeil M., P. Alberstein, L. Taiz and R.L Jones (1975) *Plant Physiol.* 55, 64.
94. Miller (1959), *Anal. Chem* 31,426.
95. Mora, F., J. Comtat, F. Barnoud, F. Pla and P. Noe (1986) *J. Wood Chem. Technol.* 6, 147.
96. Mounfort, D.O. (1987) *FEMS Microbiol. Rev.* 46, 401.
97. Muñoz, C., F. Guillén, A.T. Martinez and M.J. Martinez (1997) *Appl Environ Microbiol.* 63, 2166.
98. Nagarajan, G. And G. Annadurai (1999). *Bioprocess Eng.* 20, 435
99. Novotny, C., B.R.M. Vyas, P. Erbanova, A. Kubatova and A. Sasek (1997) *Folia Microbiologica* 42, 136.
100. Onysko, K.A. (1993) *Biotechnol. Adv.* 11, 179.
101. Otjen, L., R.A. Blanchette, M. Effland and G.F. Leatham (1987) *Holzforshung* 41, 343.

102. Palmer, J.M., P.J. Harvey, H.E. Shoemaker, H.W.H. Schmidt and M.S.A. Leisola (1987) FEBS Lett 220, 149.
103. Paszcynski, A, R.L. Crawford (1991) Biochem Biophys. Res. Commun 178, 1056.
104. Pease, E.A., S.D. Aust and M. Tien (1991) Biochem Biophys. Res. Commun. 179, 897
105. Perez, J. and T.W. Jeffries (1992) Appl. Environ. Microbiol. 58, 2402.
106. Pévié, F.H. and M.N. Gold (1991) Appl. Environ. Microbiol. 57, 2240.
107. Pointek, K., T. Glumoff and K. Winterhalter (1993) FEMS Lett. 315, 119.
108. Poulos, T.L., S.L. Edwards, H. Wriishi and M.H. Gold (1993) J. Biol. Chem. 268, 4429.
109. Raimbault, M. (1988). In: Solid State Fermentation in conversion of agroindustrial raw materials (Ed., M. Raimbault), ORSTOM- Montpellier, France, pp 5-13.
110. Raimbault, M. and D. Alazard (1980) Appl. Microbiol. Biotechnol. 9, 199.
111. Rehman, A.U., and C.F. Thurston (1992). J. Gen. Microbiol. 138, 1251.
112. Reid, D. And M.G. Paice (1993) FEMS Microbiol. Rev. 13, 369.
113. 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.
114. Renganatan, V., M.H., Gold (1986) Biochemsitry 25, 1626.
115. Ribbons, D.W. (1970) FEBS Lett. 8, 101.
116. Rodriguez, L., Métodos de Análisis Empleados en la Industria Papelera. Bucaramanga : Universidad Industrial de Santander, Centro de Investigación en Celulosa Pulpa y Papel. (1978). P16 – 85.
117. Rodríguez, S., M.A. Longo, C.Cameselle and A. Sanromán (1999) Bioprocess Eng. 20, 531.
118. Rogalski, J., A.L. Dawidowicz and M. Wojtas-Wasilewska (1992). Acta Biotechnol. 12, 191.

119. Sannia, G., P., Limongi, E. Cocca , F. Buonocore, G. Nitti, and P. Giardina (1991). *Biochim. Biophys. Acta* 1073, 114.
120. Sariaslani, F.S. (1989) *Crit. Rev. Biotechnol.* 9, 171.
121. Schlosser, D., R. Grey and W. Fritsche (1997) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 412.
122. Shoemaker, H.E. and M.S.A. Leisola (1990) *J. Biotechnol.* 13, 101
123. Smits, J.P., H.M. van Sonsbeek, J. Tramper, W. Knol, W. Geelhoed, M. Peeters and A. Rinzema (1999) *Bioprocess Eng.* 20, 391.
124. De Souza, D., Peralta, R. (2004). *J. Basic Microbiol.* 129 – 136 .
125. Spadaro, J.T., M.H. Gold and V. Renganathan (1992) *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2397.
126. Srebotnik, E., K.A. Jensen, and K.E. Hammel (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 12794.
127. Stickland, (1954), *J. Gen. Microbiol.* 5, 698-703.
128. Sundaramoorthy, S. , K. Kishi, M.H. Gold and T.L. Poulos (1994) *J. Mol. Biol.* 238, 845.
129. Thurston, C.F. (1994) *Micrbiol.* 140, 19.
130. Thurston, C.F. (1994). *Microbiology* 140, 19.
131. Tien, M. and T.K. Kirk (1983). *Science* 326, 520.
132. Tien, M. And T.K., Kirk (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 2280.
133. 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.
134. Tuor, U., K. Winterhalter and A. Fietcher (1995) *J. Biotechnol.* 41,1.
135. Valmaseda, M., M.J. Martínez and A.T. Martínez (1991) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35, 817.
136. Vasdev, K. and R.C. Kuhad (1994) *Folia Microbiologica* 38, 326.
137. Vicuña, R. B. Gonzalez, D. Seelendreund, C. Rüttimann and L. Salas (1993) *J. Biotechnol.* 30, 9.

138. Wariishi, H., J. Huang, H.B. Dunford and M.H. Gold (1991). *J. Biol. Chem.* 266, 20694.
139. Wariishi, H., K. Valli and M.H. Gold (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 23688.
140. Watanabe, T., J. Ohnishi, Y. Yamasaki, S. Kaitzu and T. Koshijima (1989) *Agric. Biol. Chem.* 53, 2233.
141. Weimer, P.J. (1992) *Crit. Rev. Biotechnol.* 12, 189.
142. White N.A. and L. Body (1992) *J. Gen . Microbiol.* 138, 2589.
143. Whitmore, F. (1982) *Phytochemistry* 21, 315.
144. Williamson, P.R. (1994) *J. Bacteriol.* 176, 656.
145. Wood T.M. (1988) *Methods Enzymol.* 160, 19.
146. Wubah, D.A. , D.E. Akin and W.S. Borneman (1993) *Crit Rev. Microbiol.* 19, 99.
147. Youn, H.D., Y.C. Hah, S.O.Kang (1995) *FEMS Microbiol. Lett.* 132, 183.
148. Youn, H-D, Y.C. Hah and S.O. Kang (1995) *FEMS Microbil Lett.*
149. Zimmerman, W. (1990) *J. Biotechnol.* 13, 119.

## **ANEXOS**

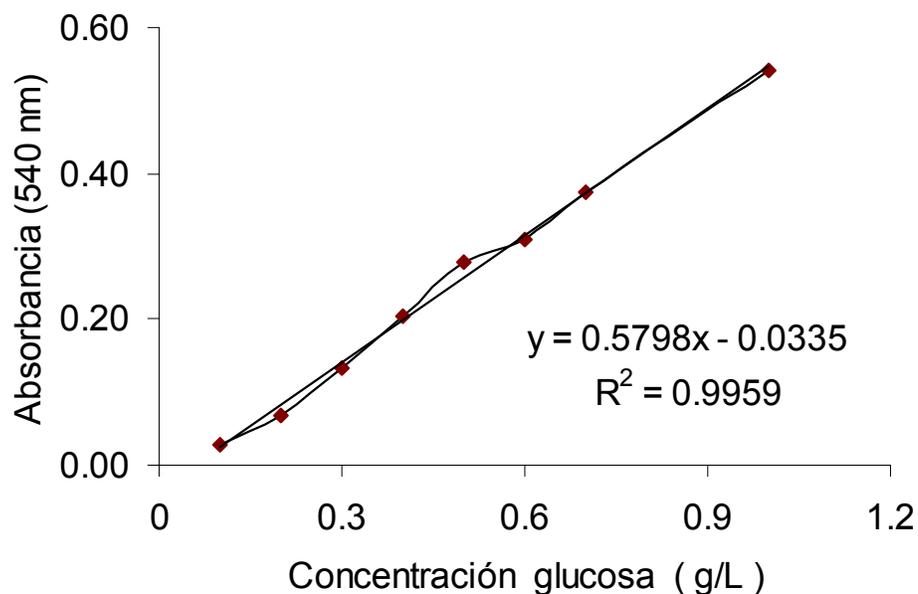
**Anexo A. Caracterización de la composición elemental, contenido de celulosa y lignina de Salvado de trigo, Tuza de mazorca y paja de trigo**

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

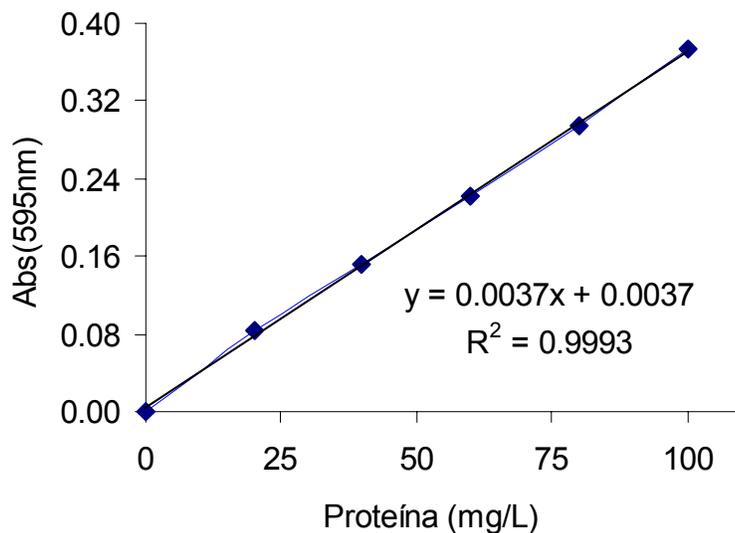
--- valor no determinado

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)

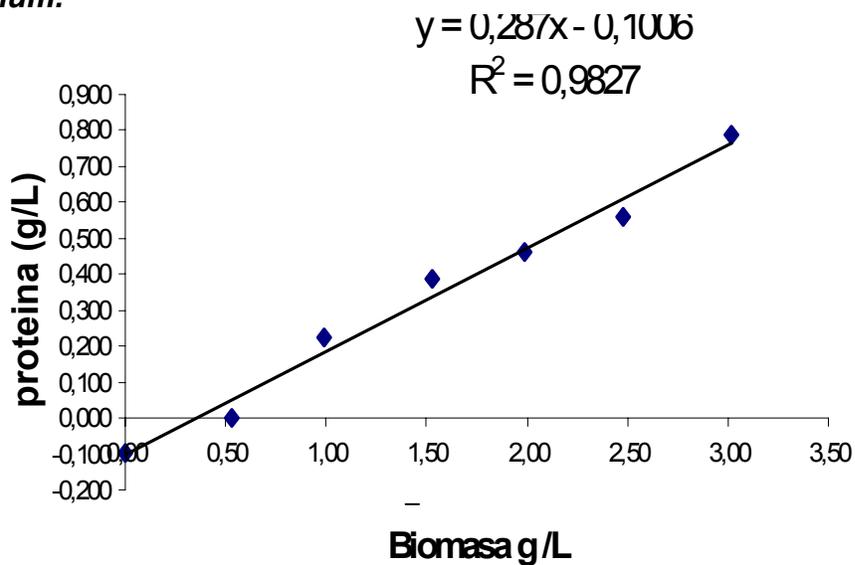
**Anexo B. Curva de calibración para determinación de la concentración de azúcares reductores por el método del ácido dinitrosalisílico (DNS)**



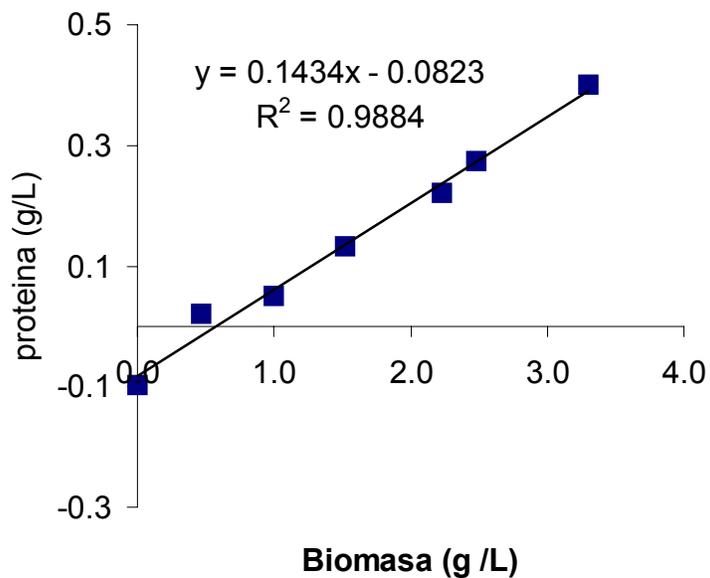
**Anexo C. Curva de calibración para determinación de la concentración de proteína extracelular por el método de Bradford (Proteína patrón Albúmina de suero bovino)**



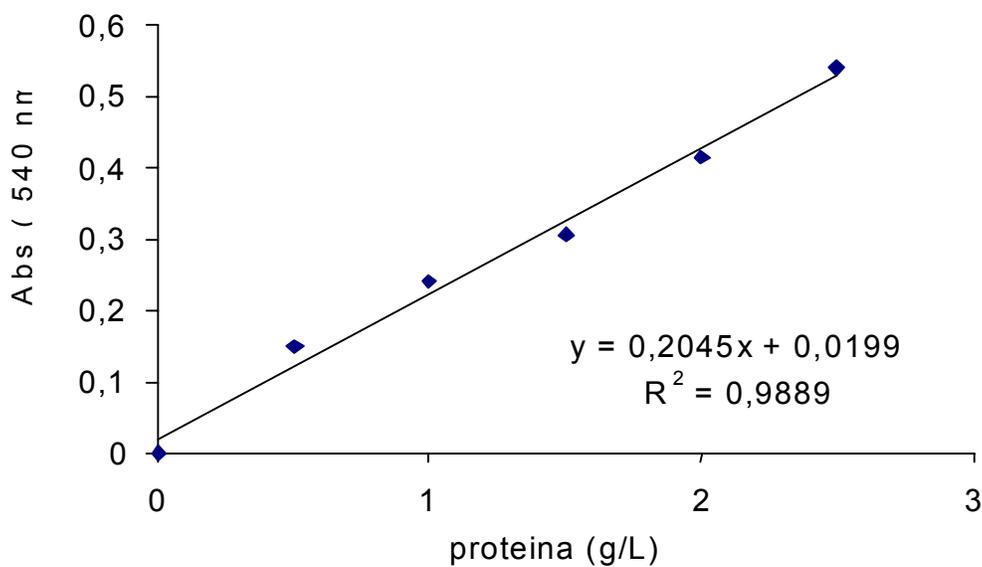
**Anexo Da. Curva de calibración para determinación de la concentración de proteína intracelular por el método de Stiklan para *Phanerochaete Chrysosporium*.**



**Anexo Db. Curva de calibración para determinación de la concentración de proteína intracelular por el método de Stiklan para *Trametes versicolor*.**



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



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

---

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

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

Las concentraciones fueron calculadas par obtener una concentración de biomasa de 2 g/L a nivel de reactores de 250 mL.

<b>Composición de solución nutriente</b>	
Compuesto	Unidades (g/L)
Sustrato lignocelulósico	*
Fuente de carbono (paja de trigo)	**
Fuente de Nitrógeno (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	***
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7,4×10 <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5×10 <sup>-1</sup>
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	2,3×10 <sup>-2</sup>
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	6,8×10 <sup>-2</sup>
MnSO <sub>4</sub>	6,18×10 <sup>-4</sup>
CaCl <sub>2</sub>	8,25×10 <sup>-2</sup>
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	5.66 x10 <sup>-4</sup>
<b>Condiciones iniciales</b>	
pH inicial	5,5 <sup>▯</sup>
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 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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.**

<b>Composición de solución nutriente</b>	
<b>Compuesto</b>	<b>Unidades (g/L)</b>
Paja de trigo	5.71
Fuente de Nitrógeno (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,5×10 <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5×10 <sup>-1</sup>
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	2,3×10 <sup>-2</sup>
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	6,8×10 <sup>-2</sup>
MnSO <sub>4</sub>	6,18×10 <sup>-4</sup>
CaCl <sub>2</sub>	8,25×10 <sup>-2</sup>
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	5.66 ×10 <sup>-4</sup>
<b>Surfactantes</b>	
Alcohol Veratrílico	0,025mM
Dimetoxifenol	0,025 mM
Twen-80	0,01%p/v
<b>Condiciones iniciales</b>	
pH inicial	5,0
Humedad inicial	77%
Temperatura	28°C

**Anexo I. Ecuaciones utilizadas para la determinación 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	$\frac{U}{L \times \text{min} \times g(\text{sustrato seco})}$	U/g
$q_p$	$\frac{U/g}{\text{tiempo(hora)}}$	U/ g×hora
$Y_{P/X}$	$\frac{mg\text{proteína} / L}{g\text{célula} / L}$	U/g célula

Donde:

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

AE: actividad enzimática específica

$q_p$ : productividad específica

$Y_{P/X}$ : rendimiento de la formación e proteína por gramo de célula