

# **ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL**

**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y  
AGROINDUSTRIA**

**ESTUDIO CINÉTICO DE LA OBTENCIÓN DE EXTRACTOS  
ENZIMÁTICOS CON ACTIVIDAD CELULOLÍTICA Y LIGNINOLÍTICA  
A PARTIR DEL HONGO *Pleurotus Ostreatus* 404 Y 2171 EN  
RASTROJO DE MAÍZ**

**PROYECTO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA  
QUÍMICA**

**MÓNICA CECILIA VACA PROAÑO**

monika\_vp@hotmail.com

**DIRECTOR: ING. BOLÍVAR IZURIETA AMORES**

bolivar.izurieta@epn.edu.ec

**Quito, octubre 2011**

© Escuela Politécnica Nacional (2011)  
Reservados todos los derechos de reproducción

## **DECLARACIÓN**

Yo, Mónica Cecilia Vaca Proaño, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Escuela Politécnica Nacional puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.

---

Mónica Cecilia Vaca Proaño

## **CERTIFICACIÓN**

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por Mónica Cecilia Vaca Proaño, bajo mi supervisión.

---

Ing. Bolívar Izurieta  
**DIRECTOR DE PROYECTO**

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

	PÁGINA
<b>RESUMEN</b>	
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
<b>1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>1</b>
1.1. Cultivo del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i>	1
1.1.1. Generalidades	1
1.1.2. Condiciones de cultivo	2
1.1.2.1. Características del sustrato	3
1.1.2.2. Temperatura	4
1.1.2.3. Humedad relativa	4
1.1.2.4. Concentración de CO <sub>2</sub>	4
1.1.2.5. Luz	4
1.1.3. Técnicas de cultivo	5
1.1.4. Etapas de cultivo	6
1.1.4.1. Semilla	6
1.1.4.2. Inoculación	6
1.1.4.3. Incubación	6
1.1.4.4. Fructificación	7
1.1.4.5. Cosecha	7
1.2. Biotecnología de desechos lignocelulósicos: producción de enzimas	7
1.2.1. Enzimas como bioproductos potenciales y sus aplicaciones	9
1.2.2. Los microorganismos y la generación de enzimas lignocelulolíticas	9
1.3. Manejo y actividad de enzimas de extractos enzimáticos	11
1.3.1. Actividad enzimática	11
1.3.2. Celulasas	12
1.3.2.1. Endoglucanasas	13
1.3.2.2. Exoglucanasas	13
1.3.2.3. B-glucosidasas	14
1.3.2.4. Mecanismo de acción enzimática	14
1.3.3. Peroxidasas	15
1.3.3.1. Lignino peroxidasa	16
1.3.3.2. Manganeseo peroxidasa	16
1.3.3.3. Mecanismo de acción enzimática	17
1.3.4. Determinación de la actividad enzimática	19
<b>2. PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>22</b>
2.1. Materiales	22
2.2. Preparación del inóculo del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> 404 y 2171	23

2.3.	Preparación del sustrato e inoculación	24
2.3.1.	Caracterización química del rastrojo de maíz utilizado en la fermentación	24
2.3.2.	Esterilización del sustrato e inoculación	24
2.3.3.	Desarrollo del micelio	25
2.3.4.	Fructificación	25
2.3.5.	Muestreo y obtención de los extractos enzimáticos	25
2.4.	Determinación de la cinética de generación de la actividad enzimática celulolítica	26
2.5.	Determinación de la cinética de generación de la actividad enzimática manganeso peroxidásica y lignino peroxidásica	27
2.5.1.	Determinación de la actividad manganeso peroxidásica	27
2.5.2.	Determinación de la actividad lignino peroxidásica	27
2.6.	Determinación de los períodos de mayor generación de las actividades enzimáticas	28
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>30</b>
3.1.	Caracterización química del rastrojo de maíz utilizado en la fermentación	30
3.2.	Periodos de desarrollo y cosecha del hongo comestible	31
3.3.	Determinación de las actividades enzimáticas	34
3.3.1.	Ensayo de actividad celulolítica	34
3.3.2.	Ensayo de actividad manganeso peroxidásica	38
3.3.3.	Ensayo de actividad lignino peroxidásica	40
3.4.	Determinación de la cinética de generación de extractos con actividad enzimática	42
3.4.1.	Análisis de resultados de la segunda corrida de fermentación	42
3.4.2.	Análisis de resultados de la tercera corrida de fermentación	46
3.5.	Determinación del período de mayor generación de las actividades enzimáticas	51
<b>4.</b>	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	<b>54</b>
4.1.	Conclusiones	54
4.2.	Recomendaciones	56
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>57</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>61</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>PÁGINA</b>
<b>Tabla 1.1:</b> Producción estimada (peso fresco) de <i>Pleurotus spp.</i> en algunos países de América	2
<b>Tabla 1.2:</b> Principales tipos de materiales lignocelulósicos y sus aplicaciones actuales	8
<b>Tabla 1.3:</b> Organismos productores de enzimas ligninolíticas	16
<b>Tabla 2.1:</b> Equipos utilizados en el desarrollo de la parte experimental	22
<b>Tabla 2.2:</b> Reactivos utilizados en el desarrollo de la parte experimental	23
<b>Tabla 3.1:</b> Caracterización del rastrojo de maíz utilizado en la fermentación	30
<b>Tabla 3.2:</b> Períodos de tiempo en el crecimiento del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> 404, tiempos de cosecha y tiempos y valores de máxima generación enzimática para las dos corridas de fermentación	32
<b>Tabla 3.3:</b> Períodos de tiempo en el crecimiento del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> 2171, tiempos de cosecha y tiempos y valores de máxima generación enzimática para las dos corridas de fermentación	32
<b>Tabla 3.4:</b> Tiempos y valores de máxima generación enzimática para las dos corridas de fermentación para el <i>Pleurotus ostreatus</i> cepa 404	51
<b>Tabla 3.5:</b> Tiempos y valores de máxima generación enzimática para las dos corridas de fermentación para el <i>Pleurotus ostreatus</i> cepa 2171	52
<b>Tabla I.1:</b> Pesos registrados de las muestras de rastrojo húmedo	62
<b>Tabla I.2:</b> Porcentaje de humedad de las muestras de rastrojo húmedo	62
<b>Tabla VI.1:</b> Peso de los hongos comestibles obtenidos en la primera cosecha de la segunda corrida	72
<b>Tabla VI.2:</b> Peso de los hongos comestibles obtenidos en la segunda cosecha de la segunda corrida	73
<b>Tabla VI.3:</b> Peso de los hongos comestibles obtenidos en la primera cosecha de la tercera corrida	74

<b>Tabla VI.4:</b>	Peso de los hongos comestibles obtenidos en la segunda cosecha de la tercera corrida	75
<b>Tabla VIII.1:</b>	Diluciones y concentraciones de los estándares utilizados para la curva de calibración de glucosa	80
<b>Tabla IX.1:</b>	Valores de absorbancia a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad celulolítica para la segunda corrida de fermentación de las cepas de hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> 404 y 2171	81
<b>Tabla IX.2:</b>	Valores de absorbancia a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad celulolítica para la tercera corrida de fermentación de las cepas de hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> 404 y 2171	81
<b>Tabla X.1:</b>	Valores de absorbancia a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad manganeso peroxidásica para la segunda corrida de fermentación de las cepas de hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> 404 y 2171	82
<b>Tabla X.2:</b>	Valores de absorbancia a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad manganeso peroxidásica para la tercera corrida de fermentación de las cepas de hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> 404 y 2171	82
<b>Tabla XI.1:</b>	Valores de absorbancia a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad lignino peroxidásica para la segunda corrida de fermentación de las cepas de hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> 404 y 2171	83
<b>Tabla XI.2:</b>	Valores de absorbancia a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad lignino peroxidásica para la tercera corrida de fermentación de las cepas de hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> 404 y 2171	83
<b>Tabla XII.1:</b>	Valores de actividad celulolítica a diferentes tiempos para la segunda corrida de fermentación de las cepas de hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> 404 y 2171	84
<b>Tabla XII.2:</b>	Valores de actividad celulolítica a diferentes tiempos para la tercera corrida de fermentación de las cepas de hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> 404 y 2171	84
<b>Tabla XIII.1:</b>	Valores de actividad manganeso peroxidásica a diferentes tiempos para la segunda corrida de fermentación de las cepas de hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> 404 y 2171	85

<b>Tabla XIII.2:</b> Valores de actividad manganeso peroxidásica a diferentes tiempos para la tercera corrida de fermentación de las cepas de hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> 404 y 2171	85
<b>Tabla XIV.1:</b> Valores de actividad lignino peroxidásica a diferentes tiempos para la segunda corrida de fermentación de las cepas de hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> 404 y 2171	86
<b>Tabla XIV.2:</b> Valores de actividad lignino peroxidásica a diferentes tiempos para la tercera corrida de fermentación de las cepas de hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> 404 y 2171	86

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>PÁGINA</b>
<b>Figura 1.1:</b> Crecimiento del hongo comestible <i>Pleurotus ostreatus</i> En la naturaleza	1
<b>Figura 1.2:</b> Representación de la acción de las celulasas	14
<b>Figura 1.3:</b> Ciclo catalítico de las peroxidadas	17
<b>Figura 1.4:</b> Esquema de los ciclos catalíticos de la LiP (A) y la MnP (B) de <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	19
<b>Figura 3.1:</b> Valores de absorbancia obtenidos a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad celulolítica para las tres corridas de fermentación en rastrojo de maíz de la cepa de <i>Pleurotus ostreatus 404</i>	35
<b>Figura 3.2:</b> Valores de absorbancia obtenidos a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad celulolítica para las tres corridas de fermentación en rastrojo de maíz de la cepa de <i>Pleurotus ostreatus 2171</i>	36
<b>Figura 3.3:</b> Valores de absorbancia obtenidos a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad manganeso peroxidásica para las dos corridas de fermentación en rastrojo de maíz de la cepa de <i>Pleurotus ostreatus 404</i>	38
<b>Figura 3.4:</b> Valores de absorbancia obtenidos a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad manganeso peroxidásica para las dos corridas de fermentación en rastrojo de maíz de la cepa de <i>Pleurotus ostreatus 2171</i>	39
<b>Figura 3.5:</b> Valores de absorbancia obtenidos a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad lignino peroxidásica para las dos corridas de fermentación en rastrojo de maíz de la cepa de <i>Pleurotus ostreatus 404</i>	41
<b>Figura 3.6:</b> Valores de absorbancia obtenidos a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad lignino peroxidásica para las dos corridas de fermentación en rastrojo de maíz de la cepa de <i>Pleurotus ostreatus 2171</i>	42
<b>Figura 3.7:</b> Actividades enzimáticas celulolítica (CMC), manganeso peroxidásica (MnP) y lignino peroxidásica (LiP) obtenidas a diferentes tiempos para la segunda corrida de fermentación en rastrojo de maíz de la cepa de <i>Pleurotus ostreatus 404</i>	43

<b>Figura 3.8:</b> Actividades enzimáticas celulolítica (CMC), manganeso peroxidásica (MnP) y lignino peroxidásica (LiP) obtenidas a diferentes tiempos para la segunda corrida de fermentación en rastrojo de maíz de la cepa de <i>Pleurotus ostreatus</i> 2171	44
<b>Figura 3.9:</b> Actividades enzimáticas celulolítica (CMC), manganeso peroxidásica (MnP) y lignino peroxidásica (LiP) obtenidas a diferentes tiempos para la tercera corrida de fermentación en rastrojo de maíz de la cepa de <i>Pleurotus ostreatus</i> 404	46
<b>Figura 3.10:</b> Actividades enzimáticas celulolítica (CMC), manganeso peroxidásica (MnP) y lignino peroxidásica (LiP) obtenidas a diferentes tiempos para la tercera corrida de fermentación en rastrojo de maíz de la cepa de <i>Pleurotus ostreatus</i> 2171	47
<b>Figura VII.1:</b> Desarrollo del hongo comestible <i>Pleurotus ostreatus</i> en tubos de ensayo con Papa dextrosa agar	76
<b>Figura VII.2:</b> Crecimiento del hongo comestible <i>Pleurotus ostreatus</i> en cajas petri con Malta agar	76
<b>Figura VII.3:</b> Crecimiento del micelio del hongo comestible <i>Pleurotus ostreatus</i> en granos de trigo	77
<b>Figura VII.4:</b> Fundas de rastrojo de maíz inoculadas con granos de trigo con hongo comestible <i>Pleurotus ostreatus</i>	77
<b>Figura VII.5:</b> Rastrojo de maíz cubierto completamente por el micelio del hongo comestible <i>Pleurotus ostreatus</i>	78
<b>Figura VII.6:</b> Cuerpo fructífero del hongo comestible <i>Pleurotus ostreatus</i> cepa 404	78
<b>Figura VII.7:</b> Cuerpo fructífero del hongo comestible <i>Pleurotus ostreatus</i> cepa 2171	79

## ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>PÁGINA</b>
<b>ANEXO I</b> Determinación del contenido de humedad del rastrojo de maíz después de la esterilización	62
<b>ANEXO II</b> Determinación de resinas, ceras y grasas	63
<b>ANEXO III</b> Determinación de celulosa	65
<b>ANEXO IV</b> Determinación de lignina	67
<b>ANEXO V</b> Informe de resultados del análisis del rastrojo de maíz	69
<b>ANEXO VI</b> Rendimientos biológicos	72
<b>ANEXO VII</b> Resumen fotográfico del desarrollo del hongo comestible <i>Pleurotus ostreatus</i>	76
<b>ANEXO VIII</b> Obtención de la curva de calibración de d-glucosa	80
<b>ANEXO IX</b> Resultados de la absorbancia medida en el ensayo de determinación de la actividad celulolítica	81
<b>ANEXO X</b> Resultados de la absorbancia medida en el ensayo de determinación de la manganeso peroxidasa	82
<b>ANEXO XI</b> Resultados de la absorbancia medida en el ensayo de determinación de la lignino peroxidasa	83
<b>ANEXO XII</b> Resultados de la actividad enzimática celulolítica	84
<b>ANEXO XIII</b> Resultados de la actividad enzimática manganeso peroxidásica	85
<b>ANEXO XIV</b> Resultados de la actividad enzimática lignino peroxidásica	86

## RESUMEN

El presente trabajo está orientado a la determinación de la cinética de generación de tres actividades enzimáticas: celulolítica, manganeso peroxidásica y lignino peroxidásica en los extractos obtenidos a partir de la fermentación en rastrojo de maíz de dos cepas del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*, y la definición de los períodos de mayor generación de cada actividad enzimática.

Se utilizaron dos cepas de *Pleurotus ostreatus*, la cepa 404 y la 2171. Se hizo crecer estas cepas en rastrojo de maíz y se determinaron las actividades enzimáticas mediante métodos espectrofotométricos. La actividad celulolítica fue determinada por el método del reactivo DNS, la actividad manganeso peroxidásica por el método del rojo fenol y la actividad lignino peroxidásica mediante el método de oxidación del alcohol veratrílico. La actividad enzimática se expresó en unidades internacionales (UI) definidas como un  $\mu\text{mol}$  de producto generado o sustrato oxidado por minuto y por gramo de rastrojo de maíz seco. Con base en los resultados obtenidos de actividad enzimática se determinaron los períodos de mayor generación enzimática para cada actividad al compararlos con los períodos de desarrollo y crecimiento del hongo comestible.

La cepa de hongo 2171 presenta un crecimiento más lento que la cepa 404, lo que se refleja en un mayor tiempo para conseguir la primera cosecha y la generación de actividades enzimáticas. La mayor actividad enzimática obtenida para las dos cepas de hongos fue la actividad celulolítica, seguida de la actividad manganeso peroxidásica y por último la lignino peroxidásica. Esta última presenta una tendencia cercana a cero, sin variaciones apreciables a través del tiempo.

El rastrojo de maíz utilizado tiene un contenido de lignina del 18,44 % y de celulosa de 41,60 %. Debido a que el contenido de celulosa del rastrojo de maíz utilizado en la fermentación, es superior al contenido de lignina la mayor generación enzimática se da para la actividad celulolítica, en comparación con la actividad manganeso peroxidásica que es específica en la degradación de lignina.

La actividad celulolítica presenta sus máximos valores en los días de la cosecha del hongo comestible, el pico máximo se obtuvo el día de la primera cosecha, mientras que la actividad manganeso peroxidásica aumenta y se mantiene en sus máximos valores en el período de desarrollo del micelio y cuando se acerca el período de fructificación y cosecha, esta actividad disminuye y tiende a cero. La cepa de *Pleurotus ostreatus* 2171 presenta una mayor actividad enzimática tanto celulolítica como manganeso peroxidásica en comparación con la cepa de *Pleurotus ostreatus* 404.

## INTRODUCCIÓN

La agricultura y las industrias de alimentos y de papel generan una gran cantidad de desechos lignocelulósicos que constituyen un problema ambiental. Sin embargo, esta gran cantidad de biomasa considerada como desecho puede convertirse en materia prima para la generación de varios productos de interés comercial mediante la degradación de la lignina y la celulosa. Los métodos de hidrólisis ácidos y alcalinos se utilizan para degradar la celulosa y la lignina. Estos métodos de hidrólisis generan productos no específicos que necesitan removerse para la posterior fermentación, además los desechos de ácidos y bases ocasionan un problema ambiental. Por estas razones, el uso de enzimas es preferido sobre el uso de ácidos y bases, ya que las enzimas son catalizadores específicos que operan bajo condiciones de reacción leves, no generan productos no deseados y son amigables con el ambiente. (Howard *et al.*, 2003)

Los hongos comestibles como el *Pleurotus ostreatus* son degradadores eficientes de lignina y celulosa ya que producen durante su crecimiento enzimas lignocelulolíticas. Al generar estos hongos comestibles mediante fermentación en medio sólido con desechos agroindustriales como sustrato se analiza la posibilidad de obtener paralelamente extractos enzimáticos celulolíticos y ligninolíticos del material fermentado residual que contribuyan a mejorar la economía de pequeños y medianos productores de hongos comestibles tipo *Pleurotus ostreatus*.

Estudios realizados revelan que las enzimas lignocelulolíticas tienen un gran potencial de aplicación en biotecnología. Actualmente, las celulasas y enzimas relacionadas se usan en industrias de alimentos, textiles, de pulpa y papel así como para fines de investigación. Los trabajos de investigación sobre este campo se ven incentivados por la demanda cada vez más creciente de enzimas con actividad lignocelulósica (Bhat, 2000).

Las enzimas lignocelulolíticas también pueden ser utilizadas para producir etanol a partir de desechos agroindustriales. El etanol es una fuente renovable de

energía producido por la fermentación de azúcares. El método consiste en la hidrólisis de la celulosa en azúcares por acción de las enzimas y posteriormente la fermentación de los azúcares a etanol. Con las tecnologías aplicadas actualmente, el costo de producir etanol a partir de desechos lignocelulósicos es elevado, pero al remover la lignina y la hemicelulosa de estos desechos mediante la acción enzimática se optimiza la hidrólisis de la celulosa y el proceso se vuelve más barato (Sun, 2002).

Por esta razón, este trabajo está orientado, no solamente a generar cuerpos fructíferos del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*, sino también a utilizar el material fermentado residual para la obtención de extractos con actividad enzimática lignocelulolítica que puedan convertirse en una fuente adicional de ingresos económicos por sus varias aplicaciones en diferentes industrias. De esta manera, se consigue un aprovechamiento integral de desechos agroindustriales, generación del hongo comestible y obtención de extractos enzimáticos en un proceso global, que representa una alternativa rentable, en especial para los países productores de hongos comestibles.

El presente trabajo tiene por objetivos determinar la cinética de generación de actividad celulolítica, en los extractos obtenidos de la fermentación en medio sólido, determinar la cinética de generación de la actividad lignino peroxidásica y manganeso peroxidásica, en los extractos obtenidos de la fermentación en medio sólido y determinar los períodos de mayor generación de las enzimáticas estudiadas.

# 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

## 1.1. CULTIVO DEL HONGO *Pleurotus ostreatus*

### 1.1.1. GENERALIDADES

El cultivo de hongos comestibles, como el *Pleurotus ostreatus* es una actividad productiva que no perjudica al medio ambiente, por el contrario, en él se aprovechan desechos agroindustriales.

El *Pleurotus ostreatus* es un hongo saprofito o parásito débil, descomponedor del grupo de la podredumbre blanca que crece de forma silvestre en troncos de árboles en vías de descomposición o muertos (Stamets, 2000).



**Figura 1.1.** Crecimiento del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* en la naturaleza

Su cultivo comercial nace en Asia, principalmente en Japón, a principios del siglo pasado y se ha incrementado en las últimas 5 décadas hasta alcanzar un 14,2% de la producción total mundial de hongos en 1997, con China como principal productor con un 86,8% (Chang, 1997).

A nivel mundial, los principales productores son China, Japón, Taiwán, Corea del sur, Singapur, Tailandia y algunos países europeos como Francia, Holanda, Italia, Hungría y Suiza. En América, el cultivo de *Pleurotus ostreatus* ha tomado importancia a partir de la década de los 90, con México como principal productor. Las estadísticas de producción a nivel de América se muestran en la Tabla 1.1. Es previsible que la producción de *Pleurotus ostreatus* incremente, debido a un aumento sostenido del consumo del 13% anual y a su facilidad de cultivo.

**Tabla 1.1.** Producción estimada (peso fresco) de *Pleurotus spp.* en algunos países de América (Rodríguez, 2007)

País	Toneladas	Porcentaje
México	1825	47,53
Estados Unidos	908	23,65
Canadá	568	14,79
Brasil	450	11,72
Guatemala	22	0,57
Venezuela	18	0,47
Cuba	12	0,31
Colombia	9	0,23
Otros	28	0,73
Total	3840	100,00

El desarrollo tecnológico mundial está dirigido a maximizar los rendimientos, mediante el mejoramiento genético de las especies de hongos y la formulación de sustratos nutritivos. Se estima un 30% de población demandante en el futuro. Por tal motivo, se prevé un crecimiento alentador (Rodríguez, 2007).

### 1.1.2. CONDICIONES DE CULTIVO

El hongo comestible *Pleurotus ostreatus* requiere de condiciones ambientales especiales para su óptimo desarrollo y crecimiento. Los factores que se deben tomar en cuenta para favorecer el crecimiento son: características del sustrato, temperatura, humedad relativa, concentración de CO<sub>2</sub> en la cámara y la influencia de la luz.

### 1.1.2.1. Características del sustrato

El hongo *Pleurotus ostreatus* requiere sustratos con nutrientes específicos para su desarrollo, principalmente los que proporcionan fuentes de carbono y energía. Estas fuentes nutricionales son la celulosa, la hemicelulosa y la lignina. Este hongo puede crecer a relaciones carbono/nitrógeno (C/N) entre 30 y 300. La relación óptima varía con relación a la fase de crecimiento en la que se encuentra el hongo. La etapa de desarrollo del micelio se ve favorecida con relaciones C/N altas, mientras que las bajas relaciones C/N favorecen el desarrollo del cuerpo fructífero (Garzón y Cuervo, 2008).

En el cultivo de *Pleurotus ostreatus* se utiliza una gran variedad de materiales o desechos agroindustriales, debido a que el hongo utiliza la lignina y celulosa juntas como fuente de carbono. Algunos de estos desechos incluyen hojas de banano, cáscaras de nuez, rastrojo de maíz, cáscaras y semillas de mango, bagazo de caña de azúcar y paja de trigo y arroz. El sustrato utilizado más ampliamente para el cultivo de *Pleurotus ostreatus*, en Asia, es la paja de arroz, considerado el mejor sustrato en términos de rendimiento y alto contenido de proteínas. En Europa, en cambio, se utiliza la paja de trigo, mientras que en el Sudeste de Asia el aserrín es más usado (Mandeel *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 1998).

Se han realizado trabajos previos en Ecuador que utilizan rastrojo de maíz como sustrato. El rastrojo de maíz es un desecho agroindustrial del cultivo del maíz. Estos trabajos previos han obtenido buenos resultados de rendimiento (Pazos, 2004; Flores, 2005).

Para seleccionar el sustrato, es indispensable conocer su disponibilidad y abundancia en la región, en donde se piensa cultivar el hongo. Es importante tomar en cuenta buen precio de adquisición y que sea fácil de transportar. Algunas veces, es recomendable hacer una combinación de sustratos en diferente proporción, para incrementar la producción de hongos (Gaitán-Hernández, 2002).

### **1.1.2.2. Temperatura**

La temperatura es un factor importante en el crecimiento de hongo, así como en la cantidad y calidad de cuerpos fructíferos producidos. El micelio del hongo *Pleurotus ostreatus* puede crecer en un rango de temperaturas entre 0 y 35°C. Estudios demuestran que la temperatura óptima para el desarrollo del micelio es de 25 °C (Garzón y Cuervo, 2008).

### **1.1.2.3. Humedad relativa**

La humedad relativa es un factor importante que se encuentra ligado a la temperatura, ya que si aumenta la temperatura en el cuarto de cultivo, la humedad relativa disminuye. El contenido de humedad en el sustrato debe estar entre 50 y 80% para favorecer el desarrollo del micelio. La humedad relativa óptima para la fructificación está entre el 85 y el 90% (Garzón y Cuervo, 2008).

### **1.1.2.4. Concentración de CO<sub>2</sub>**

El hongo *Pleurotus ostreatus* muestra un crecimiento atrofiado en presencia de altas concentraciones de dióxido de carbono. Debido a la respiración del hongo, las concentraciones de CO<sub>2</sub> aumentan en los recipientes del sustrato.

En la etapa de desarrollo del micelio, el hongo es resistente a altas concentraciones de este gas, pero durante la etapa de fructificación la concentración de CO<sub>2</sub> afecta el crecimiento del cuerpo fructífero, ya que se producen hongos con troncos largos y sombreros diminutos. Debe airearse la cámara de tal manera que se mantengan niveles de oxígeno de un 20% y una concentración de CO<sub>2</sub> no mayor a 800 ppm, durante la fructificación (Garzón y Cuervo, 2008). La aireación tampoco debe ser excesiva para evitar pérdidas de humedad y endurecimiento del sustrato.

### **1.1.2.5. Luz**

La luz tiene relación principalmente con la coloración del hongo y es más importante en el período de desarrollo de los cuerpos fructíferos. La fase de desarrollo del micelio debe darse en la oscuridad ya que el crecimiento del micelio no requiere de luz. En la etapa de fructificación se debe tener una exposición del hongo a una luz tenue (iluminación indirecta) al menos por 12 h diarias, ya que un tiempo de exposición menor, disminuye la eficiencia biológica (relación entre el peso fresco del hongo y el peso seco del sustrato) en un 68% (Garzón y Cuervo, 2008).

### 1.1.3. TÉCNICAS DE CULTIVO

El cultivo de *Pleurotus ostreatus* ha sido analizado en diferentes sistemas de obtención como bandejas, contenedores cilíndricos, estantes de madera o poliestireno, bloques y fundas plásticas. Este último ha sido reportado como el que genera el mayor rendimiento respecto a los otros sistemas, con un menor nivel de contaminación. En Europa se prefiere cultivar en fundas grandes negras perforadas, mientras que en Asia se utilizan fundas más pequeñas (Mandeel *et al.*, 2005).

Cada región utiliza variaciones en esta técnica de cultivo, tales como tamaños de funda, material y color de las fundas, materiales utilizados como sustrato y tiempos de cosecha. Una ventaja de este método es que la cosecha se realiza de forma regular, por lo que la provisión de hongos es constante en el tiempo. Además el costo de producción es relativamente bajo, debido a que se utiliza una menor cantidad de sustrato y un menor consumo de combustible.

El proceso consiste en esterilizar el material que se va a utilizar como sustrato. Después se realiza la siembra del micelio del hongo. En las fundas plásticas se colocaron capas de sustrato y capas de inóculo. Las fundas se cierran de tal manera que pueda ingresar oxígeno a su interior.

Las fundas son llevadas a una cámara oscura donde permanecerán durante la etapa de incubación, hasta que el micelio haya poblado completamente el

sustrato. Este proceso dura entre 15 y 25 días y depende del tamaño de las fundas y del material sustrato. Culminada la etapa de desarrollo del micelio, las fundas son llevadas a una cámara clara-oscura para favorecer la fructificación del hongo comestible (Riofrío, 2007).

#### **1.1.4. ETAPAS DE CULTIVO**

##### **1.1.4.1. Semilla**

La semilla es la expansión de masa del micelio que busca potenciar metabólicamente al hongo, para que se encuentre en condiciones ideales y así crezca eficientemente en los sustratos de producción (Stamets, 2000).

El hongo se obtiene a partir de cultivos preservados criogénicamente en agar. Estos cultivos se siembran en tubos de ensayo, con agares nutritivos, y de ahí se resiembra en cajas petri. La semilla se prepara en granos de cereales como trigo, cebada, sorgo o arroz. Se hidratan los granos mediante cocción en agua caliente hasta alcanzar una humedad aproximada del 45%. El hongo que ha crecido en el agar se transfiere a los granos de cereal y se proporcionan las condiciones óptimas de crecimiento, descritas en el subcapítulo 1.1.2, hasta que el micelio recubra completamente los granos de cereal (Rodríguez y Gómez, 2001).

##### **1.1.4.2. Inoculación**

En esta etapa, se realiza la adición del inóculo o semilla al sustrato previamente esterilizado. Debe realizarse con inocuidad en una mesa desinfectada para evitar la contaminación del micelio.

##### **1.1.4.3. Incubación**

En la etapa de incubación, el micelio recubre completamente el sustrato. Se realiza en una cámara oscura y bajo condiciones ambientales controladas. La cámara debe mantenerse a una temperatura de 20 a 28°C y una humedad

relativa entre el 70 y 80%. Las fundas se colocan en estantes metálicos o directamente en el piso.

#### **1.1.4.4. Fructificación**

Esta etapa comienza cuando el micelio ha poblado completamente el sustrato y se comienzan a observar los primordios, que darán origen a los cuerpos fructíferos. Se deben aumentar las condiciones de humedad relativa y de iluminación. También se debe manejar una temperatura que se asemeje a la del hábitat natural del hongo (Fernández, 2004).

#### **1.1.4.5. Cosecha**

En esta fase se recogen los cuerpos fructíferos. Comúnmente se realiza de manera manual, con un movimiento de torsión en la base del hongo o con un corte con una cuchilla estéril. Se pueden tener tres períodos de cosecha. En la primera, se recolecta aproximadamente el 50% de la cosecha, en la segunda un 30% y en la tercera un 20%. No se recogen muchas cosechas ya que la productividad no es muy alta y aumenta el riesgo de contaminación (Oei, 2003).

## **1.2. BIOTECNOLOGÍA DE DESECHOS LIGNOCELULÓSICOS: PRODUCCIÓN DE ENZIMAS**

La biomasa puede ser considerada como la masa de material orgánico proveniente de un material biológico. Una amplia variedad de fuentes de biomasa están disponibles en el planeta, los cuales son materia prima potencial para la obtención de bioproductos.

Esta biomasa generada, principalmente, por las industrias madereras y de agricultura, está compuesta por lignina, celulosa y hemicelulosa, por lo que se denomina también como desechos lignocelulósicos. Estos llamados “desechos” pueden convertirse en materia prima para la generación de productos de gran

valor agregado como biocombustibles, químicos, fuentes baratas de energía por fermentación, alimentos mejorados para animales, entre otros (Howard *et al.*, 2003).

Estos materiales orgánicos, considerados como biomasa, se muestran en la Tabla 1.2.

**Tabla 1.2.** Principales tipos de materiales lignocelulósicos y sus aplicaciones actuales  
(Howard *et al.*, 2003)

<b>Material Lignocelulósico</b>	<b>Residuos</b>	<b>Uso común</b>
Cosecha de grano	Paja, mazorcas, tallos, cáscaras	Comida de animal, combustible, composta, acondicionador de suelo
Trigo, arroz, avena y maíz	Aguas residuales, salvado	Comida de animal
Granos procesados: Maíz, trigo, arroz y soja	Semillas, cáscaras, cortezas.	Comida para peces y animales, algunas semillas para extracción de aceite
Cosecha de frutas y vegetales	Fruta entera rechazada y jugo	Comida para peces y animales, algunas semillas para extracción de aceite
Procesamiento de frutas y vegetales	Semillas, cortezas, aguas residuales, cáscaras, fruta entera rechazada y jugo	Combustible
Caña de azúcar y otros productos del azúcar	Bagazo	Comida para animales, fertilizante y combustible
Aceites y plantas oleaginosas. Nueces, semillas de algodón, aceitunas, soja, etc.	Cáscaras, pelusas, fibras, lodos, fangos y aguas residuales	Acondicionadores de suelos
Residuos animales	Estiércol, otros desperdicios	Acondicionador de suelo
Papel de origen vegetal y pulpa. Talado de árboles	Residuos de madera, hojas, corteza, etc.	Industria del papel y la pulpa, viruta.
Residuos de aserradero y contrachapado de madera	Astillas, viruta, aserrín	Fibra de madera
Molinos de pulpa y papel	Residuos de fibra, licor de sulfito	Reutilización como pulpa y en la industria de la madera como combustible
Desperdicios lignocelulósicos de comunidades	Periódicos viejos, papel, cartón, tablas viejas, maderas en desuso	Un porcentaje pequeño es reciclado, la mayoría es quemado.
Hierba	Hierba sin uso	Quemado

### **1.2.1. ENZIMAS COMO BIOPRODUCTOS POTENCIALES Y SUS APLICACIONES**

Las enzimas ligninolíticas tienen numerosas aplicaciones en la industria química, de combustibles, alimentación humana y animal, textiles, pulpa y papel y en agricultura (Bhat, 2000; Howard *et al.*, 2003).

En la industria química, la bioconversión de desechos lignocelulósicos mediante enzimas puede contribuir a la producción de químicos orgánicos. Más del 75% de químicos orgánicos son producidos a partir de cinco químicos básicos: etileno, propileno, benceno, tolueno y xileno. Los compuestos aromáticos pueden obtenerse de la biodegradación de la lignina; mientras que, los compuestos alifáticos pueden derivarse del etanol producido por fermentación de azúcares generados de la biodegradación de la celulosa y hemicelulosa (Howard *et al.*, 2003).

Las ligninasas pueden utilizarse en la degradación de contaminantes aromáticos como el diclorofenol, dinitrotolueno y antraceno (Howard *et al.*, 2003).

Se pueden utilizar sistemas enzimáticos para la transformación de contaminantes, que conlleve una reducción o eliminación de su impacto ambiental. Los hongos degradadores de lignina poseen un conjunto de enzimas poco específicas, con un uso potencial en la transformación de compuestos contaminantes y xenobióticos. Además, este potencial puede utilizarse para la transformación enzimática de colorantes industriales, plaguicidas e hidrocarburos aromáticos (Dávila y Vázquez-Duhalt, 2006).

### **1.2.2. LOS MICROORGANISMOS Y LA GENERACIÓN DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS**

Una gran variedad de microorganismos lignocelulolíticos, principalmente hongos y bacterias, han sido aislados e identificados a través de los años. Pero a pesar del

gran número de microorganismos identificados, apenas unos pocos han sido estudiados extensamente.

Debido a su composición, los materiales lignocelulósicos constituyen un excelente sustrato para el crecimiento de hongos. Los hongos de pudrición blanca, pertenecientes al grupo de los basidiomicetes, son los degradadores de lignocelulosa más eficientes en el planeta (Howard *et al.*, 2003). Estos hongos remueven la lignina de la madera mediante diferentes patrones morfológicos. Pueden causar la degradación simultánea de la lignina junto con los polisacáridos de la pared celular, de esta manera quedan células perforadas o con paredes secundarias extremadamente delgadas, o realizar una degradación selectiva de la lignina (Blanchette, 1991).

El sistema de secreción enzimática, en los hongos filamentosos, tiene como propósito el crecimiento y transporte de nutrientes hacia el ápice hifal, que es el área activa de secreción enzimática. Con el fin de mantener la actividad metabólica, existe una cierta actividad secretora de enzimas a lo largo del resto del micelio (Papinutti *et al.*, 2003).

Las enzimas extracelulares son producidas dentro de la célula, pero actúan fuera de ella. La síntesis de enzimas está sujeta a mecanismos de regulación. Es decir, no se producen de modo constante, sino que su síntesis es inducida por el sustrato adecuado y es reprimida por azúcares fácilmente utilizables, como la glucosa. El inductor más eficiente es el polímero-sustrato de las enzimas que serán sintetizadas, pero debido a su alto peso molecular, estos polímeros no pueden penetrar por la pared celular a la célula para ejercer su efecto. Existen bajos niveles enzimáticos que degradan una pequeña porción del polímero y hacen que algún producto soluble de su hidrólisis sea incorporado a la célula y que se induzca la síntesis enzimática.

Las enzimas extracelulares del complejo celulolítico y ligninolítico existen en múltiples formas y son llamadas isoenzimas. Es decir, en medios de cultivo diferentes, se sintetizan diferentes formas de la misma enzima con características

catalíticas similares pero que difieren en sus características fisicoquímicas. La síntesis de las isoenzimas puede deberse a productos de genes diferentes, cambios postraduccionales como proteólisis, glicosilación y formación de agregados cuaternarios. También se pueden sintetizar como consecuencia de cambios de estados fisiológicos diferentes (composición del medio de cultivo, pH, temperatura, etc.) a partir de genes regulados diferencialmente. Se tiene una variación de la composición de las isoenzimas a lo largo del crecimiento del hongo.

En la naturaleza, los hongos se encuentran con distintos sustratos y distintas condiciones ambientales, por lo que producen distintas formas enzimáticas con propiedades que permitan degradar el polímero, de la manera más eficiente.

### **1.3. MANEJO Y ACTIVIDAD DE ENZIMAS DE EXTRACTOS ENZIMATICOS**

#### **1.3.1. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA**

La actividad enzimática se expresa en Unidades Internacionales UI. Según la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (UIBBM), una UI se define como “aquella cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1 mmol de sustrato o la formación de 1 mmol de producto por minuto, bajo condiciones definidas” (Racker, 1958).

La medición de la actividad enzimática se realiza a una temperatura fija, se utilizan condiciones saturantes de todos los sustratos y cofactores, de manera que la actividad enzimática medida represente la velocidad máxima de la reacción enzimática (Chávez *et al.*, 1990).

La actividad enzimática de un extracto impuro puede expresarse en U/mL de solución, U/mL de gel, U/mL de suspensión, entre otras. También existe otra

forma de expresión específica, por unidad de masa de la enzima, por ejemplo, en U/mg de proteína.

Las enzimas exocelulares son más estables, en general, que las intracelulares, debido a que operan en un ambiente más hostil y son moléculas más pequeñas que se encuentran en mayor concentración. La actividad de las enzimas se ve alterada por la desnaturalización, la inactivación del sitio catalítico y la proteólisis.

La desnaturalización puede producirse por efecto de la temperatura, pH y agentes desnaturalizantes. Los agentes desnaturalizantes pueden ser disolventes orgánicos, como el alcohol en altas concentraciones. Hay casos en los que el tiempo de conservación produce una inactivación lenta de las enzimas. Es necesario seleccionar un pH de trabajo similar al que se presenta en el medio natural, aunque este puede variar por efecto de la temperatura. En muchos casos, la temperatura de trabajo difiere de la temperatura que tiene el medio intracelular de la enzima. La inactivación de sitios catalíticos ocurre por cambios químicos de los residuos de los aminoácidos ubicados en los centros activos o por la pérdida de los cofactores y grupos prostéticos disociables. La degradación proteolítica es producida por acción de las proteasas, que se encuentran en las mismas células. La presencia de las proteasas debe controlarse para evitar la degradación proteolítica (Chávez *et al.*, 1990).

### **1.3.2. CELULASAS**

Las enzimas celulolíticas son un grupo de enzimas que actúan conjuntamente para hidrolizar la celulosa. La celulosa es el recurso natural renovable más abundante en el planeta. Las aplicaciones de estas enzimas son varias, las principales son (Wang, 1982):

- En la industria cervecera, facilitan la solubilización del grano de cebada y la filtración de la malta.
- Extracción de aceites esenciales y sabores de las plantas.
- Mejoran la extracción y clarificación de jugos de frutas y vegetales.

- Aumentan la eficiencia y la digestibilidad de los alimentos balanceados para ganado
- Solubilizan la celulosa en posas sépticas y de tratamiento de basura.
- Tratamiento de desechos en la industria del papel.

La pudrición blanca de la madera y residuos lignocelulósicos es producida por la acción bioquímica del sistema enzimático de ciertos hongos, como el *Pleurotus ostreatus*, que digieren la lignina presente en la pared celular.

Al degradar la lignina queda un tejido de color blanco principalmente compuesto de celulosa, la cual es degradada por enzimas celulolíticas producidas por el hongo. El complejo de enzimas celulolíticas de los hongos de pudrición blanca consiste de tres enzimas hidrolíticas: endoglucanasas, exoglucanasas y celobiasas, las cuales trabajan sinérgicamente (Lemaire, 1996).

#### **1.3.2.1. Endoglucanasas (1,4-β-D-glucan 4-glucanohidrolasas) (EC 3.2.1.4)**

Producen una disminución en el grado de polimerización de la celulosa. Por cortes al azar de la cadena glucosídica producen glucosa, celobiosa (disacáridos) y celotriosa (trisacáridos). Las endoglucanasas actúan sobre sustratos como carboximetilcelulosa, celulosa amorfa, celooligosacáridos y no actúa, de manera significativa, sobre la celulosa cristalina, como las fibras de algodón (Lemaire, 1996).

#### **1.3.2.2. Exoglucanasas**

Producen rupturas secuenciales en la molécula de celulosa a partir de un extremo no reductor liberado y están representadas por dos grupos:

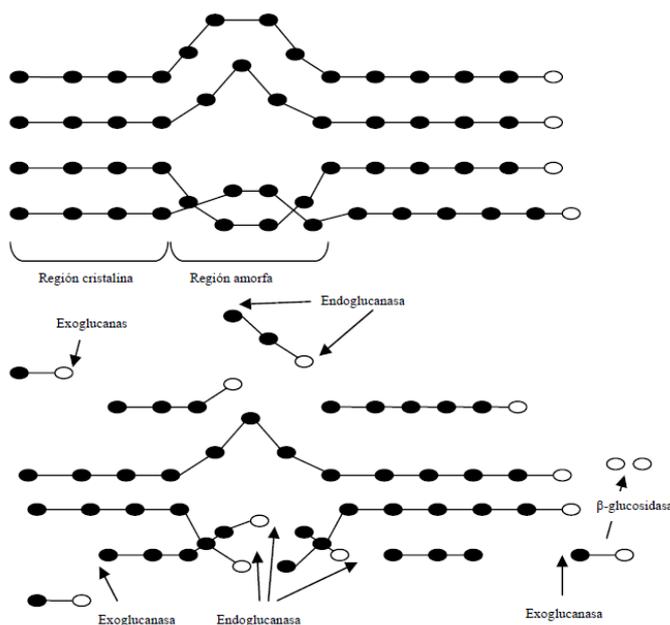
- Exocelobiohidrolasas, llamadas también celobiohidrolasas (CBH) (1,4-β-D-glucan celobiohidrolasas) (EC 3.2.1.91): Liberan unidades de celobiosa a partir del extremo no reductor.
- Exoglucohidrolasas (1,4-β-D-glucan glucohidrolasas) (EC 3.2.1.74): Liberan unidades de glucosa a partir del extremo no reductor liberado.

### 1.3.2.3. $\beta$ -glucosidasas ( $\beta$ -D-glucósido glucohidrolasas) (EC 3.2.1.21)

Hidrolizan la celulosa y otros  $\beta$ -1,4-oligoglucósidos de cadena corta, para formar glucosa. La glucosa es el resultado final de la acción degradante del complejo celulolítico sobre el polímero de celulosa.

### 1.3.2.4. Mecanismo de acción enzimática

La celulosa es atacada inicialmente por la endoglucanasa, la cual se liga al azar sobre las microfibrillas de celulosa en regiones amorfas, para producir la hidrólisis de los enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos. De esta manera, se generan múltiples sitios de ataque para las exo-1,4- $\beta$ -D-glucanasas, las cuales actúan sobre los extremos no reductores de la cadena y liberan una unidad de celobiosa. Estas dos enzimas cooperan de manera continua con la  $\beta$ -glucosidasa, la cual actúa sobre la celulosa y sobre pequeños oligómeros, para producir moléculas de glucosa. El resultado de la acción de estas tres actividades enzimáticas es la degradación sinérgica de la celulosa, como se muestra en la Figura 1.2. Este modelo es una simplificación de lo que ocurre, en la realidad, durante la degradación biológica de la celulosa, ya que no tiene en cuenta la presencia de las actividades oxidativas auxiliares.



**Figura 1.2.** Representación de la acción de las celulasas. Glucosa:  $\circ$  (Montoya, 2008)

Se ha encontrado en los hongos de pudrición blanca un número de actividades enzimáticas oxidativas auxiliares, las cuales no son esenciales para la hidrólisis de la celulosa; pero, pueden asistir a la degradación del polímero al llevar a cabo conversiones útiles, como oxidaciones o remoción de productos finales, que pueden causar represión catabólica o inhibición de los grupos principales de las enzimas celulolíticas.

### 1.3.3. PEROXIDASAS

Dada la heterogeneidad y al gran tamaño de la molécula de lignina, los sistemas enzimáticos, involucrados en su degradación, deben ser extracelulares y no específicos (Kirk y Farrel, 1987). En los años setenta se realizaron estudios con hongos ligninolíticos que permitieron comprobar que la degradación de la lignina daba lugar a productos que provenían de la ruptura oxidativa de anillos aromáticos, por lo que se pensó que las oxigenasas extracelulares podían estar involucradas en la transformación de la lignina. Años después, tres grupos reportaron, de manera independiente, el descubrimiento de un ligninasa capaz de oxidar y despolimerizar la lignina y cuya actividad depende del peróxido de hidrógeno. Esta enzima se conoce, ahora, como lignino peroxidasa (LiP).

A partir de este hallazgo, se encontró la producción de dos peroxidases más: la manganeso peroxidasa (MnP), que oxida el  $Mn^{+2}$  a la especie oxidante  $Mn^{+3}$ ; y recientemente en los géneros *Pleurotus* y *Bjerkandera*, se ha descrito una MnP versátil que conjuga las propiedades catalíticas de LiP y MnP. La LiP y la MnP son peroxidases con un grupo hemo como cofactor, que emplean el peróxido de hidrógeno como primer aceptor de electrones. Además de las peroxidases encontradas, se detectó la producción de una enzima fenol oxidasa denominada Lacasa. Esta enzima reduce el oxígeno molecular a agua y a través de la utilización de ciertos compuestos redox puede oxidar las porciones no fenólicas de la lignina (Dávila y Vázquez-Duhalt, 2006).

Una lista de los principales microorganismos productores de enzimas ligninolíticas se muestran en la Tabla 1.3.

**Tabla 1.3.** Organismos productores de enzimas ligninolíticas

Organismo	Enzimas Ligninolíticas
<i>Phanaerochaete chrysosporium</i>	MnP, LiP
<i>Trametes versicolor</i>	MnP, Lacasa
<i>Ceriporopsis subvermispora</i>	MnP, Lacasa
<i>Cyanthus stercoreus</i>	MnP, Lacasa
<i>Phlebia radiata</i>	MnP, LiP, Lacasa
<i>Nematoloma frowardii</i>	MnP, LiP, Lacasa
<i>Pleurotus eryngii</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Pleurotus pulmonarius</i>	MnP, LiP, Lacasa

(Dávila y Vázquez-Duhalt, 2006)

**1.3.3.1. Lignino peroxidasa (E.C.1.11.1.14) (LiP)**

Es una hemoproteína glicosidada, extracelular, dependiente del peróxido de hidrógeno, caracterizada por su potencial redox inusualmente alto y su bajo pH óptimo.

La LiP actúa sobre grupos fenólicos y no fenólicos. Es capaz de oxidar el alcohol veratrílico, que es un metabolito producido durante el crecimiento secundario. El alcohol veratrílico oxida compuestos aromáticos y es oxidado, por la LiP, a aldehído veratrílico. Luego puede oxidar al sustrato lignina. También cumple un rol protector de la enzima ya que previene su oxidación (Koduri y Tien, 1994).

**1.3.3.2. Manganeso peroxidasa (E.C.1.11.1.13) (MnP)**

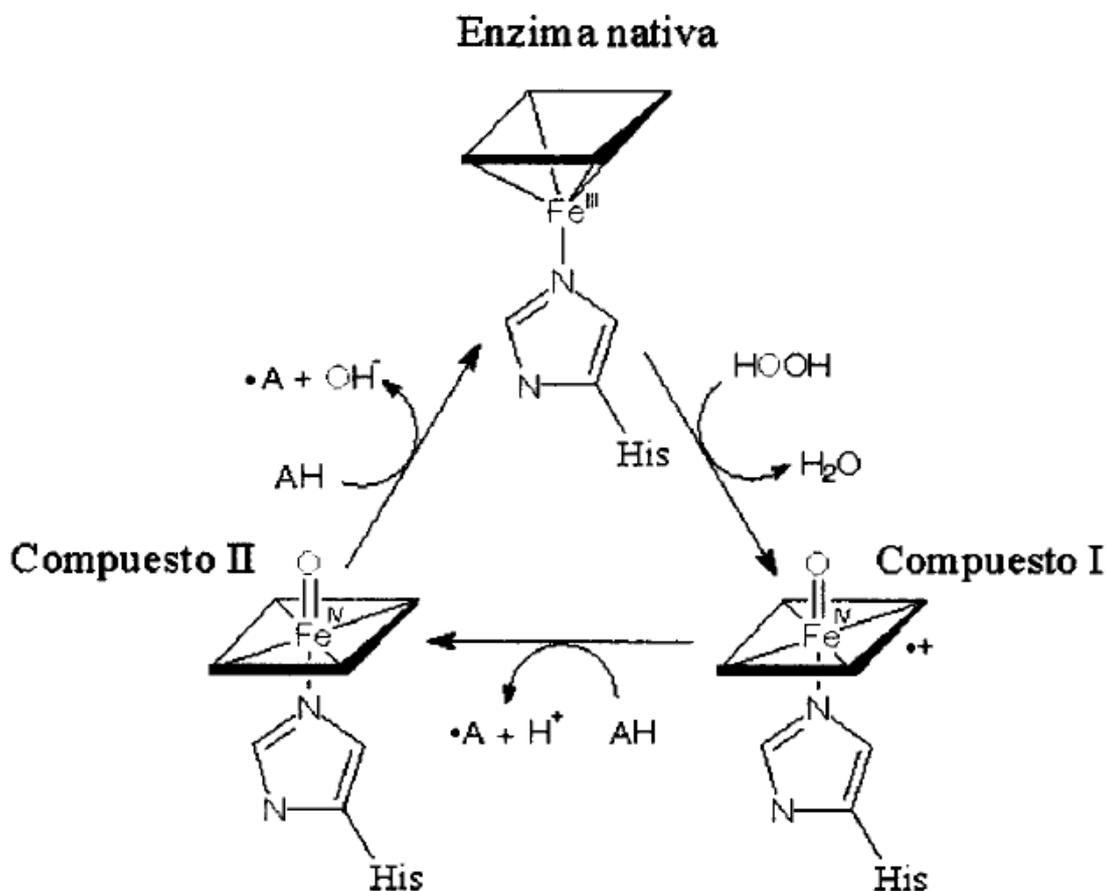
Es una enzima ampliamente distribuida entre los hongos causantes de la pudrición blanca. Es una hemoproteína glucosilada con fuerte preferencia por el  $Mn^{+2}$  como sustrato. Oxida el  $Mn^{+2}$  a  $Mn^{+3}$ , el cual forma complejos con ácidos dicarboxílicos o con  $\alpha$ -hidroácidos. Estos complejos pueden difundir a cierta distancia la enzima y oxidar, a su vez, a la lignina.

Actúa principalmente sobre sustratos fenólicos, aunque estudios recientes han demostrado su actividad sobre sustratos no fenólicos. La regulación de la

producción está dada por la limitación de nitrógeno y manganeso (Buswell *et al.*, 1995).

### 1.3.3.3. Mecanismo de acción enzimática

El ciclo catalítico de la LiP y la MnP está compuesto por tres reacciones consecutivas. Estas reacciones se muestran en la Figura 1.3.



**Figura 1.3.** Ciclo catalítico de las peroxidasas (Dawson, 1988)

En primer lugar, se da la reacción del sitio activo de la enzima con el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), que produce la reducción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  y la oxidación por dos electrones de la proteína férrica a un intermediario denominado Compuesto I.

Este intermediario posee dos equivalentes reductores y contiene un centro oxiferril [ $\text{Fe}^{+4}=\text{O}$ ] y un radical  $\pi$ -catiónico. Este radical puede ubicarse tanto en el

grupo hemo, como en algún residuo de la proteína, lo cual depende de la isoenzima.

Después el Compuesto I se reduce mediante un electrón de una molécula del sustrato reductor (AH) que da lugar a un radical del sustrato ( $A^{\cdot}$ ) y al Compuesto II, en el cual el radical catiónico se reduce al estado nativo.

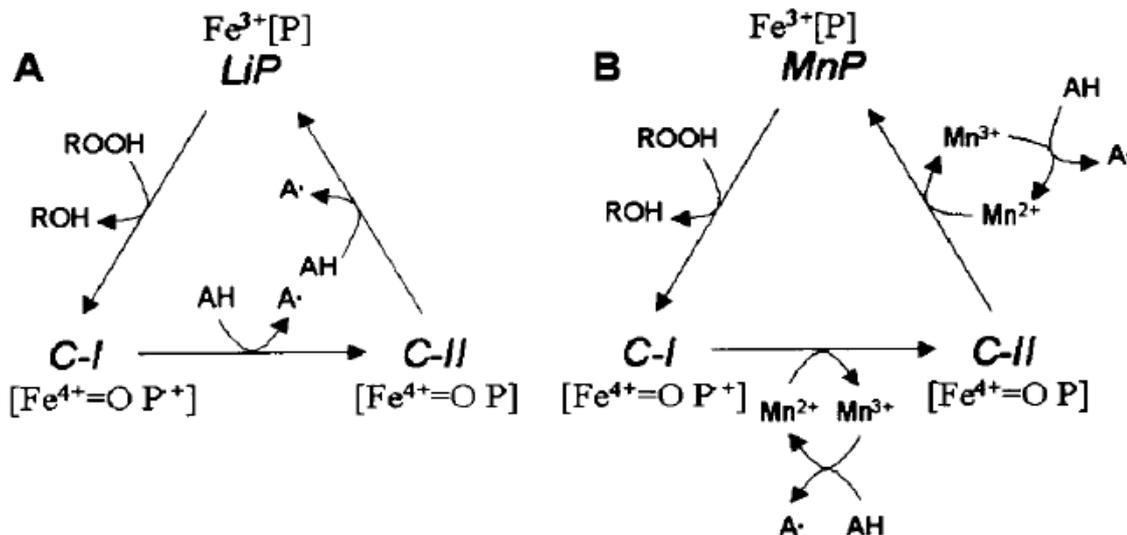
Finalmente, el Compuesto II se reduce con un electrón de una segunda molécula de sustrato reductor, hasta el estado nativo de la enzima que contiene el  $Fe^{+3}$  (Dávila y Vázquez-Duhalt, 2006).

Las peroxidasas ligninolíticas difieren en los sustratos reductores (AH) que son oxidados por la transferencia de un electrón a los compuestos I y II. La LiP es inespecífica en sus sustratos reductores. Puede oxidar compuestos aromáticos de alto potencial redox como el alcohol veratrílico, metoxibencenos y modelos diméricos no fenólicos de lignina.

La MnP es específica en sus sustratos reductores, ya que solo el  $Mn^{+2}$  puede completar eficientemente su ciclo catalítico. Estudios cinéticos han demostrado que el compuesto I de la MnP puede ser reducido tanto por  $Mn^{+2}$  como por compuestos fenólicos, mientras que el compuesto II solo puede ser reducido por el  $Mn^{2+}$ .

Al ser el  $Mn^{+3}$  una especie altamente oxidante e inestable en medio acuoso, los hongos lignocelulósicos secretan ácidos dicarboxílicos, principalmente el ácido oxálico y otros ácidos como el malónico, que forman complejos estables con el  $Mn^{+3}$ , capaces de difundir a través de la pared celular vegetal y que actúan como oxidantes de compuestos fenólicos (Dávila y Vázquez-Duhalt, 2006).

En la Figura 1.4 se muestran los ciclos catalíticos de la LiP y la MnP generadas por el *Phanerochaete chrysosporium*.



**Figura 1.4.** Esquema de los ciclos catalíticos de la LiP (A) y la MnP (B) de *Phanerochaete chrysosporium*, adaptados por Renganathan y Gold (1986) y Gold *et al.* (1987)

#### 1.3.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Para medir la actividad enzimática de un determinado extracto, se realizan estimaciones químicas de la concentración del sustrato o de un producto formado en la reacción. En el caso de reacciones complejas, donde existe un intermediario entre el sustrato y el producto, solo la determinación de la desaparición del sustrato da una medida correcta de la actividad enzimática (Chávez *et al.*, 1990).

Para seguir el curso de una reacción enzimática, se utilizan preferentemente técnicas espectrofotométricas, debido a su simplicidad y sensibilidad. Si el sustrato o el producto formado absorben la luz a una determinada longitud de onda, la reacción puede monitorearse al seguir los cambios de absorbancia a esta longitud de onda. (Chávez *et al.*, 1990).

La transmitancia (T) de una sustancia en solución es la relación entre la cantidad de luz transmitida que llega al detector una vez que ha atravesado la muestra,  $I$  y la cantidad de luz que incidió sobre ella,  $I_0$  y se representa:

$$T = I / I_0$$

La absorbancia ( $A$ ) indica la cantidad de luz absorbida por la muestra. Se define como el logaritmo de  $1/T$ , donde  $T$  es la transmitancia de la muestra. En consecuencia:

$$A = -\log(I/I_0)$$

Donde  $I_0$  es la intensidad de luz incidente y  $I$  es la intensidad de luz transmitida a través de la muestra (Díaz *et al.*, 2006).

La absorbancia está relacionada con la concentración mediante la ley de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon \times c \times l$$

Donde  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar,  $c$  es la concentración molar y  $l$  es la longitud del paso de luz a través de la muestra.

La absorbancia de una solución es directamente proporcional a su concentración, debido a que a mayor número de moléculas hay una mayor interacción de la luz con ellas. También depende de la distancia que recorre la luz por la solución, ya que a igual concentración, cuanto mayor distancia recorre la luz a través de la muestra más moléculas se encontrará. Por último, depende de  $\epsilon$ , una constante de proporcionalidad que es específica de cada compuesto (Díaz *et al.*, 2006).

Como  $A$  es adimensional, las dimensiones de  $\epsilon$  dependen de las de  $c$  y  $l$ . La magnitud  $l$  se expresa siempre en cm; mientras que,  $c$  se expresa, siempre que sea posible, en M, con lo que las dimensiones de  $\epsilon$  resultan ser  $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ . La ley de Lambert-Beer es válida para longitudes de onda en el rango de luz visible (400 - 700 nm) y en el rango ultravioleta (200 - 400 nm) y se cumple para soluciones diluidas; para valores de  $c$  altos,  $\epsilon$  varía con la concentración, debido a fenómenos de dispersión de la luz, agregación de moléculas, cambios del medio, etc. (Díaz *et al.*, 2006).

Es preferible utilizar procedimientos, en los que la absorbancia aumente con el tiempo, debido a que las etapas más críticas de la reacción se dan en la parte inferior de la escala de absorbancia, que es la parte más sensible. Además, se prefiere la utilización de espectrofotómetros de doble haz que comparan simultáneamente la absorbancia de la muestra con el blanco. Una manera de optimizar la medición es acoplar el espectrofotómetro a registradores automáticos que permiten seguir gráficamente el curso de la reacción.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1. MATERIALES

Se utilizaron dos cepas de *Pleurotus ostreatus* proporcionadas por el Laboratorio de Bioprocesos de la Escuela Politécnica Nacional. Las cepas utilizadas fueron la 404 y la 2171.

El rastrojo de maíz utilizado fue obtenido de la ciudad de Atuntaqui, ubicada en la provincia de Imbabura.

Los equipos utilizados y sus respectivas marcas se especifican en la Tabla 2.1. Los medios de cultivo (malta agar, papa dextrosa agar) y los reactivos utilizados en la parte experimental se muestran en la Tabla 2.2. Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

**Tabla 2.1.** Equipos utilizados en el desarrollo de la parte experimental

Equipo	Marca
Balanza	OHAUS-Scott
	OHAUS-Trooper
Balanza analítica	Boeco Germany
Espectrofotómetro	Labomed. Inc. Spectro UV-VIS Double Beam UVD 3500
Computador	ARI Modelo INTEL I3 550
Cámara de flujo	Laminar Cabin flow 85 H Flujo horizontal clase 10C IFV Industries
Termómetro de temperatura máxima y temperatura mínima	Taylor
Agitador	New Brunswick Scientific
pH metro	Orion 3Star
Incubadora	Boeckel Industries INC Model 132000
Plancha de calentamiento	Barnstead Thermolyne
Baño María	Cole Parmer Polystad Model 1200-00 Circulator
	Julabo SW22

**Tabla 2.2.** Reactivos utilizados en el desarrollo de la parte experimental

<b>Reactivo</b>	<b>Marca</b>
Alcohol veratrílico	Aldrich
Bisulfito de sodio	Fisher Scientific
Tartrato de sodio	Sigma
Acetato de sodio	Merck
Tartrato de sodio y potasio	Fisher Scientific
Carboximetilcelulosa	HiMedia Laboratories
Albúmina	J.T.Baker Inc
Agua oxigenada	Merck
Ácido cítrico	J.T.Baker Inc
Hidróxido de sodio	Merck
Fenol	BDH Laboratories
Ácido tartárico	BDH Laboratories
Ácido acético	Riel De Haen ag seelza hannover
DNS	Sigma

## **2.2. PREPARACIÓN DEL INÓCULO DEL HONGO *Pleurotus ostreatus* 404 Y 2171**

Se duplicaron las cepas 404 y 2171 del hongo *Pleurotus ostreatus* en tubos de ensayo con papa dextrosa agar como medio de cultivo. Se prepararon cajas Petri con malta agar como medio de cultivo y se inocularon con los hongos procedentes de los tubos de ensayo. Se almacenaron a 25 °C en una estufa, hasta que el micelio cubrió en su totalidad la superficie de la caja. Se prepararon frascos de vidrio de una capacidad de 500 ml, con 120 g de trigo seco y 240 ml de agua, por cada frasco (Relación constante 1:2).

Se taparon y esterilizaron los frascos en un autoclave a 121 °C por 15 min. Se sacaron los frascos del autoclave, se agitó cada frasco individualmente para evitar la aglomeración del trigo húmedo y se dejaron enfriar. Se inoculó cada frasco con un cuarto del micelio crecido en las cajas Petri y se cerró cada frasco, no

herméticamente, para dejar la entrada de aire al sistema. Los frascos se almacenaron en una estufa a 25 °C hasta que el micelio cubrió en su totalidad los granos de trigo. El trigo de los frascos constituyó el inóculo para la siembra definitiva en las fundas.

## **2.3. PREPARACIÓN DEL SUSTRATO E INOCULACIÓN**

### **2.3.1. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL RASTROJO DE MAÍZ UTILIZADO EN LA FERMENTACIÓN**

Se determinó el contenido de lignina; celulosa; y, resinas, ceras y grasas del rastrojo de maíz utilizado en la fermentación. Los análisis fueron realizados en el Laboratorio de Pulpa y Papel de la Escuela Politécnica Nacional. Se utilizaron los métodos descritos en el Manual sobre la Fabricación de Pulpa y Papel de Grant (1966) y las normas TAPPI. Los procedimientos de las normas utilizadas se describen en el Anexo II, Anexo III y Anexo IV.

### **2.3.2. ESTERILIZACIÓN DEL SUSTRATO E INOCULACIÓN**

Como sustrato se utilizó rastrojo de maíz procedente de la provincia de Imbabura, el cual se picó para obtener fracciones entre 3 y 5 cm. Se esterilizó el sustrato en costales cerrados y se llevó a ebullición en agua a 90 °C, por un período de 1 h, en un autoclave abierto. Una vez esterilizado se drenó el exceso de agua y se dejó enfriar. El rastrojo se extendió en una mesa metálica limpia y desinfectada.

Se utilizaron fundas plásticas de 17,78 x 25,40 cm (7 x 10 pulgadas). Se llenaron las fundas con capas alternadas de rastrojo de maíz y de trigo inoculado en una relación del 10% del peso total del sustrato contenido en la funda. El peso total en cada funda fue de aproximadamente 0,25 kg. Las fundas se cerraron con cinta adhesiva.

### **2.3.3. DESARROLLO DEL MICELIO**

Se llevaron las fundas inoculadas y cerradas a una cámara oscura. En el cuarto día de fermentación se realizaron dos perforaciones en forma de cruz de 2x2 cm, a cada lado de la funda. Desde este día se procedió a la aireación y humidificación de la cámara, dos veces por día, para mantener una humedad relativa superior al 80% y una temperatura entre 16 y 20 °C. La aireación se realizó al prender el ventilador, ubicado dentro de la cámara, por 5 min para promover el cambio de aire.

Las fundas permanecieron en esta cámara hasta el desarrollo completo del micelio.

### **2.3.4. FRUCTIFICACIÓN**

Las fundas pobladas completamente por el hongo fueron llevadas a una cámara clara–obscura, para promover el apareamiento de los cuerpos fructíferos, mediante la presencia de luz tenue. Se mantuvieron condiciones de temperatura 16 y 20 °C y de humedad relativa superior al 80%.

### **2.3.5. MUESTREO Y OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ENZIMÁTICOS**

Durante el período de fermentación, desde la siembra hasta la segunda cosecha, se muestrearon dos fundas para la cepa de *Pleurotus ostreatus* 404 y dos fundas para la cepa 2171 con una frecuencia de dos veces por semana.

El contenido de cada funda se homogeneizó. Para cada análisis enzimático se pesaron 45 g de sustrato fermentado y se colocaron en un erlenmeyer de 250 ml, con 75 ml de la solución buffer, correspondiente a cada ensayo.

Se colocaron los erlenmeyer en el agitador, por 30 min. Luego se filtró el sustrato y se obtuvo el extracto en el que se determinaron las actividades enzimáticas.

## **2.4. DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE GENERACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA CELULOLÍTICA**

La actividad celulolítica se determinó según el método de Miller (Ghose, 1987). Se utilizó como sustrato una solución de carboximetilcelulosa al 2% en solución buffer de citrato de sodio 0,05 M pH 4.8.

Se agregaron 0,5 ml de extracto enzimático a un tubo de ensayo, de al menos 25 ml de capacidad. Se agregaron 0,5 ml de la solución sustrato y se incubó 30 min en un baño maría a 50 °C.

Se agregaron 3,0 ml de reactivo DNS y se colocó en agua en ebullición por 5 min exactamente. Se hirvieron juntos los tubos con las muestras de extracto enzimático, el blanco y los estándares. Después de hervir, los tubos se trasladaron a un baño de agua fría para detener la reacción. Se agregaron 20 ml de agua destilada a cada tubo y se homogeneizaron las mezclas.

El blanco de reactivos se preparó de la misma manera, pero con la sustitución de los 0,5 ml de extracto enzimático por 0,5 ml de solución buffer de citrato de sodio 0,05 M pH 4,8. Para cada muestra se preparó un blanco en el que el extracto enzimático se agregó después de agregar el DNS con el fin de corregir los azúcares presentes en el extracto enzimático.

Para cada muestra y blancos correspondientes se midió la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro. La concentración de azúcares reductores se calculó mediante la ecuación de regresión, obtenida de una curva patrón con D-glucosa anhidra.

La actividad enzimática se reportó en Unidades Internacionales (UI), definidas como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de D-glucosa por min, en las condiciones de la reacción. Para cada fermentación, la actividad se expresó en UI por g de materia seca ( $\text{UI}\cdot\text{g}^{-1}$ )

## **2.5. DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE GENERACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA LIGNINO PEROXIDÁSICA Y MANGANESO PEROXIDÁSICA**

### **2.5.1. Determinación de la actividad manganeso peroxidásica**

La actividad manganeso peroxidásica fue medida, espectrofotométricamente, de acuerdo con Lopes *et al.* (2009). En un tubo de ensayo de 10 mL se colocó: 0,1 mL de buffer acetato de sodio 0,1 M (pH 4,5), 0,05 mL de una solución de MnSO<sub>4</sub> 2 mM, 0,20 mL de una solución de albúmina al 0,5% y 0,05 mL de una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 mM en buffer de fosfato de sodio 0,2 M (pH 8,0). La mezcla se dejó reaccionar en un baño maría a 30 °C por 10 min. La reacción fue detenida por adición de 0,04 mL de una solución de NaOH 2 N. Para cada muestra se preparó un blanco sin la adición del peróxido de hidrógeno. De cada muestra y blanco, correspondiente, se leyó la absorbancia a 610 nm.

Se determinó concentración de sustrato oxidado mediante la ley de Labert-Beer con un  $\epsilon = 22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . La actividad enzimática se reportó en Unidades Internacionales (UI), definidas como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato por min en las condiciones de la reacción. Para cada fermentación la actividad se expresó en UI por g de materia seca ( $\text{UI}\cdot\text{g}^{-1}$ ).

### **2.5.2. Determinación de la actividad lignino peroxidásica**

La actividad lignino peroxidásica fue medida espectrofotométricamente (Tien y Kirk, 1984; Villa, 2007). En un tubo de ensayo de 10 mL se colocaron 0,5 mL de extracto enzimático y se agregaron 0,015 mL de una solución de alcohol veratrílico al 20% en volumen, 9,4 mL de una solución de tartrato de sodio 0,15 M (pH = 3,0), 0,1 mL de una solución de Tween 80 al 10% en volumen y se inició la reacción al añadir 0,02 mL de una solución de peróxido de hidrógeno al 10% en volumen. El volumen final de reacción fue de 10 mL. La mezcla se dejó reaccionar en un baño maría a 30 °C, por 60 min.

Se realizaron pruebas previas de determinación del tiempo de reacción del extracto enzimático con el sustrato, entre 10 y 60 min. El tiempo de 60 min es el que permitió obtener lecturas apreciables de absorbancia para los ensayos, por lo que se decidió trabajar con este tiempo de reacción, ya que en tiempos anteriores a los 60 minutos, las lecturas de absorbancia fueron cero o valores negativos.

Para cada muestra se preparó un blanco, sin la adición del peróxido de hidrógeno. De cada muestra y blanco, correspondiente, se leyó la absorbancia a 310 nm.

Se determinó concentración de sustrato oxidado mediante la ley de Labert-Beer con un  $\epsilon = 9300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . La actividad enzimática se reportó en Unidades Internacionales (UI), definidas como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato por min, en las condiciones de la reacción. Para cada fermentación la actividad se expresó en UI por g de materia seca ( $\text{UI}\cdot\text{g}^{-1}$ )

## **2.6. DETERMINACIÓN DE LOS PERÍODOS DE MAYOR GENERACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS**

Se realizó una primera corrida experimental de fermentación en la cual se obtuvieron valores únicamente de actividad celulolítica, debido a que los métodos para medir las actividades lignino peroxidásica y manganeso peroxidásica estaban en período de prueba y desarrollo. Esta primera corrida fue más corta que las segunda y tercera corrida, porque no hubo fundas suficientes para terminar los análisis. Se realizaron una segunda y tercera corrida de fermentación para la obtención de datos de las tres actividades enzimáticas. Durante la segunda y tercera corrida se consiguió analizar las actividades enzimáticas hasta la segunda cosecha del hongo.

Se muestrearon dos fundas de cada cepa de hongo dos veces por semana, y se extrajo el extracto enzimático según lo descrito en el subcapítulo 2.3.5. Se midieron las absorbancias de las muestras según lo descrito en los subcapítulos 2.4 y 2.5. Se realizaron los ensayos de determinación de actividad enzimática en

paralelo con las dos muestras obtenidas para cada cepa. Se obtuvo dos valores de absorbancia para cada ensayo y se reportó un promedio para cada día de muestreo.

Para cada ensayo de determinación de actividad enzimática se graficaron los valores de absorbancia en relación al tiempo, durante el proceso de fermentación. En cada gráfico se compararon las tendencias de cada corrida de fermentación para evaluar la repetibilidad y reproducibilidad de los resultados. Adicionalmente, mediante este gráfico, se determinaron los picos de máximo valor de absorbancia.

Para cada cepa de hongo, se calcularon las actividades enzimáticas, de cada día de muestreo, con el promedio de absorbancia. Para la segunda y tercera corrida de fermentación, se elaboró un gráfico para cada cepa de hongo. Se graficaron las tres actividades enzimáticas calculadas en relación al tiempo, para poder determinar la actividad enzimática que presenta un mayor valor comparada con las otras, y sus tendencias respecto al tiempo de fermentación.

Para la determinación de los períodos de mayor generación de las actividades enzimáticas, se comparó la cinética de generación de cada actividad enzimática y sus valores máximos de generación, con los períodos de crecimiento del micelio y fructificación, así como los días de cosecha de cada cepa de hongos. El período de desarrollo del micelio se estableció como el período comprendido entre la siembra del hongo hasta el apareamiento de pequeños cuerpos fructíferos. El período de fructificación se determinó como el período comprendido entre el apareamiento de los primeros cuerpos fructíferos y los días de la cosecha del hongo.

Los rendimientos biológicos del hongo se determinan dividiendo el peso del hongo cosechado de cada funda, para el peso de rastrojo de maíz seco en esa funda. Este resultado se expresó en porcentaje. Se reportó, para cada hongo, un promedio de los rendimientos biológicos de todas las fundas cosechadas para cada corrida.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL RASTROJO DE MAÍZ UTILIZADO EN LA FERMENTACIÓN

Los resultados de la caracterización química del rastrojo de maíz realizada en el Laboratorio de Pulpa y Papel de la Escuela Politécnica Nacional, se muestran en la Tabla 3.1.

**Tabla 3.1.** Caracterización del rastrojo de maíz utilizado en la fermentación

Analito	Resultados (%)
Humedad para análisis	9,86
Resinas, ceras y grasas	9,52
Celulosa	41,60
Lignina	18,44

(Resultados proporcionados por el Laboratorio de Pulpa y Papel, EPN, Anexo V)

El rastrojo de maíz tiene un contenido alto de lignina y celulosa, por lo que es considerado un residuo agroindustrial lignocelulósico, ideal para la fermentación en medio sólido del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*, que es un hongo de pudrición blanca que degrada la lignina y la celulosa. Los hongos de pudrición blanca como el *Pleurotus ostreatus* degradan en primer lugar la lignina presente en la pared celular y dejan un tejido de color blanco compuesto principalmente de celulosa.

La lignina y celulosa presentes en el sustrato son utilizadas como fuentes de carbono por el hongo después de ser degradadas. Al tener un alto contenido de lignina y celulosa, el rastrojo de maíz constituye una fuente de carbono que garantiza el desarrollo y crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus*.

El contenido de celulosa del rastrojo de maíz, utilizado en la fermentación, es superior al contenido de lignina del mismo, por lo cual se espera una mayor

generación enzimática para la actividad celulolítica, en comparación con la actividad manganeso peroxidásica y lignino peroxidásica que son específicas en la degradación de la lignina.

El hongo *Pleurotus ostreatus* requiere un contenido de humedad en el sustrato entre el 50 y 80 %, como se expone en el subcapítulo 1.1.2.3. Debido a que el rastrojo de maíz seco analizado presenta un contenido de humedad de 9,86%, que es muy bajo para el crecimiento del hongo, es necesario hidratarlo mediante cocción en agua a ebullición.

Con la cocción en agua en ebullición se consigue además de hidratar el sustrato una esterilización del mismo. De esta manera se evita que otros microorganismo presentes en el rastrojo de maíz crezcan junto con el *Pleurotus ostreatus* y se garantiza que los resultados obtenidos sean generados exclusivamente por el hongo *Pleurotus ostreatus*.

Con base en los resultados obtenidos de contenido de lignina y celulosa en la caracterización química del sustrato, se determinó que el rastrojo de maíz que proviene de la ciudad de Atuntaqui, provincia de Imbabura, es ideal como sustrato para el cultivo del hongo *Pleurotus ostreatus*, pero es necesario incrementar el contenido de humedad mediante cocción en agua caliente.

### **3.2. PERÍODOS DE DESARROLLO Y COSECHA DEL HONGO COMESTIBLE**

Los períodos de crecimiento del micelio y de fructificación de las dos cepas de hongo comestible *Pleurotus ostreatus*, así como los días de cosecha con su respectivo rendimiento biológico se muestran en las Tablas 3.2 y 3.3.

En el subcapítulo 2.6, se muestra la forma de definición de los períodos de desarrollo del micelio, fructificación y cosecha del hongo.

**Tabla 3.2.** Períodos de tiempo en el crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* 404, tiempos de cosecha y rendimientos biológicos obtenidos para las dos corridas de fermentación

PARÁMETRO	Tiempo (días)	
	SEGUNDA CORRIDA	TERCERA CORRIDA
Período de crecimiento del micelio	0 – 19	0 - 20
Período de fructificación	19 - 39	20 - 35
Primera cosecha	22	20
Rendimiento biológico (g hongo/100 g rastrojo seco)	58,76	59,23
Segunda cosecha	29	31
Rendimiento biológico (g hongo/100 g rastrojo seco)	52,92	52,02

**Tabla 3.3.** Períodos de tiempo en el crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* 2171, tiempos de cosecha y rendimientos biológicos obtenidos para las dos corridas de fermentación

PARÁMETRO	Tiempo (días)	
	SEGUNDA CORRIDA	TERCERA CORRIDA
Período de crecimiento del micelio	0 – 19	0 - 20
Período de fructificación	19 - 39	20 - 35
Primera cosecha	29	28
Rendimiento biológico (g hongo/100 g rastrojo seco)	59,61	55,67
Segunda cosecha	39	35
Rendimiento biológico (g hongo/100 g rastrojo seco)	50,63	46,85

Para las dos cepas de hongos, el período de crecimiento del micelio dura aproximadamente 20 días, después de los cuales los hongos pasan a la cámara clara-oscura para dar inicio al período de fructificación. Se observa que los días de primera y segunda cosecha se dan en menor tiempo para la cepa 404 en comparación con la 2171. El rendimiento biológico obtenido para ambas cepas de *Pleurotus ostreatus* es similar, por lo que en cuanto a la obtención de cuerpos

fructíferos no existe una diferencia significativa entre la cepa 404 y la 2171. Se observa que los períodos de crecimiento del micelio y fructificación tienen una duración similar entre sí para la segunda y tercera corrida, y que los días de cosecha para ambas corridas se presentan en el mismo intervalo de tiempo. Esto indica que los resultados pueden ser reproducidos.

El tiempo de fermentación y el rendimiento biológico de las cepas dependen principalmente de la composición del rastrojo de maíz utilizado como sustrato, de las condiciones de temperatura y humedad de la cámara de cultivo, del tamaño de las fundas y de la cepa de *Pleurotus ostreatus* (Garzón y Cuervo, 2008; Pazos, 2004). Debido a que el rastrojo de maíz y el tamaño de las fundas fueron los mismos para todas las corridas de fermentación realizadas, y que se mantuvieron las mismas condiciones de temperatura, humedad y aireación en la cámara, las diferencias en tiempo de fermentación y rendimiento biológico se deben principalmente a la cepa de hongo utilizada. Para las dos cepas el tiempo de crecimiento del micelio es el mismo, lo que indica que las dos cepas de hongo se adaptan de igual manera al medio y a las condiciones ambientales de la cámara de cultivo. La cepa 404 se diferencia de la 2171 porque los cuerpos fructíferos se desarrollan de manera más rápida, lo que nos indica que esta cepa degrada más rápido el sustrato, para utilizar la lignina y celulosa presentes como fuente de carbono para el crecimiento del cuerpo fructífero.

Trabajos previos, realizados por Flores (2005) y Pazos (2004) para el cultivo del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* en rastrojo de maíz, muestran períodos de desarrollo del hongo comestible y resultados de rendimientos biológicos similares a los obtenidos en el presente trabajo. Estos trabajos se realizaron mediante fermentación en medio sólido en fundas plásticas de 17,78 x 25,40 cm (7 x 10 pulgadas), las mismas que se utilizaron en el presente trabajo. Flores (2005) y Pazos (2004) trabajaron con la cepa de *Pleurotus ostreatus* 2171. Flores (2005) obtuvo rendimientos biológicos de aproximadamente el 41% con un tiempo de fermentación de 22 días, y Pazos (2004) obtuvo rendimientos biológicos de aproximadamente 53% en tiempos de fermentación de 46 días. Las variaciones en los porcentajes de rendimiento biológico y tiempo de fermentación se deben

principalmente a la cepa de hongo usada y al rastrojo de maíz utilizado, ya que las condiciones de fermentación utilizadas en los trabajos previos, son las mismas que las utilizadas en el presente trabajo.

### **3.3. DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS**

La determinación de las actividades enzimáticas estudiadas se realizó mediante métodos espectrofotométricos de medición de la absorbancia. Se presenta un estudio comparativo de los valores de absorbancia medidos para las tres actividades enzimáticas a diferentes tiempos durante el período de fermentación.

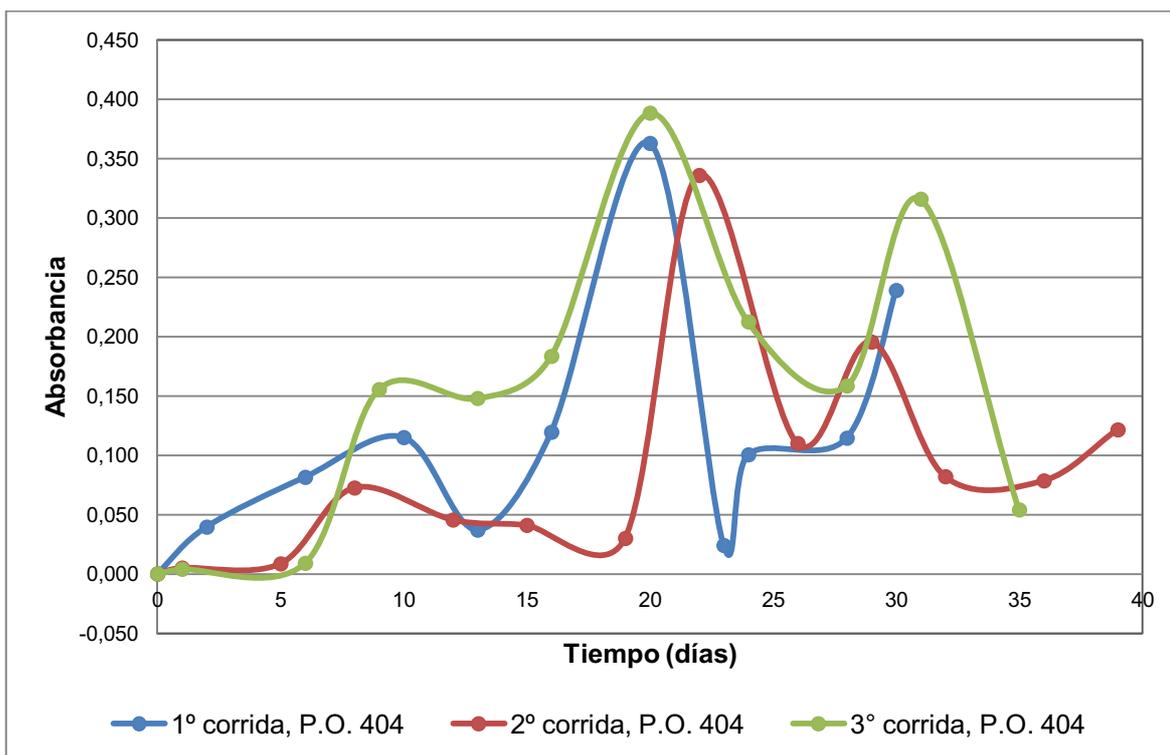
Se muestran los resultados de las absorbancias medidas para los tres ensayos de determinación de actividades enzimáticas: celulolítica, manganeso peroxidásica y lignino peroxidásica, durante la fermentación de rastrojo de maíz, con las dos cepas de hongo *Pleurotus ostreatus* 404 y 2171.

Se obtuvieron valores experimentales de absorbancia en el tiempo, durante el período de fermentación con cada una de las cepas. Para la primera corrida de fermentación realizada, solo se obtuvo datos para el ensayo de determinación de actividad celulolítica, como se explica en el subcapítulo 2.6. Para la segunda y tercera corrida se obtuvieron datos para las tres actividades enzimáticas.

#### **3.3.1. ENSAYO DE ACTIVIDAD CELULOLÍTICA**

En la Figura 3.1 se presentan los resultados de absorbancia, obtenidos en el ensayo de actividad celulolítica, para la cepa de *Pleurotus ostreatus* 404. Los valores de absorbancia, respecto al tiempo de fermentación, presentan una tendencia similar entre sí para las tres corridas de fermentación, con una tendencia creciente en la etapa de crecimiento del micelio, un primer pico máximo en la primera cosecha, una disminución después de la cosecha y un segundo pico en la segunda cosecha.

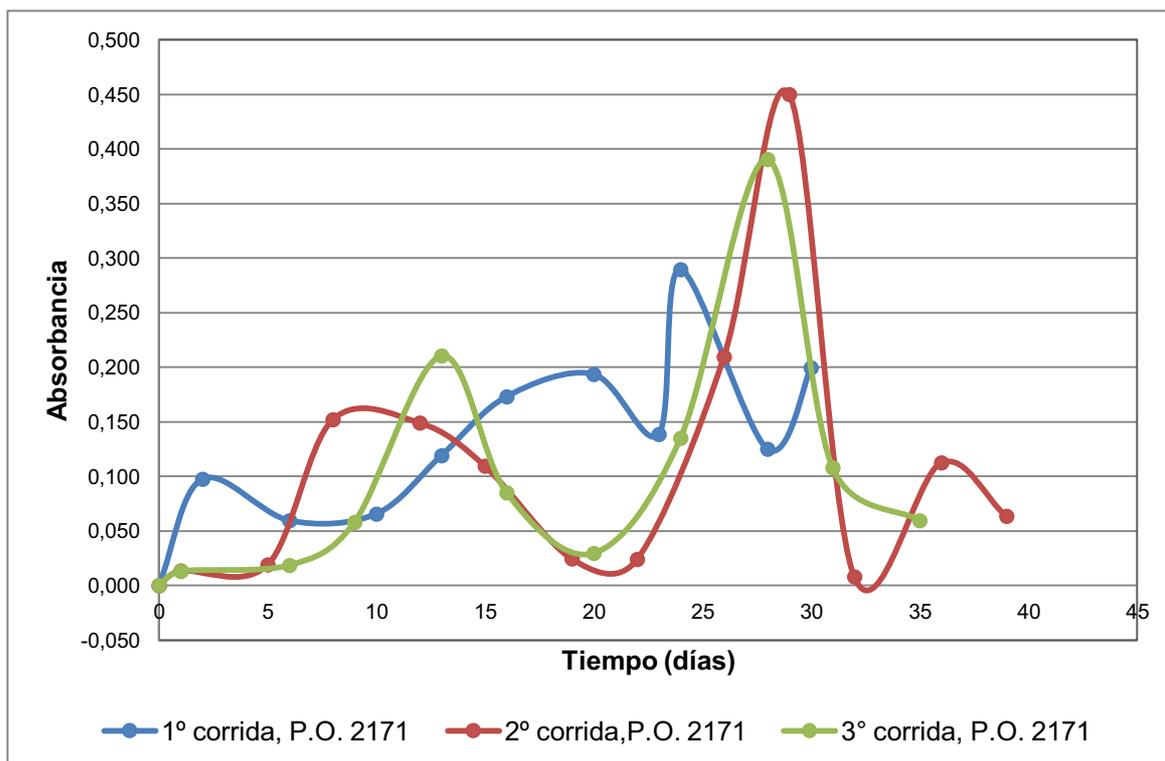
Para la primera corrida se obtiene un pico máximo de absorbancia en la primera cosecha de 0,363 y un segundo pico de 0,239. En la segunda corrida el pico máximo de absorbancia es de 0,336 y el segundo pico de 0,196. Para la tercera corrida se consiguió un pico máximo de 0,389 y un segundo pico de 0,316 de absorbancia.



**Figura 3.1.** Valores de absorbancia obtenidos a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad celulolítica para las tres corridas de fermentación en rastrojo de maíz de la cepa de *Pleurotus ostreatus* 404

Para la cepa de *Pleurotus ostreatus* 404, el pico máximo de absorbancia se obtiene entre el día 20 y 22 de iniciada la fermentación. El segundo pico de absorbancia se obtiene entre el día 29 al día 31 de iniciada la fermentación.

En la Figura 3.2 se muestra la variación de la absorbancia con el tiempo de fermentación para la cepa de *Pleurotus ostreatus* 2171. Esta variación en la primera corrida es creciente de una manera irregular, a diferencia de la segunda y tercera corridas que presentan una tendencia similar de variación, entre sí, durante el período de fermentación.



**Figura 3.2.** Valores de absorbancia obtenidos a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad celulolítica para las tres corridas de fermentación en rastrojo de maíz de la cepa de *Pleurotus ostreatus 2171*

La cepa 2171 presenta un primer pico de absorbancia, entre los 8 y 13 días, de fermentación, que es una etapa previa a la fructificación, después presenta un decremento de la absorbancia hasta obtener un pico máximo de absorbancia en la primera cosecha del hongo, entre los 28 y 29 días de iniciada la fermentación.

Para la primera corrida, se obtiene un pico máximo de absorbancia en la primera cosecha de 0,290. En la segunda corrida el pico máximo de absorbancia es de 0,450 y para la tercera corrida se consiguió un pico máximo de 0,391.

Estudios realizados por Khalil *et al.* (2011) y Kurt y Buyukalaca (2010) muestran un pico máximo en la generación de celulasas en el décimo día de fermentación, en medio sólido, en varios sustratos como bagazo de caña, paja de trigo y madera para los hongos comestibles *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus sajor-caju*. Sin embargo, un estudio realizado por Ghosh *et al.* (1998) que utilizó biomasa lignocelulósica como sustrato para la fermentación, en medio sólido, reporta que

la máxima actividad de enzimas lignocelulolíticas se da entre los días 16 y 24 de fermentación. Reddy *et al.* (2003) encontró la máxima actividad enzimática para celulasas en el día 20 de fermentación en medio sólido al utilizar biomasa de hojas para los hongos comestibles *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus sajor-caju*.

Con base en estos estudios previos, los tiempos de fermentación en los que se obtiene la máxima actividad enzimática varían con el sustrato utilizado en la fermentación en medio sólido y con la cepa de hongo utilizada. Estos tiempos varían entre 10 y 24 días. En este estudio realizado en rastrojo de maíz la máxima actividad enzimática se da entre los días 20 y 22 para la cepa 404 de *Pleurotus ostreatus* y en los días 28 y 29 para la cepa 2171.

Esto indica que, al utilizar sustratos como bagazo de caña, paja de arroz y madera, la máxima generación de la actividad celulolítica se consigue en un menor tiempo, en comparación con los casos en que se utiliza biomasa de hojas o rastrojo de maíz. Todos estos sustratos son materiales lignocelulósicos, pero el contenido de lignina y celulosa varía de sustrato en sustrato. Debido a que el contenido de lignina y celulosa influye directamente en la actividad enzimática, se obtienen tiempos de fermentación diferentes en los que se alcanza la máxima actividad celulolítica. Principalmente, la diferencia entre los tiempos de fermentación se da por el tiempo que le toma al hongo adaptarse al sustrato y generar las enzimas necesarias para su desarrollo y crecimiento.

Los estudios realizados por Khalil *et al.* (2011), Kurt y Buyukalaca (2010), Ghosh *et al.* (1998) y Reddy *et al.* (2003) muestran una tendencia creciente a medida que avanza el proceso de fermentación, con un pico máximo y una posterior disminución de la actividad enzimática. Esta misma tendencia se observa en el presente estudio para ambas cepas de *Pleurotus ostreatus*, con una variación en los días de máxima actividad enzimática.

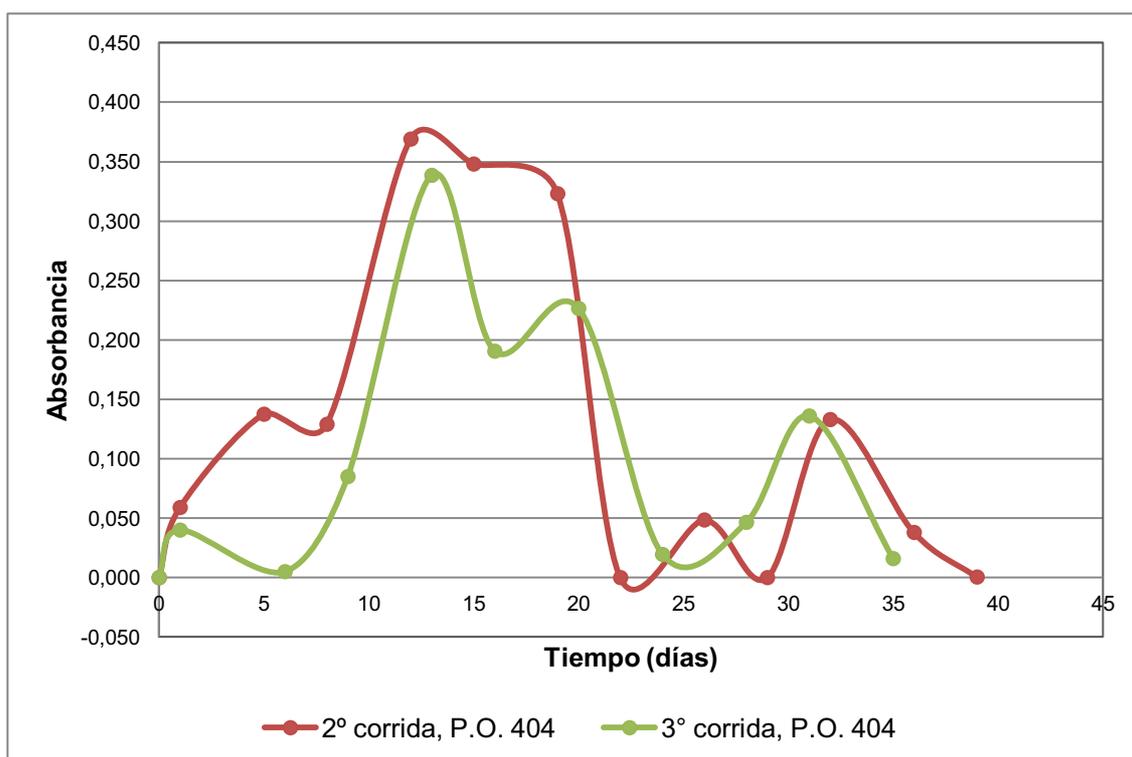
A pesar de tener una variación en los días de máxima generación de actividad celulolítica, la tendencia de generación se repite. Esto indica que la generación de la actividad celulolítica está relacionada con el crecimiento y desarrollo del hongo,

y no se genera arbitrariamente, sino que se genera en períodos específicos durante la fermentación, siguiendo una tendencia determinada.

### 3.3.2. ENSAYO DE ACTIVIDAD MANGANESO PEROXIDÁSICA

Para la cepa de *Pleurotus ostreatus* 404, los valores de absorbancia obtenidos en el ensayo de actividad manganeso peroxidásica, para las dos corridas de fermentación realizadas, presentan una tendencia similar entre sí en relación al tiempo de fermentación. Estos resultados se muestran en la Figura 3.3.

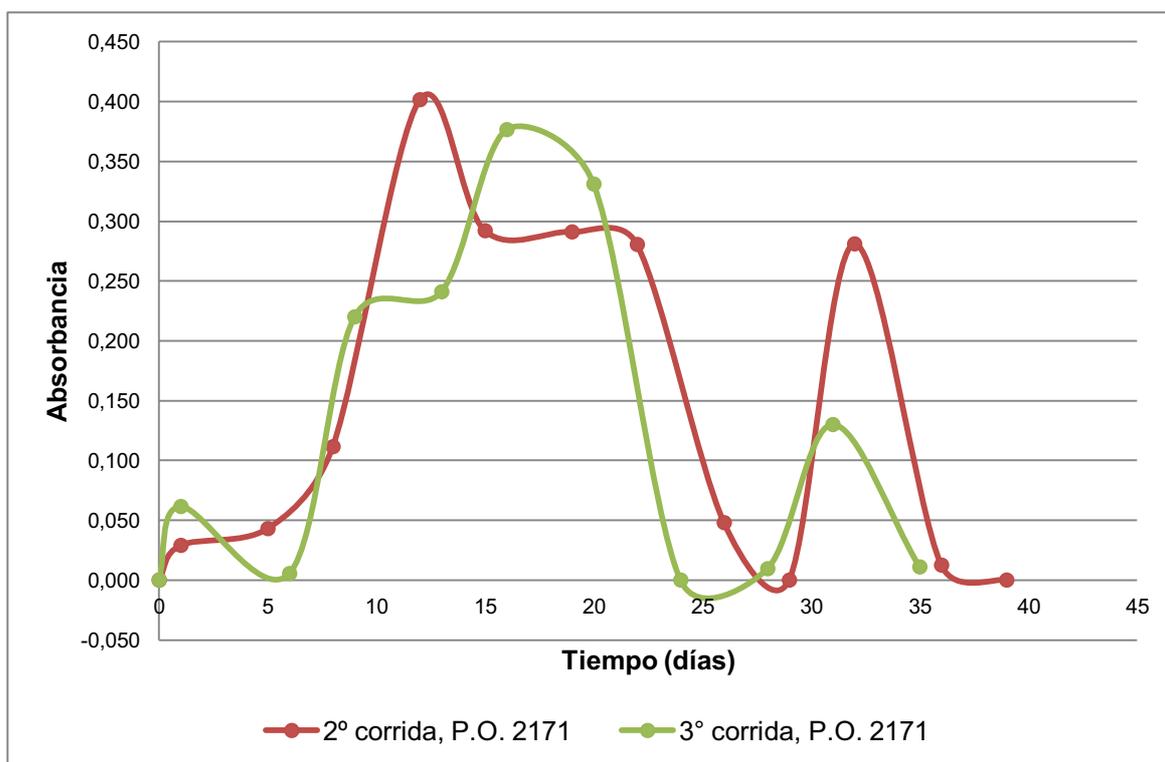
La tendencia es creciente aproximadamente en los 12 primeros días de fermentación, en donde se alcanzan los valores máximos de absorbancia, 0,369 para la segunda corrida y 0,339 para la tercera.



**Figura 3.3.** Valores de absorbancia obtenidos a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad manganeso peroxidásica para las dos corridas de fermentación en rastrojo de maíz de la cepa de *Pleurotus ostreatus* 404

Los valores de absorbancia se mantienen altos hasta los 20 días de iniciada la fermentación, que es cuando comienza la etapa de fructificación. En los días de la cosecha, la absorbancia disminuye hasta alcanzar valores cercanos a cero, y vuelve a aumentar a los 30 días de fermentación aproximadamente, cuando se tiene la segunda cosecha. Después de la segunda cosecha la absorbancia vuelve a disminuir hasta alcanzar valores cercanos a cero.

Para la cepa 2171, se observa en la Figura 3.4, que la tendencia es similar a la presentada por la cepa 404. La tendencia es creciente entre los 10 y 12 primeros días de fermentación, se mantienen valores altos hasta la etapa previa a la primera cosecha del hongo, donde disminuye hasta valores cercanos a cero en los días 28 y 29 de fermentación, que son los días de cosecha del hongo. Se tiene un pico de absorbancia entre los días 30 y 35 de fermentación, después de los cuales la absorbancia disminuye hasta alcanzar valores que tienden a cero.



**Figura 3.4.** Valores de absorbancia obtenidos a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad manganeso peroxidásica para las dos corridas de fermentación en rastrojo de maíz de la cepa de *Pleurotus ostreatus* 2171

Un estudio realizado por Gupte *et al.* (2007) muestra que la máxima actividad enzimática se da en el décimo día de iniciada la fermentación en medio sólido con paja de trigo como sustrato para el hongo comestible *Pleurotus ostreatus*. La actividad enzimática en este estudio aumenta progresivamente hasta el día 10 de fermentación, donde se mantiene en valores altos hasta el día 20 aproximadamente, con las cepas de *Pleurotus ostreatus* 404 y 2171.

Quintero *et al.* (2006) realizó un estudio de fermentación en medio sólido con rastrojo de maíz como sustrato para el crecimiento del hongo *Phanerochaete chrysosporium* donde se muestra que de igual manera la actividad enzimática manganeso peroxidásica aumenta hasta el décimo día de fermentación y se mantiene en valores altos hasta el vigésimo día de fermentación. Tanto el *Pleurotus ostreatus* como el *Phanerochaete chrysosporium*, son hongos de pudrición blanca, que degradan en primer lugar la lignina dejando un tejido blanco compuesto de celulosa principalmente.

Con base en estos estudios previos se puede deducir que se obtienen tendencias similares en la generación de extractos con actividad manganeso peroxidásica comparables con los obtenidos en el presente estudio.

Para el caso de la actividad manganeso peroxidásica, la tendencia de generación con el tiempo de fermentación del sustrato, se mantiene independientemente del sustrato o el hongo utilizado. Esto indica que la actividad manganeso peroxidásica tiene su principal influencia en los primeros días de fermentación mientras el hongo se adapta al sustrato.

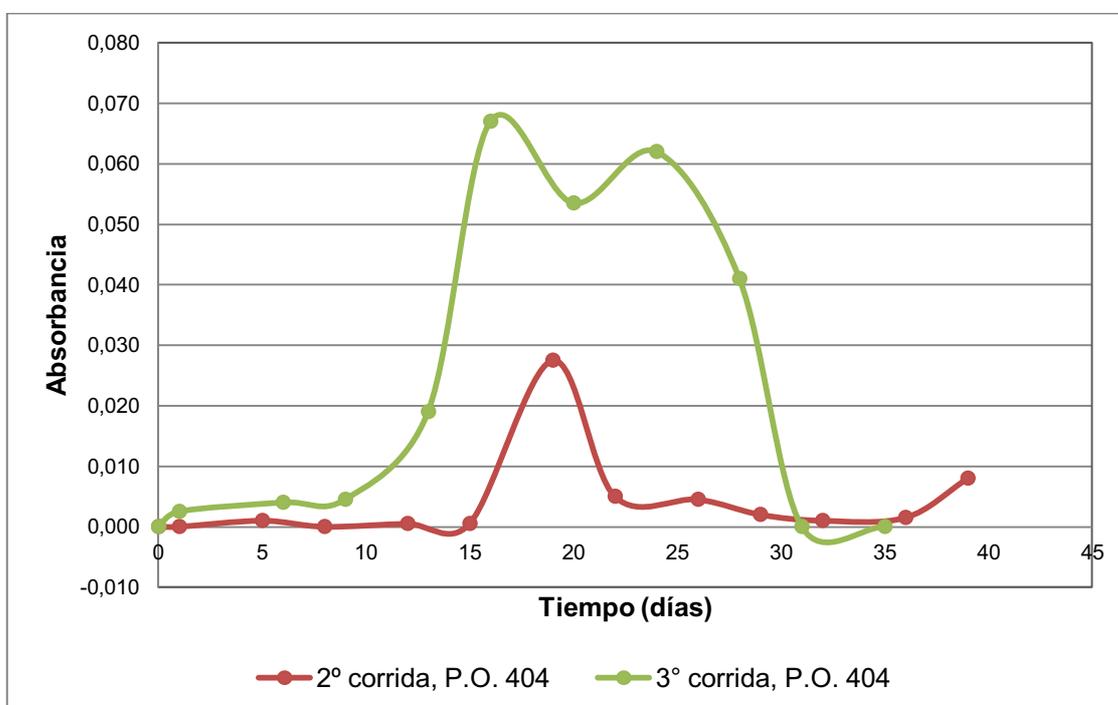
### **3.3.3. ENSAYO DE ACTIVIDAD LIGNINO PEROXIDÁSICA**

En la Figura 3.5 y en la 3.6 se muestran resultados de absorbancia medida en el ensayo de actividad lignino peroxidásica en relación al tiempo de fermentación, durante la segunda y tercera corrida de fermentación con las cepas de hongo *Pleurotus ostreatus* 404 y 2171 respectivamente.

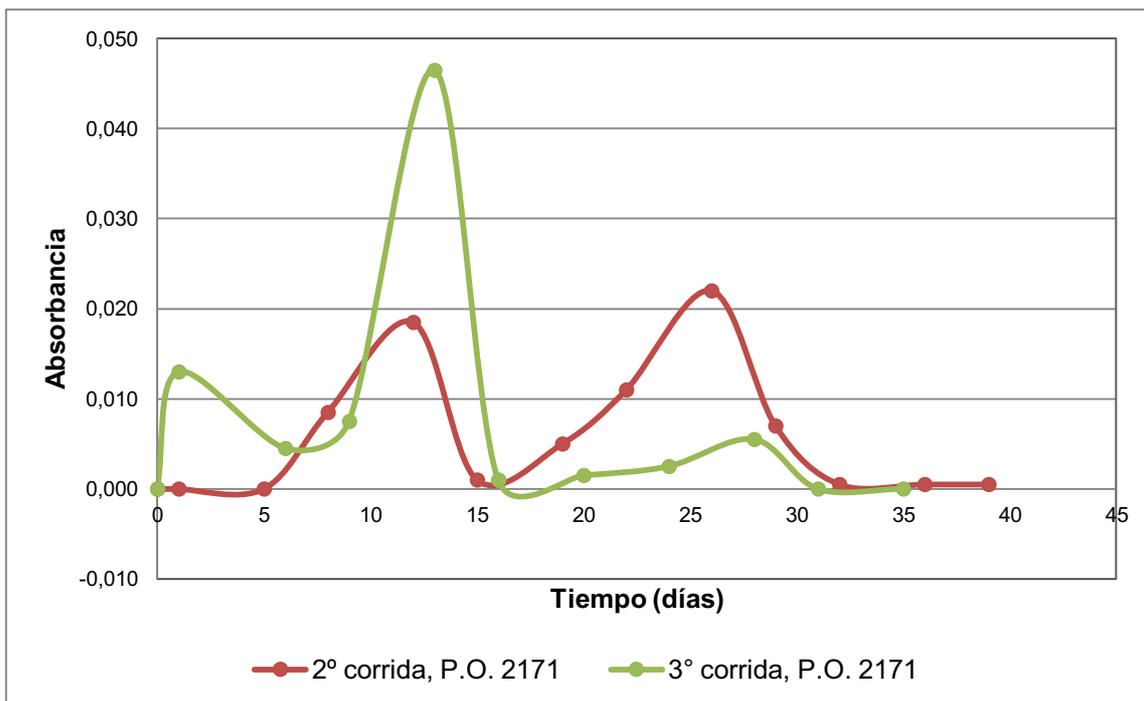
No se observa una tendencia definida en la variación de la absorbancia durante las dos corridas de fermentación realizadas para las dos cepas de *Pleurotus ostreatus* estudiadas. Se observan algunos picos de absorbancia pero que no guardan relación con los periodos de crecimiento, fructificación y cosecha del hongo. Estos valores dispersos no permiten establecer una tendencia definida en el comportamiento de la absorbancia durante el tiempo de fermentación.

Para las dos cepas de *Pleurotus ostreatus* estudiadas, los valores de absorbancia medidos son cero y valores cercanos a cero, lo que indica que estas cepas de hongos no presentan una actividad lignino peroxidásica significativa.

En trabajos realizados por Guillén-Navarro *et al.* (1998) y Vyas y Molitoris (1995) se estudió la obtención de extractos con actividad enzimática ligninolítica en sustrato líquido y en sustrato sólido con paja para obtener el hongo comestible *Pleurotus ostreatus*, sin detectar actividad enzimática lignino peroxidasa en ninguna de las condiciones.



**Figura 3.5.** Valores de absorbancia obtenidos a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad lignino peroxidásica para las dos corridas de fermentación en rastrojo de maíz de la cepa de *Pleurotus ostreatus* 404



**Figura 3.6.** Valores de absorbancia obtenidos a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad lignino peroxidásica para las dos corridas de fermentación en rastrojo de maíz de la cepa de *Pleurotus ostreatus 2171*

### 3.4. DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE GENERACIÓN DE EXTRACTOS CON ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

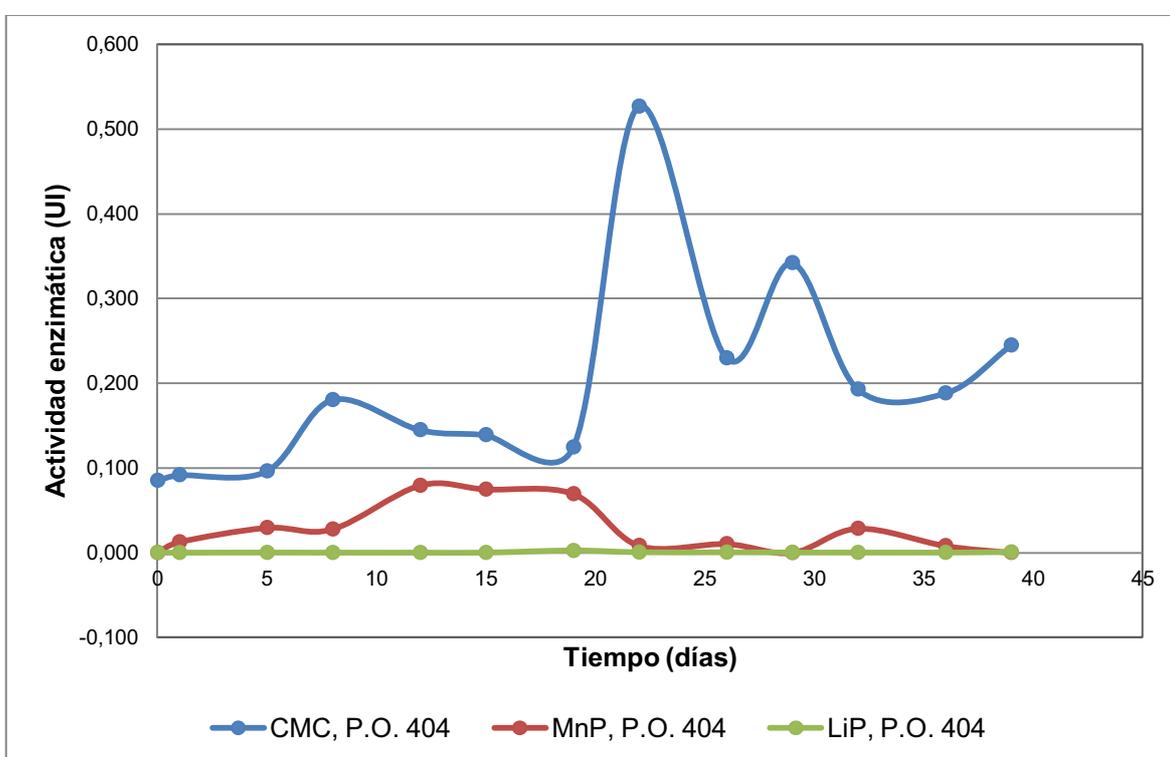
Para la determinación de la cinética de generación de las actividades enzimáticas, se analizaron la segunda y tercera corrida de fermentación de los hongos *Pleurotus ostreatus 404* y *2171* en rastrojo de maíz.

La actividad enzimática fue expresada en UI (Unidades Internacionales), definidas como un  $\mu\text{mol}$  de producto generado o de sustrato oxidado por min y por g de rastrojo de maíz seco. Los valores de actividades enzimáticas calculados, se muestran en gráficos en relación al tiempo de fermentación de cada cepa.

#### 3.4.1. ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA SEGUNDA CORRIDA DE FERMENTACIÓN

En la Figura 3.7 se muestran los valores de las actividades enzimáticas calculadas para la cepa de *Pleurotus ostreatus* 404 a diferentes tiempos durante la fermentación en rastrojo de maíz en la segunda corrida de fermentación.

La actividad enzimática más alta es la actividad celulolítica, seguida de la actividad manganeso peroxidásica y por último la lignino peroxidásica, que presenta una tendencia con valores cercanos a cero, sin variaciones apreciables a través del tiempo.



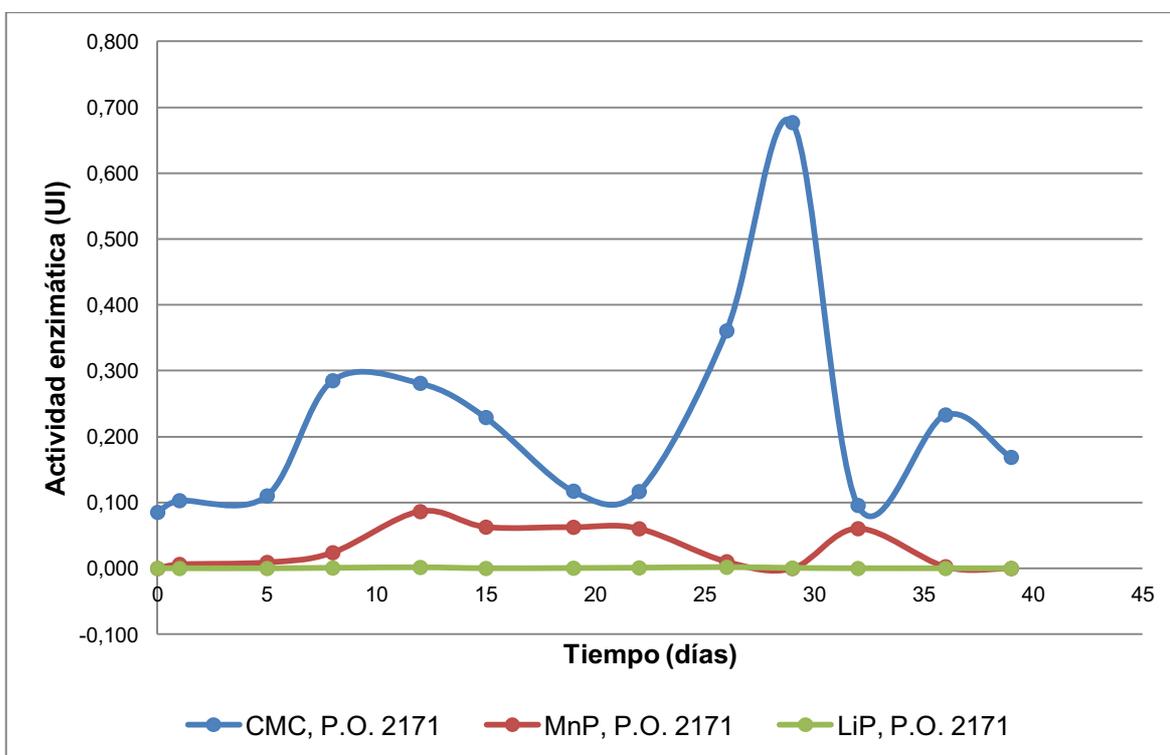
**Figura 3.7.** Actividades enzimáticas celulolítica (CMC), manganeso peroxidásica (MnP) y lignino peroxidásica (LiP) obtenidas a diferentes tiempos para la segunda corrida de fermentación en rastrojo de maíz de la cepa de *Pleurotus ostreatus* 404

Al comparar la tendencia de las actividades enzimáticas celulolítica y manganeso peroxidásica, se observa que en los primeros 12 días de fermentación hay una tendencia creciente en ambas actividades, entre los días 12 y 20 de fermentación, la actividad manganeso peroxidásica llega a sus máximos valores, mientras que la actividad celulolítica tiende a disminuir, hasta que en el día 22, que es el día de la primera cosecha del hongo, se da la máxima generación de la actividad

celulolítica, al mismo tiempo la actividad manganeso peroxidásica disminuye hasta valores cercanos a cero.

Se da un segundo pico de actividad celulolítica en el día 29 de la segunda cosecha del hongo, después del cual la actividad celulolítica disminuye, mientras que la actividad manganeso peroxidásica aumenta después de la segunda cosecha. Al final del período de fermentación, la actividad manganeso peroxidásica disminuye y tiende a cero, mientras que la actividad celulolítica se mantiene en un valor de 0,245 UI.

Los valores de actividades enzimáticas obtenidos para la cepa de *Pleurotus ostreatus* 2171 presentan una tendencia similar que para la cepa 404, ya que los períodos de mayor generación de la actividad manganeso peroxidásica coinciden con los de menor generación de la actividad celulolítica, y viceversa. Estas tendencias se muestran en la Figura 3.8.



**Figura 3.8.** Actividades enzimáticas celulolítica (CMC), manganeso peroxidásica (MnP) y lignino peroxidásica (LiP) obtenidas a diferentes tiempos para la segunda corrida de fermentación en rastrojo de maíz de la cepa de *Pleurotus ostreatus* 2171

La diferencia con la cepa 404, es que la etapa de cosecha de la cepa 2171 se da días después que la cosecha del hongo 404, por lo que los períodos de máxima y mínima generación se dan más tarde para esta cepa.

No se observa la presencia de actividad lignino peroxidásica, ni variaciones apreciables durante el tiempo de fermentación. Se observa que en los primeros 12 días de fermentación hay una tendencia creciente en las dos actividades, entre los días 12 y 22 de fermentación, la actividad manganeso peroxidásica llega a sus máximos valores, mientras que la actividad celulolítica disminuye hasta un valor mínimo. Entre el día 22 y el día 29, que es el día de la primera cosecha del hongo, la actividad manganeso peroxidásica llega a sus mínimos valores, los cuales tienden a cero, mientras que la actividad celulolítica aumenta y alcanza su máximo valor el día 29 que es el día de la primera cosecha.

Se da un segundo pico máximo de actividad manganeso peroxidásica en el día 31, que coincide con una disminución de la actividad celulolítica. Al final del período de fermentación, la actividad manganeso peroxidásica disminuye y tiende a cero, mientras que la actividad celulolítica se mantiene en un valor de 0,169 UI.

Para la cepa 404 los valores de actividad enzimática celulolítica varían entre 0,085 UI hasta el máximo de 0,527 UI alcanzado en el día 22 de fermentación. Para la cepa 2171 el valor mínimo de actividad enzimática es 0,085 UI y el valor máximo obtenido es de 0,677 UI en el día 29 de fermentación.

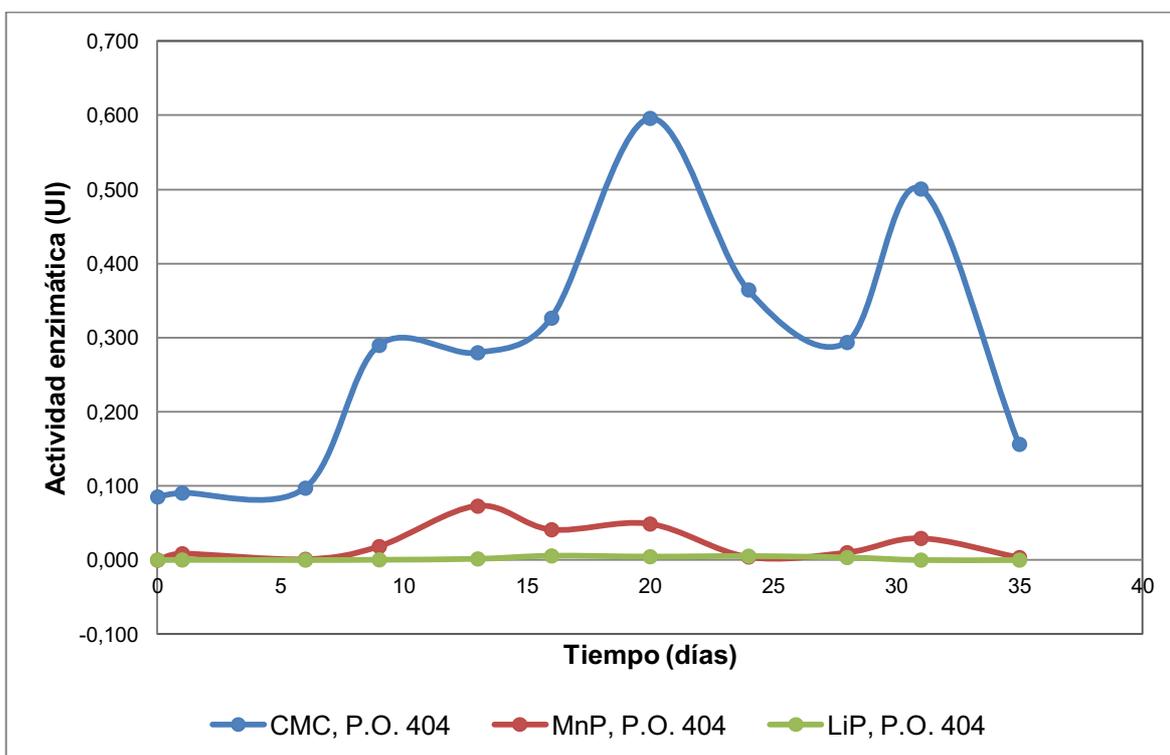
Para la cepa de *Pleurotus ostreatus* 404 los valores de actividad enzimática manganeso peroxidásica varían entre 0,000 UI hasta el máximo de  $7,93 \times 10^{-2}$  UI obtenido en el día 12 de fermentación. Para la cepa 2171 el valor mínimo de actividad enzimática es 0,000 UI y el valor máximo obtenido es de  $8,63 \times 10^{-2}$  UI alcanzado en el día 12 de fermentación.

Para la cepa de *Pleurotus ostreatus* 404 los valores de actividad enzimática lignina peroxidásica varían entre 0,000 UI hasta el máximo de  $2,33 \times 10^{-3}$  UI obtenido en el día 19 de fermentación. Para la cepa 2171 el valor mínimo de

actividad enzimática es 0,000 UI y el valor máximo obtenido es de  $1,86 \times 10^{-3}$  UI alcanzado en el día 26 de fermentación.

### 3.4.2. ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA TERCERA CORRIDA DE FERMENTACIÓN

La variación de las actividades enzimáticas calculadas para la cepa 404 en la tercera corrida de fermentación se muestra en la Figura 3.9. La actividad lignino peroxidásica muestra una tendencia con valores que tienden a cero. La máxima actividad enzimática es la actividad celulolítica, seguida de la actividad manganeso peroxidásica.



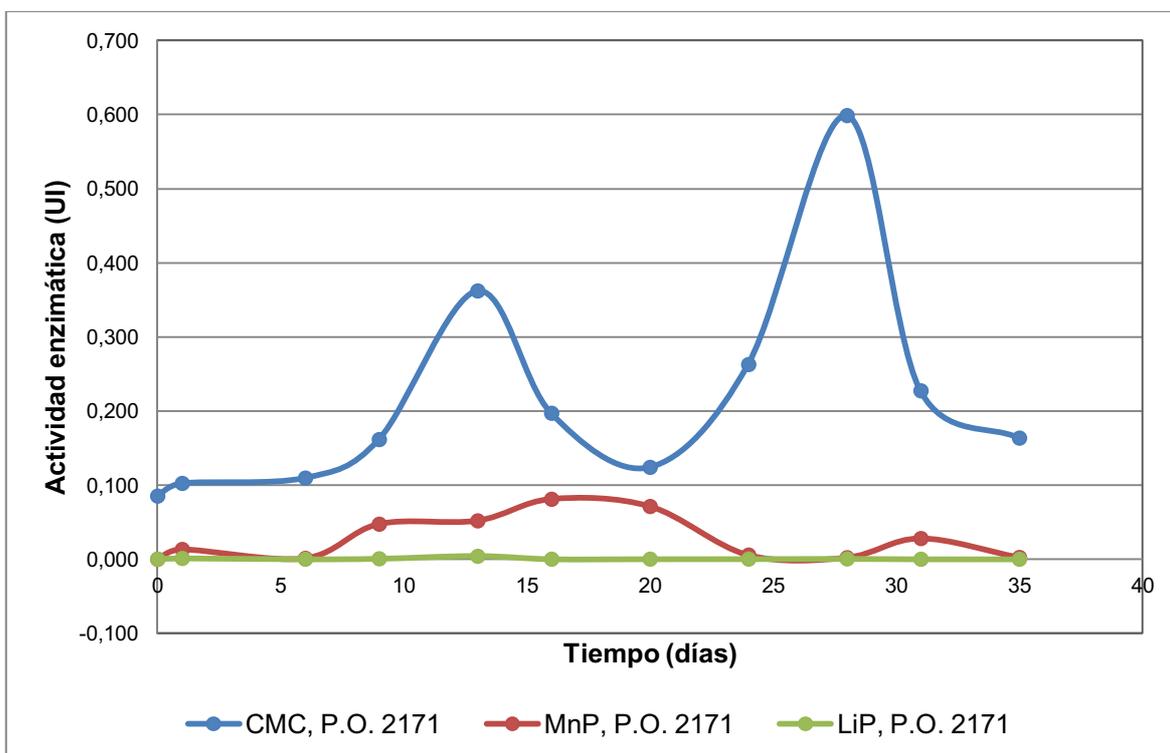
**Figura 3.9.** Actividades enzimáticas celulolítica (CMC), manganeso peroxidásica (MnP) y lignino peroxidásica (LiP) obtenidas a diferentes tiempos para la tercera corrida de fermentación en rastrojo de maíz de la cepa de *Pleurotus ostreatus* 404

La actividad celulolítica presenta un aumento durante el período de crecimiento del micelio, hasta llegar a un máximo el día 20, que es el día de la primera cosecha, seguido de una disminución hasta el día 28, donde se produce un nuevo

aumento de la actividad hasta el día 31 donde se tiene un segundo pico, que corresponde al día de la segunda cosecha de este hongo. El día 35 donde se acaba la fermentación, el valor de la actividad celulolítica es de 0,156 UI.

La actividad manganeso peroxidásica presenta sus máximos valores de actividad entre los días 13 y 20 para la cepa 404. Presenta un aumento en su actividad entre los días 23 y 28, con un pico en el día 31, después del cual vuelve a disminuir y su actividad tiende a cero para el final de la fermentación.

Para la cepa 2171 la variación de las actividades enzimáticas calculadas en la tercera corrida de fermentación se muestra en la Figura 3.10. No se muestra una actividad lignino peroxidásica considerable, ya que sus valores tienden a cero. La máxima actividad enzimática es la actividad celulolítica, seguida de la actividad manganeso peroxidásica.



**Figura 3.10.** Actividades enzimáticas celulolítica (CMC), manganeso peroxidásica (MnP) y lignino peroxidásica (LiP) obtenidas a diferentes tiempos para la tercera corrida de fermentación en rastrojo de maíz de la cepa de *Pleurotus ostreatus 2171*

La actividad celulolítica presenta un aumento durante el período de crecimiento del micelio, y presenta dos picos de máxima absorbancia, el menor en el día 13 y el mayor el día 28, día de la primera cosecha de este hongo. El día 35 donde se acaba la fermentación, el valor de la actividad celulolítica es de 0,163 UI, este día es el día de la segunda cosecha de esta cepa de hongo. La actividad manganeso peroxidásica presenta sus máximos valores de actividad entre los días 9 y 24. Presenta una disminución en su actividad entre los días 23 y 28, con un pico en el día 31, después del cual vuelve a disminuir y su actividad tiende a cero para el final de la fermentación.

Para la cepa 404 los valores de actividad enzimática celulolítica varían entre 0,085 UI hasta el máximo de 0,596 UI alcanzado en el día 20 de fermentación. Para la cepa 2171 el valor mínimo de actividad enzimática es 0,085 UI y el valor máximo obtenido es de 0,599 UI en el día 28 de fermentación.

Para la cepa de *Pleurotus ostreatus* 404 los valores de actividad enzimática manganeso peroxidásica varían entre 0,000 UI hasta el máximo de  $7,28 \times 10^{-2}$  UI obtenido en el día 13 de fermentación. Para la cepa 2171 el valor mínimo de actividad enzimática es 0,000 UI y el valor máximo obtenido es de  $8,09 \times 10^{-2}$  UI alcanzado en el día 16 de fermentación.

Para la cepa de *Pleurotus ostreatus* 404 los valores de actividad enzimática lignino peroxidásica varían entre 0,000 UI hasta el máximo de  $5,68 \times 10^{-3}$  UI obtenido en el día 16 de fermentación. Para la cepa 2171 el valor mínimo de actividad enzimática es 0,000 UI y el valor máximo obtenido es de  $3,94 \times 10^{-3}$  UI alcanzado en el día 13 de fermentación.

Al comparar el comportamiento de las dos cepas de *Pleurotus ostreatus* analizadas durante la segunda y tercera corridas de fermentación, se tiene que para las dos cepas en el período de crecimiento del micelio, la actividad manganeso peroxidásica aumenta y se mantiene en sus máximos valores, y cuando se acerca el período de fructificación y cosecha, esta actividad disminuye

y tiende a cero, mientras que la actividad celulolítica presenta sus máximos valores en los días de la cosecha.

De igual manera, al terminar los días de la primera cosecha, la actividad manganeso peroxidásica aumenta nuevamente y la celulolítica disminuye, hasta la segunda cosecha, donde se obtiene un segundo pico máximo en la actividad celulolítica, mientras que la manganeso peroxidásica disminuye hasta tender a cero.

La lignina evita que los materiales lignocelulósicos se hinchen y es responsable por la rigidez e integridad de estos materiales. Además, la presencia de la lignina es responsable de restringir la accesibilidad de las enzimas al material lignocelulósico para su hidrólisis y degradación (Khalil *et al.*, 2011).

Es por esto que es necesario en primer lugar que el hongo comestible degrade la lignina presente en el material lignocelulósico utilizado como sustrato. Una vez degradada la lignina, las enzimas tendrán acceso para degradar el resto del material y obtener los nutrientes necesarios para el crecimiento del hongo.

Este fenómeno se refleja en los tiempos de generación de los diferentes extractos con actividad enzimática obtenidos durante la fermentación de rastrojo de maíz con *Pleurotus ostreatus*. Los días de desarrollo del micelio la actividad manganeso peroxidásica aumenta hasta alcanzar sus máximos valores antes de la cosecha.

Los hongos de pudrición blanca como el *Pleurotus ostreatus*, tienen dos mecanismos de degradación de los materiales lignocelulósicos principalmente. En el primer mecanismo se degrada la lignina, celulosa y hemicelulosa simultáneamente. En el segundo mecanismo, se degrada en primer lugar la lignina y hemicelulosa presentes en el sustrato, para luego permitir la degradación de la celulosa. Este tipo de mecanismos están ligados principalmente al hongo utilizado. En el segundo mecanismo de degradación, la lignina es degradada en la

primera etapa del crecimiento del hongo para permitir la accesibilidad enzimática al resto de materiales celulósicos (Martínez *et al.*, 2005).

La actividad manganeso peroxidásica se mantiene en valores altos hasta la etapa de fructificación. Una vez alcanzada la etapa de fructificación, esta actividad ligninolítica disminuye y da lugar a un aumento de la actividad celulolítica. Estos resultados indican que la lignina sería degradada previamente, y después el hongo, para desarrollar el cuerpo fructífero, empezaría a degradar la celulosa para obtener los azúcares necesarios para su crecimiento. Es por esto que la máxima generación de extractos con actividad celulolítica se da en la etapa de fructificación, que es cuando más nutrientes y fuentes de carbono el hongo comestible necesita para desarrollar el cuerpo fructífero. Una vez realizada la cosecha del hongo, la actividad celulolítica disminuye. Esto indica que se comienza a degradar nuevamente la lignina presente en el sustrato, para después degradar el resto de materiales como la celulosa.

La actividad lignino peroxidásica en ninguno de los casos presenta valores altos, en comparación con las otras actividades medidas, sino que se mantiene con valores que tienden a cero. En trabajos realizados, mediante fermentación en medio sólido con *Pleurotus ostreatus*, por Gupte *et al.* (2007), Guillén-Navarro *et al.* (1998), Vyas y Molitoris (1995) no se detectó actividad enzimática lignino peroxidásica para el hongo *Pleurotus ostreatus*. Gupte *et al.* (2007) utilizó como sustrato paja de trigo, paja de arroz, rastrojo de maíz y cáscaras de coco. Guillén-Navarro *et al.* (1998), trabajó con cultivo en medio sólido en un bioreactor con sustrato sólido compuesto por dextrosa, extracto de levadura y agar. Vyas y Molitoris (1995) trabajaron con fermentación en medio sólido con paja como sustrato. En los tres trabajos realizados, la actividad lignino peroxidásica se midió por el método de Tien y Kirk (1984).

La falta de actividad lignino peroxidásica en el hongo *Pleurotus ostreatus* 404 y 2171 sugiere que existen otras enzimas responsables de la producción de radicales libres en la degradación de la lignina por estas cepas de hongo. Entre estas enzimas podría estar la enzima Lacasa, que utiliza el método de detección

del reactivo ABTS (Bourbonnais y Paice, 1990). Debido a que cada enzima tiene un método de detección propio, es necesario realizar ensayos de actividad enzimática específicos, para poder determinar qué tipo de enzimas son secretadas por el hongo y cuantificar su actividad.

### 3.5. DETERMINACIÓN DEL PERÍODO DE MAYOR GENERACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

Para determinar los períodos de mayor generación de las actividades enzimáticas estudiadas, se comparó la cinética de generación de cada una de las tres actividades enzimáticas y los picos máximos de actividad enzimática, con los períodos de crecimiento del hongo.

En las Tablas 3.4 y 3.5 se muestran los períodos de mayor generación enzimática.

**Tabla 3.4.** Tiempos y valores de máxima generación enzimática para las dos corridas de fermentación para el *Pleurotus ostreatus* cepa 404

PARÁMETRO	SEGUNDA CORRIDA	TERCERA CORRIDA
Máxima actividad celulolítica	0,527 UI	0,596 UI
	22 días	20 días
Máxima actividad manganeso peroxidásica	$7,93 \times 10^{-2}$ UI	$7,28 \times 10^{-2}$ UI
	12 días	13 días
Máxima actividad lignino peroxidásica	$2,33 \times 10^{-3}$ UI	$5,68 \times 10^{-3}$ UI
	19 días	16 días

Para la cepa 404 la primera cosecha se da entre los días 20 y 22 de fermentación, y la segunda cosecha entre los días 29 y 31. La máxima actividad celulolítica se genera el día de la primera cosecha del hongo, con un valor de 0,527 UI para la segunda corrida y 0,596 UI para la tercera.

El máximo valor de actividad manganeso peroxidásica se da en el período de crecimiento del micelio, entre los días 12 y 13 de fermentación, con un valor máximo de  $7,93 \times 10^{-2}$  UI, para la segunda corrida, y  $7,28 \times 10^{-2}$  UI, para la tercera.

Los valores máximos para la actividad lignino peroxidásica no presentan un período definido de generación al comparar ambas corridas, y sus valores tienden a ser cero.

**Tabla 3.5.** Tiempos y valores de máxima generación enzimática para las dos corridas de fermentación para el *Pleurotus ostreatus* cepa 2171

PARÁMETRO	SEGUNDA CORRIDA	TERCERA CORRIDA
Máxima actividad celulolítica	0,677 UI	0,599 UI
	29 días	28 días
Máxima actividad manganeso peroxidásica	$8,63 \times 10^{-2}$ UI	$8,09 \times 10^{-2}$ UI
	12 días	16 días
Máxima actividad lignino peroxidásica	$1,86 \times 10^{-3}$ UI	$3,94 \times 10^{-3}$ UI
	26 días	13 días

Para la cepa 2171 la primera cosecha se da entre los días 28 y 29 de fermentación, y la segunda cosecha entre los días 35 y 39. La máxima actividad celulolítica se genera el día de la primera cosecha del hongo, con un valor de 0,677 UI para la segunda corrida y 0,599 UI para la tercera.

La máxima actividad manganeso peroxidásica se da en el período de crecimiento del micelio, entre los días 12 y 16 de fermentación, con un valor máximo de  $8,63 \times 10^{-2}$  UI para la segunda corrida y  $8,09 \times 10^{-2}$  UI para la tercera.

Los valores máximos para la actividad lignino peroxidásica no presentan un período definido de generación al comparar ambas corridas, y sus valores tienden a ser cero.

Al comparar las dos cepas de *Pleurotus ostreatus* utilizadas, se observa que la cepa 2171 presenta una mayor actividad enzimática tanto celulolítica como manganeso peroxidásica.

Debido a que la mayor generación enzimática se da para las enzimas celulolíticas cuya máxima generación se da en el período de cosecha del hongo, esta enzima es la que puede tener aplicabilidad comercial, ya que se extrae del sustrato fermentado después de la cosecha, sin interferir con el desarrollo del hongo, para que de esta manera se puedan obtener tanto los cuerpos fructíferos como los extractos enzimáticos y conseguir así un aprovechamiento integral del proceso fermentativo.

## 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 4.1. CONCLUSIONES

- La actividad enzimática de acción celulolítica es más representativa, comparada con la actividad de acción ligninolítica, para el caso del hongo *Pleurotus ostreatus* cepas 404 y 2171. Los extractos enzimáticos obtenidos están más orientados a actuar sobre la celulosa.
- En la determinación de la actividad celulolítica la absorbancia para las dos cepas de *Pleurotus ostreatus* aumenta a medida que avanza el tiempo de fermentación, hasta llegar a un punto máximo en la primera cosecha del hongo comestible. Después de la cosecha, la absorbancia disminuye y vuelve a presentar una tendencia creciente, con un segundo pico en la segunda cosecha del hongo comestible. A pesar de que la cepa 2171 crece más lenta que la 404, tiene mayores actividades enzimáticas.
- La actividad celulolítica para la cepa de *Pleurotus ostreatus* 404 presenta un pico máximo de absorbancia de 0,336 en la segunda corrida, correspondiente a una actividad celulolítica de 0,527 UI, alcanzada en el día 22 de fermentación. En la tercera corrida se tiene un pico de absorbancia de 0,389, correspondiente a una actividad celulolítica de 0,596 UI, alcanzada en el día 20 de fermentación.
- La actividad celulolítica para la cepa de *Pleurotus ostreatus* 2171 muestra un pico máximo de absorbancia de 0,450 en la segunda corrida, correspondiente a una actividad celulolítica de 0,677 UI, alcanzada en el día 29 de fermentación. En la tercera corrida se tiene un pico de absorbancia de 0,391, correspondiente a una actividad celulolítica de 0,599 UI, alcanzada en el día 28 de fermentación.

- En la actividad manganeso peroxidásica se observa que la absorbancia aumenta en la etapa de fructificación y se mantiene en los máximos valores hasta los días de la cosecha, en los que se obtiene un decremento de la absorbancia que llega a tender a cero. Después se obtiene un nuevo aumento de la absorbancia en la etapa previa a la segunda cosecha, después de la cual vuelve a disminuir hasta llegar a valores cercanos a cero, durante los días de la segunda cosecha.
- La actividad manganeso peroxidásica para la cepa de *Pleurotus ostreatus* 404 muestra un pico máximo de absorbancia de 0,369 en la segunda corrida, correspondiente a una actividad manganeso peroxidásica de  $7,93 \times 10^{-2}$  UI, obtenido en el día 12 de fermentación, y un pico máximo de absorbancia de 0,339 en la tercera corrida, correspondiente a una actividad manganeso peroxidásica de  $7,28 \times 10^{-2}$  UI, obtenido en el día 13 de fermentación.
- La actividad manganeso peroxidásica para la cepa de *Pleurotus ostreatus* 2171 presenta un pico máximo de absorbancia de 0,402 en la segunda corrida, correspondiente a una actividad manganeso peroxidásica es de  $8,63 \times 10^{-2}$  UI obtenido en el día 12 de fermentación, y un pico máximo de absorbancia de 0,377 en la tercera corrida, correspondiente a una actividad manganeso peroxidásica de  $8,09 \times 10^{-2}$  UI obtenido en el día 16 de fermentación.
- En la actividad lignino peroxidásica, se observa que para las dos cepas de *Pleurotus ostreatus* estudiadas, los valores de absorbancia medidos son cero y valores cercanos a cero, lo que indica que estas cepas de hongos no presentan una actividad lignino peroxidásica significativa.
- La actividad celulolítica presenta sus máximos valores en los días de la cosecha, con el pico máximo el día de la primera cosecha.

## **4.2. RECOMENDACIONES**

- Realizar un estudio adicional sobre la preservación de los extractos enzimáticos obtenidos y la influencia de la forma de almacenamiento y preservación en la actividad enzimática.
- Desarrollar un estudio cinético de la obtención de extractos enzimáticos bajo las mismas condiciones y con las mismas cepas del presente trabajo, pero que permita detectar otras enzimas ligninolíticas, como la enzima Lacasa.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Bhat, M., 2000, "Cellulases and related enzymes in biotechnology", *Biotechnology Advances*, 18, 355.
2. Blanchette, R., 1991, "Delignification by wood-decay fungi", *Annual Review of Phytopathology*, 29, 381–98.
3. Bourbonnais, R. y Paice, M., 1990, "Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation", *FEBS Letters*, 267, 99-102.
4. Buswell, J y Odier, E., 1995, "Lignin biodegradation", *Rev. Biotechnol.*, 6, 1-59.
5. Chang, S., 1997, "World production of cultivated edible and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on *Lentinum edodes*", (Berk) Sing. In China, *International Journal of Medicinal Mushroom*, 1, 297.
6. Chávez M., Díaz, J., Pérez, U. y Delfín, J., 1990, "Temas de enzimología", Universidad de la Habana, Facultad de Biología, Tomo II, pp. 84-86.
7. Dávila, G. y Vázquez-Duhalt, R., 2006, "Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales", *Mensaje Bioquímico*, 30, 29.
8. Dawson, J., 1988, "Probing structure-function relations in heme-containing oxygenases and peroxidases", *Science*, 240, 433.
9. Díaz, N., Bárcena J., Fernández E., Galván A., Jorrín J., Peinado J., Toribio F. y Túnez I., 2006., "Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas", *Prácticas generales de Bioquímica y Biología molecular*, Capítulo 8, Universidad de Córdoba, España, 1.
10. Fernández, F., 2004, "Guía práctica de producción de setas (*Pleurotus spp.*)", *Fungitec Asesorías*, Guadalajara, Méjico, pp. 21-23-
11. Flores, C., 2005, "Estudio de la cinética de crecimiento del Hongo *Pleurotus ostreatus* 2191 en rastrojo de maíz", Tesis Previa a la Obtención del título de Ingeniero Químico, EPN, Quito, Ecuador, pp. 17-31.
12. Gaitán-Hernández, R., 2002, "Manual práctico del Cultivo de Setas", primera edición, Instituto de Ecología A.C., Veracruz, México, pp. 19-30.
13. Garzón, J. y Cuervo, J., 2008, "Producción de *Pleurotus ostreatus* sobre residuos sólidos lignocelulósicos de diferente procedencia", *NOVA – Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 6 (10), 101.

14. Ghose T., 1987, "Measurement of Cellulase Activities", Pure & Applied Chemistry, 59 (2), 257.
15. Ghosh, M. y Mukherjee, R. y Nandi, B., 1998, "Production of extracellular enzymes by two *Pleurotus* species using banana pseudostem biomass", Acta Biotechnologica, 18, 243-254.
16. Gold, M., Wariishi, H., Akileswaran, L., Mino, Y. y Loehr, T., 1987, "Spectral characterization of Mn-peroxidase, an extracellular heme-enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*", Colloq. INRA, 40, 113.
17. Guillén-Navarro, G., Márquez-Rocha, F. y Sanchez-Vázquez, J., 1998, "Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido", Revista Iberoamericana de Micología, 15, 302-306.
18. Gupte A., Gupte S. y Patel H., 2007, "Ligninolytic enzyme production under solid-state fermentation by white rot fungi", Journal of Scientific & Industrial Research, 66, 611-614.
19. Grant, J., 1966, "Manual sobre la fabricación de pulpa y papel", primera edición, Compañía Editora Continental, Méjico, Méjico, p. 678.
20. Hernández, R. y López, C., 2008, "Evaluación del crecimiento y producción de *Pleurotus ostreatus* sobre diferentes residuos agroindustriales del departamento de Cundinamarca", Tesis Previa a la Obtención del título de Microbiólogo Industrial, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá – Colombia, pp. 48-61.
21. Howard, R., Abotsi E., Jansen van Rensburg E. y Howard S., 2003, "Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production", African Journal of Biotechnology, 2 (12), 602.
22. Khalil, I., Hoque, M., Basunia, M., Alam N. y Khan A., 2011, "Production of cellulase by *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* in solid state fermentation of lignocellulosic biomass", Scientific and Technological Research Council of Turkey (TÜBİTAK), 35, 333-341.
23. Kirk, T. y Farrel, R., 1987, "Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignin", Annual reviews of Microbiology, 41, 465-505.
24. Koduri, R. y Tien, M., 1994, "Kinetic analysis of lignin peroxidase – explanation for the mediation phenomen by Veratryl alcohol", Biochemistry, 33, 4225-4230.
25. Kurt, S. y Buyukalaca S., 2010, "Yield performances and changes in enzyme activities of *Pleurotus* spp. (*P. ostreatus* and *P. sajorcaju*) cultivated on different agricultural wastes", Bioresource Technology, 101: 3164-3169.

26. Lemaire, M., 1996, "The Cellulosome – an extracellular multiprotein complex specialized in cellulose degradation", *Critical Reviews and Biochemical & Molecular Biology*, 31, 201-236.
27. Lopes, P., Teixeira, M., Nunes, A. y Durrant, L., 2009, "Purification and partial characterization of manganese peroxidase from *Bacillus pumilus* AND *Paenibacillus* sp.", *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 818.
28. Mandeel, Q., Al-Laith, A. y Mohamed, S., 2005, "Cultivation of oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.) on various lignocellulosic wastes", *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, (21), 601.
29. Martínez, A., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F., Ferreira P., Camarero, S., Guillén F., Martínez M., Gutiérrez A. y del Río J., 2005, "Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin", *International Microbiology*, 8, 195-204.
30. Miller, G., 1959, "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar", *Analytical Chemistry*, 31 (3), 426.
31. Montoya, S., 2008, "Actividad enzimática, degradación de residuos sólidos orgánicos y generación de biomasa útil del micromiceto *Grifola Frondosa*", Tesis de Grado – Maestría en Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia, Manizales-Colombia, pp. 30, 39-41.
32. Oei, P., 2003. "Mushroom Cultivation. Appropriate Technology for Mushroom Growers", tercera edición, Backhuys Publishers, Leiden, Holanda, p. 426.
33. Papinutti, V., Dorio, L. y Forchassin, F., 2003, "Degradación de la madera de álamo por *Fomes sclerodermeus*: Producción de enzimas ligninolíticas en aserrín de álamo y cedro", *Revista Iberoamericana de Micología*, 20, 16.
34. Pazos, D., 2004, "Estudio de la Influencia del tamaño del reactor en el crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* 2191 sobre rastrojo de maíz", Tesis Previa a la Obtención del título de Ingeniero Químico, EPN, Quito, Ecuador, pp. 44-55.
35. Quintero J., Feijoo G. y Lema J., 2006, "Producción de enzimas ligninolíticas con hongos basidiomicetos cultivados sobre materiales lignocelulósicos", *VITAE – Revista de la Facultad de química farmacéutica de la Universidad de Antioquia-Medellin*, 13 (2), 61-67.
36. Racker, E., 1958, "International Unit of Enzyme Activity", *National Academy of Sciences-National Research Council, Science*, 128, pp. 19-20.

37. Renganathan, M. y Gold M., 1992, "Characterization of a highly expressed lignin peroxidase-encoding gene from the Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*", *Gene*, 118, 73.
38. Riofrío, M., 2007, "Estudio de la generación de cuerpos fructíferos de hongos *Pleurotus ostreatus* en desechos lignocelulósicos de la producción del gusano de seda", Tesis previa a la obtención del título de Ingeniero Químico, EPN, Quito, Ecuador, pp. 14-17.
39. Rodríguez, G., 2007, "Cultivo de Hongos Comestibles", *Fruticultura y Diversificación*, (52), 10.
40. Rodríguez, M. y Gómez, F., 2001, "Cultivo de hongos comestibles en pulpa de café", Programa de investigación científica, *Avances Científicos* 285, Cenicafé, Colombia, pp. 1-8.
41. Romero, A., Rodríguez, A. y Pérez, M., 2000, "*Pleurotus ostreatus*. Importancia y tecnología de cultivo", Universidad de Cienfuegos "Carlos Rafel Rodríguez", Cienfuegos, Cuba, p. 16.
42. Stamets, P., 2000, "Growing gourmet and medicinal mushrooms", tercera edición, Ten Speed Press, Berkeley - Toronto, Canadá, pp. 233-248.
43. Thomas, G., Prabhu, S., Reeny, M. y Bopaiah, B., 1998, "Evaluation of Lignocellulosic biomass from coconut palm as substrate for cultivation of *Pleurotus sajor-caju*", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, (14), 879.
44. Tien, M. y Dengbo, M., 1997, "Oxidation of 4-Methoximandelic Acid by Lignin Peroxidase Mediation by Veratryl Alcohol", *The Journal of Biological Chemistry*, 272 (14), 8912.
45. Tien, M. y Kirk, K., 1983, Lignin-degrading enzyme from *Phanaerochaete chrysosporium*: Purification, characterization and catalytic properties of a unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring oxygenase", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81, 2280.
46. Villa, Y., 2007, "Determinación de la cinética de crecimiento del Hongo *Phanerochaete chrysosporium* en residuos lignocelulósicos y determinación de la actividad ligninoperoxidásica en el sustrato a escala de laboratorio", Tesis Previa a la Obtención del título de Ingeniero Químico, EPN, Quito, Ecuador, 37-43.
47. Vyas, B. y Molitoris, H., 1995, "Involvement of an extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent ligninolytic activity og the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in the decolorization on remazol brilliant blue", *R. Appl. Envirom. Microbiol.*, 61, pp. 3019-3927.
48. Wang, C., 1982, "Cellulolytic Enzymes of *Volvariella volvacea*", University of Malaya, Kuala Lumpur, Malaya, pp.167-186.

**ANEXOS**

## ANEXO I

### DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD DEL RASTROJO DE MAÍZ DESPUÉS DE LA ESTERILIZACIÓN

Se pesaron 2 muestras de rastrojo de maíz húmedo (después de ser esterilizado 1 h a 90°C), en crisoles previamente tarados. Se dejaron secar en una estufa a 100°C durante 20 h, y después se enfriaron en un desecador por 4 h. Se registraron nuevamente los pesos de los crisoles y se determinó la humedad del rastrojo húmedo y seco con la siguiente fórmula:

$$\%Humedad = \frac{Peso_{inicial} - Peso_{final}}{Peso_{inicial}} \times 100$$

**Tabla I.1:** Pesos registrados de las muestras de rastrojo húmedo

Muestra			Peso inicial (g)	Peso final(g)
Rastrojo húmedo	de maíz	1	22,78	16,16
		2	22,09	15,47

**Tabla I.2:** Porcentaje de humedad de las muestras de rastrojo húmedo

Muestra	Porcentaje de humedad
Rastrojo de maíz húmedo	29,51

## ANEXO II

### DETERMINACIÓN DE RESINAS, CERAS Y GRASAS

Se mide con base en el principio de que estos compuestos son solubles en una mezcla de alcohol – benceno. Se utilizó la norma TAPPI T 6 os-59.

#### **Solvente**

Se utiliza una mezcla alcohol (1) – benceno (2), que se prepara al mezclar un volumen de etanol (95%) con dos volúmenes de benceno.

#### **Equipo**

- Extractor soxhlet, con un recipiente para sifonamiento de 250 mL.
- Estufa.
- Balanza analítica.
- Rotavapor.
- Desecador.

#### **Muestra para análisis**

Se utiliza una fracción de tamaño de partícula entre 0,25 y 0,4 mm de diámetro, para lo cual en primer lugar se muele la muestra, malla de molino de 1 mm y luego se tamiza la muestra molida a través de los tamices # 40 y 60. Se toma la fracción recolectada del tamiz # 60.

Se determina luego la humedad del análisis, para esto se pesa 2 g de la muestra molida y tamizada y se coloca en la estufa a 105°C por un lapso de 12 h, se lleva la muestra al desecador hasta que se enfríe, se pesa la muestra resultante del proceso y se determina el contenido de humedad de la siguiente manera:

$$\%H = \frac{Masa_{inicial} - Masa_{final}}{Masa_{inicial}} \times 100$$

## Método

Para determinar tanto lignina como celulosa es necesario realizar la extracción de ceras, grasas y resinas; se pesa inicialmente el balón del soxhlet, limpio y seco, se toma en cuenta hasta el cuarto dígito decimal, se pesa también 5 g de muestra tamizada (que pasa la malla # 40 y se queda retenida en la malla # 60) que es colocada en un thimble o capuchón previamente tarado (secado en la estufa durante 5 h a 105°C y pesado). Se coloca en el balón de extracción previamente tarado 400 mL de la mezcla alcohol-benceno (670 mL de benceno y 330 mL de alcohol etílico analítico). Se arma el aparato y se coloca el equipo armado en un baño de agua caliente (aproximadamente 80°C). Se deja la muestra en reflujo durante 15 h, se debe evitar mover el equipo una vez que empieza la ebullición de la mezcla alcohol-benceno. Se debe mantener el nivel del agua del baño en las  $\frac{3}{4}$  partes, además se debe verificar constantemente la adecuada circulación del agua por los refrigerantes. La temperatura del baño debe permanecer a 80°C.

Se dejan los capuchones secar al ambiente. Se extrae la mezcla alcohol-benceno del balón de extracción con ayuda de un rotavapor hasta que quede la grasa adherida a las paredes del balón. Se recupera alrededor de 320 mL de la mezcla alcohol-benceno inicial. Se coloca el balón en la estufa a 105°C por un período de 3 h, para luego dejarlo enfriar en el desecador. Se pesa el balón y se halla el contenido de ceras, grasas y resinas de la siguiente forma:

$$\%Grasas = \frac{Masa\ balón_{inicial} - Masa\ balón_{final}}{Masa\ thimble_{inicial} \times (1 - H_{análisis})} \times 100$$

## ANEXO III

### DETERMINACIÓN DE CELULOSA

Se fundamenta en el hecho de que por clorinación de la muestra, se aísla la fracción de celulosa. Este método está descrito en la norma T 17 m-55 de las TAPPI.

#### Reactivos

- Solución de hipoclorito de sodio, 10%.
- Solución de bióxido de azufre, 3%.
- Solución de sulfito de sodio, 2%.

#### Equipo

- Vasos de precipitación.
- Crisoles filtrantes.
- Embudos.
- Baño termostatzado.
- Bomba de vacío.
- Lunas de reloj.

#### Método

Se pesa 2 g de muestra previamente tratada con alcohol-benceno, para eliminar las resinas, ceras y grasas (Ver Anexo III). Se coloca la muestra en un erlenmeyer de 125 mL y se añade 50 mL de hipoclorito de sodio al 10%, dejándola digerir durante 8 h. Para eliminar el exceso de lignina se filtra el material en un crisol poroso previamente tarado y luego se lava con 50 mL de agua, 50 mL de bióxido de azufre al 3%, 50 mL de agua nuevamente y 50 mL de sulfito de sodio al 2%.

Se transfiere el material del crisol a un vaso de precipitación y se añade 115 mL de sulfito de sodio al 2%. Se lo introduce en un baño de agua caliente por un

período de 30 min. Se vuelve a filtrar la solución en el mismo crisol y se lava el material filtrado con 250 mL de agua. Se seca la muestra a 105°C en la estufa por un lapso de 3 h. Se coloca el crisol en el desecador hasta que la muestra se enfríe. Se pesa el crisol junto con el material obtenido al final del proceso. El contenido de celulosa se determina con la fórmula expuesta a continuación:

$$\%Celulosa = \frac{Masa\ crisol_{inicial} - Masa\ crisol_{final}}{Masa\ muestra_{inicial} \times (1 - H^*)} \times 100$$

$H^*$  puede considerarse igual a cero, ya que al sacar la muestra de la estufa y colocarla de manera inmediata dentro del desecador, la muestra no gana humedad.

## ANEXO IV

### DETERMINACIÓN DE LIGNINA

Se utilizó la norma TAPPI T13 os-54, que se fundamenta en el hecho de que al someter los materiales celulósicos al ataque de ácidos fuertes, los carbohidratos se hidrolizan, y dejan la lignina como un residuo insoluble.

#### Reactivos

- Solución de ácido sulfúrico, 72%.

#### Equipo

- Balones de destilación.
- Refrigerantes.
- Vasos de precipitación.
- Lunas de reloj.
- Baño termostatzado.
- Crisoles filtrantes.
- Bomba de vacío.
- Balones.

#### Método

Se pesa 1 g de muestra libre de resinas, ceras y grasas (Ver Anexo III). Se coloca la muestra en un erlenmeyer de 125 mL y se añade 15 mL de una solución de ácido sulfúrico al 72%. Se agita continuamente durante 2 h y se mantiene la muestra a una temperatura entre 18 – 20°C.

Se transfiere la muestra a un balón de 1000 mL y se añade 560 mL de agua, para que la solución nueva tenga una concentración de ácido sulfúrico del 3%. Se

mantiene en ebullición la muestra con reflujo por un período de 4 h. Se deja enfriar y sedimentar la muestra contenida en el balón.

Finalmente se filtra la solución en un crisol poroso previamente tarado, y se lavan los carbohidratos que pudieren quedar con 500 mL de agua destilada caliente.

Se seca la muestra contenida en el crisol filtrante en la estufa durante 3 h a 105°C. Se coloca el crisol en el desecador hasta que se enfríe y se lo pesa.

Se determina la cantidad de lignina de la siguiente manera:

$$\%Lignina = \frac{Masa\ crisol_{inicial} - Masa\ crisol_{final}}{Masa\ muestra_{inicial} \times (1 - H^*)} \times 100$$

$H^*$  puede considerarse igual a cero, ya que al sacar la muestra de la estufa y colocarla de manera inmediata dentro del desecador, la muestra no gana humedad.

## **ANEXO V**

### **INFORME DE RESULTADOS DEL ANÁLISIS DEL RASTROJO DE MAÍZ**

El análisis del rastrojo de maíz utilizado como sustrato en la fermentación en medio sólido del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* se realizó en el Laboratorio de Pulpa y papel del Departamento de Ciencia de los alimentos y biotecnología (DECAB) de la Escuela Politécnica Nacional.

Una copia del informe de resultados se adjunta en el presente anexo.



**ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL**  
**DEPARTAMENTO DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA**

Página 1/2

**INFORME DE RESULTADOS DE ANÁLISIS O TRABAJO**

N° DE SOLICITUD DE ANÁLISIS O TRABAJO: DT 11- 0072-01/01

Número de orden de trabajo: DT 11-072

Fecha de recepción de la(s) muestra(s): (DD/MM/AAAA) 19/04/2011

Fecha de realización del análisis o trabajo: 19/04/2011 AL 27/04/2011

Fecha de entrega del informe (DD/MM/AAAA) 27 - 044 - 2011

Nombre del cliente: Ing. Bolívar Izurieta

Número total de hojas del informe: 2

Nombre de la(s) Muestra(s): Rastrojo de maíz

Número de la(s) Muestra (s): Una (1)

Descripción de las muestras	Código de las muestras
Rastrojo de maíz	DT 11- 0072-01/01

Laboratorio(s) o dependencias del DECAB donde se ha realizado el análisis o trabajo:

Laboratorio de Envase y Embalaje (Pulpa y Papel)

Profesional responsable del análisis o trabajo: Ing. O. Acuña y G. Romo

**RESULTADOS**

N= 2

N= número de repeticiones por muestra

**1.- CARACTERIZACIÓN DE LA FIBRA**

Muestra	Analito	Unidad	Resultados	Método	Observaciones
DT11-0072-01/01	Humedad inicial	%			
	Humedad para análisis		9.86	TAPPI - T - 412 - M (6)	
	Resinas ceras y grasas		9.52	TAPPI - T - 6 - OS - 59	
	Celulosa		41.60	TAPPI - T - 17 - M - 55	
	Lignina		18.44	TAPPI - T - 13 - OS - 54	

**OBSERVACIONES****COMENTARIOS**



## ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

### DEPARTAMENTO DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

Página 2/2

Profesional Responsable del Análisis o Trabajo

Ing. Oswaldo Acuña

Título y/o Licencia Profesional

Autoridad Autenticadora

Jefe del DECAB

Sr. Germán Romo

Título y/o Licencia Profesional

#### QUEJAS Y SUGERENCIAS

El cliente puede canalizar las quejas sobre los resultados de los análisis, sobre el tiempo de entrega del informe u otro aspecto, a través del Jefe del DECAB o de la persona Encargada de Recepción de Muestras y Atención al Cliente, ya sea en forma verbal o en forma escrita hasta 8 días después de la entrega del Informe.

En el DECAB se mantiene un registro de quejas y sugerencias con el fin de mejorar el Servicio al Cliente.

El Laboratorio no se responsabiliza por el muestreo realizado antes de la entrega de las muestras al DECAB, pero sí se responsabiliza de las muestras recibidas, tal y como se las entrega.

## ANEXO VI

### RENDIMIENTOS BIOLÓGICOS

#### RESULTADOS DE LA SEGUNDA CORRIDA:

**Tabla VI.1:** Peso de los hongos comestibles obtenidos en la primera cosecha de la segunda corrida

<b>CEPA 404</b>		<b>CEPA 2171</b>	
<b>Nº FUNDA</b>	<b>PESO HONGO (g)</b>	<b>Nº FUNDA</b>	<b>PESO HONGO (g)</b>
1	47,35	1	55,33
2	32,66	2	50,01
3	28,23	3	57,94
4	53,18	4	41,23
5	51,47	5	36,91
6	36,43	6	44,36
7	44,12	7	30,69
8	41,62	8	53,20
9	35,70	9	44,78
10	35,15	10	34,28
11	30,12	11	46,82
12	36,89	12	31,81
13	47,73	13	55,81
14	40,77	14	32,55
15	51,61		
16	65,31		
17	36,07		
18	65,96		

**Tabla VI.2:** Peso de los hongos comestibles obtenidos en la segunda cosecha de la segunda corrida

<b>CEPA 404</b>		<b>CEPA 2171</b>	
<b>N° FUNDA</b>	<b>PESO HONGO (g)</b>	<b>N° FUNDA</b>	<b>PESO HONGO (g)</b>
1	47,59	1	25,49
2	36,23	2	39,04
3	37,52	3	44,36
4	34,76	4	49,39
5	27,42	5	19,08
6	45,63	6	34,16
7	21,65	7	19,59
8	50,61	8	37,75
9	39,64	9	42,57
10	49,34	10	37,92
11	32,57	11	61,47
12	49,58		
13	42,64		
14	31,39		

## RESULTADOS DE LA TERCERA CORRIDA:

**Tabla VI.3:** Peso de los hongos comestibles obtenidos en la primera cosecha de la tercera corrida

<b>CEPA 404</b>		<b>CEPA 2171</b>	
<b>N° FUNDA</b>	<b>PESO HONGO (g)</b>	<b>N° FUNDA</b>	<b>PESO HONGO (g)</b>
1	41,49	1	38,19
2	29,61	2	39,54
3	30,88	3	43,35
4	45,32	4	41,82
5	38,46	5	42,99
6	41,33	6	33,83
7	40,61	7	44,32
8	35,92	8	58,41
9	65,17	9	40,51
10	36,98	10	44,23
11	30,81	11	32,06
12	65,29	12	45,71
13	51,91	13	35,18
14	47,02	14	34,87
15	65,47		
16	30,38		
17	48,74		
18	37,48		
19	47,47		

**Tabla VI.4:** Peso de los hongos comestibles obtenidos en la segunda cosecha de la tercera corrida

<b>CEPA 404</b>		<b>CEPA 2171</b>	
<b>N° FUNDA</b>	<b>PESO HONGO (g)</b>	<b>N° FUNDA</b>	<b>PESO HONGO (g)</b>
1	42,24	1	29,71
2	27,97	2	34,61
3	35,44	3	34,37
4	44,83	4	41,50
5	47,28	5	29,24
6	36,49	6	31,55
7	46,29	7	38,43
8	48,52	8	33,83
9	38,92	9	32,35
10	36,13	10	39,96
11	25,72		
12	28,15		
13	41,02		

## ANEXO VII

### RESUMEN FOTOGRÁFICO DEL DESARROLLO DEL HONGO COMESTIBLE *Pleurotus ostreatus*



**Figura VII.1:** Desarrollo del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* en tubos de ensayo con Papa dextrosa agar



**Figura VII.2:** Crecimiento del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* en cajas petri con Malta agar



**FiguraVII.3:** Crecimiento del micelio del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* en granos de trigo



**Figura VII.4:** Fundas de rastrojo de maíz inoculadas con granos de trigo con hongo comestible *Pleurotus ostreatus*



**Figura VII.5:** Rastrojo de maíz cubierto completamente por el micelio del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*



**FiguraVII.6:** Cuerpo fructífero del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* cepa 404



**Figura VII.7:** Cuerpo fructífero del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* cepa 2171

## ANEXO VIII

### OBTENCIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE D-GLUCOSA

Para la curva de calibración se preparó una solución de glucosa anhidra de 2 g/L. Se prepararon 3 diluciones en buffer de citratos 0.05 M pH 4.8 de la forma indicada en la Tabla VII.1.

**Tabla VIII.1:** Diluciones y concentraciones de los estándares utilizados para la curva de calibración de glucosa

DILUCIÓN DEL ESTÁNDAR	CONCENTRACIÓN (g/L)
Sin dilución	2.00
2 ml de solución de glucosa + 1 ml de buffer	1.33
2 ml de solución de glucosa + 2 ml de buffer	1.00
2 ml de solución de glucosa + 6 ml de buffer	0.50

Se leyó la absorbancia de los estándares a 540 nm, se restó el blanco y se elaboró la curva de la calibración. Con esta curva de calibración se determinó la concentración de las muestras.

**ANEXO IX**

**RESULTADOS DE LA ABSORBANCIA MEDIDA EN EL ENSAYO  
DE DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA**

**Tabla IX.1.** Valores de absorbancia a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad celulolítica para la segunda corrida de fermentación de las cepas de hongo *Pleurotus ostreatus* 404 y 2171

Día	ABSORBANCIA				ABSORBANCIA PROMEDIO	
	404 - 1	404 - 2	2171 - 1	2171 - 2	404	2171
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1	0,003	0,007	0,018	0,009	0,005	0,014
5	0,005	0,012	0,021	0,017	0,009	0,019
8	0,084	0,061	0,260	0,044	0,073	0,152
12	0,026	0,065	0,055	0,243	0,046	0,149
15	0,029	0,053	0,149	0,070	0,041	0,110
19	0,016	0,044	0,017	0,032	0,030	0,025
22	0,403	0,269	0,024	0,024	0,336	0,024
26	0,208	0,012	0,251	0,168	0,110	0,210
29	0,017	0,374	0,489	0,411	0,196	0,450
32	0,082	0,082	0,010	0,006	0,082	0,008
36	0,068	0,089	0,136	0,089	0,079	0,113
39	0,118	0,125	0,051	0,076	0,122	0,064

**Tabla IX.2.** Valores de absorbancia a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad celulolítica para la tercera corrida de fermentación de las cepas de hongo *Pleurotus ostreatus* 404 y 2171

Día	ABSORBANCIA				ABSORBANCIA PROMEDIO	
	404 - 1	404 - 2	2171 - 1	2171 - 2	404	2171
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1	0,005	0,003	0,016	0,01	0,004	0,013
6	0,007	0,011	0,023	0,014	0,009	0,019
9	0,174	0,137	0,046	0,07	0,156	0,058
13	0,117	0,179	0,298	0,123	0,148	0,211
16	0,170	0,197	0,128	0,042	0,184	0,085
20	0,374	0,403	0,029	0,03	0,389	0,030
24	0,264	0,161	0,157	0,113	0,213	0,135
28	0,121	0,196	0,349	0,432	0,159	0,391
31	0,372	0,26	0,073	0,143	0,316	0,108
35	0,063	0,045	0,070	0,049	0,054	0,060

**ANEXO X**

**RESULTADOS DE LA ABSORBANCIA MEDIDA EN EL ENSAYO  
DE DETERMINACIÓN DE LA MANGANESO PEROXIDASA**

**Tabla X.1.** Valores de absorbancia a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad manganeso peroxidásica para la segunda corrida de fermentación de las cepas de hongo *Pleurotus ostreatus* 404 y 2171

Día	ABSORBANCIA				ABSORBANCIA PROMEDIO	
	404 - 1	404 - 2	2171 - 1	2171 - 2	404	2171
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1	0,062	0,056	0,001	0,057	0,059	0,029
5	0,059	0,216	0,077	0,009	0,138	0,043
8	0,082	0,176	0,223	0,000	0,129	0,112
12	0,449	0,289	0,414	0,389	0,369	0,402
15	0,226	0,470	0,174	0,41	0,348	0,292
19	0,335	0,311	0,302	0,28	0,323	0,291
22	0,000	0,078	0,324	0,237	0,000	0,281
26	0,084	0,013	0,059	0,037	0,049	0,048
29	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
32	0,133	0,133	0,283	0,279	0,133	0,281
36	0,054	0,022	0,016	0,009	0,038	0,013
39	0,000	0,001	0,000	0,000	0,001	0,000

**Tabla X.2.** Valores de absorbancia a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad manganeso peroxidásica para la tercera corrida de fermentación de las cepas de hongo *Pleurotus ostreatus* 404 y 2171

Día	ABSORBANCIA				ABSORBANCIA PROMEDIO	
	404 - 1	404 - 2	2171 - 1	2171 - 2	404	2171
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1	0,080	0,000	0,000	0,123	0,040	0,062
6	0,000	0,010	0,000	0,011	0,005	0,006
9	0,118	0,052	0,193	0,247	0,085	0,220
13	0,505	0,172	0,241	0,241	0,339	0,241
16	0,217	0,164	0,363	0,390	0,191	0,377
20	0,310	0,143	0,351	0,311	0,227	0,331
24	0,026	0,013	0,000	0,052	0,020	0,000
28	0,057	0,036	0,005	0,014	0,047	0,010
31	0,116	0,156	0,144	0,116	0,136	0,130
35	0,032	0,000	0,022	0,000	0,016	0,011

**ANEXO XI**

**RESULTADOS DE LA ABSORBANCIA MEDIDA EN EL ENSAYO  
DE DETERMINACIÓN DE LA LIGNINO PEROXIDASA**

**Tabla XI.1.** Valores de absorbancia a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad lignino peroxidásica para la segunda corrida de fermentación de las cepas de hongo *Pleurotus ostreatus* 404 y 2171

Día	ABSORBANCIA				ABSORBANCIA PROMEDIO	
	404 - 1	404 - 2	2171 - 1	2171 - 2	404	2171
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
5	0,002	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000
8	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,009
12	0,001	0,000	0,016	0,021	0,001	0,019
15	0,001	0,000	0,002	0,000	0,001	0,001
19	0,034	0,021	0,001	0,009	0,028	0,005
22	0,008	0,002	0,002	0,020	0,005	0,011
26	0,002	0,007	0,009	0,035	0,005	0,022
29	0,004	0,000	0,014	0,000	0,002	0,007
32	0,002	0,000	0,001	0,000	0,001	0,001
36	0,002	0,001	0,001	0,000	0,002	0,001
39	0,016	0,000	0,001	0,000	0,008	0,001

**Tabla XI.2.** Valores de absorbancia a diferentes tiempos en el ensayo de determinación de la actividad lignino peroxidásica para la tercera corrida de fermentación de las cepas de hongo *Pleurotus ostreatus* 404 y 2171

Día	ABSORBANCIA				ABSORBANCIA PROMEDIO	
	404 - 1	404 - 2	2171 - 1	2171 - 2	404	2171
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1	0,000	0,005	0,026	0,000	0,003	0,013
6	0,006	0,002	0,009	0,000	0,004	0,005
9	0,009	0,000	0,014	0,001	0,005	0,008
13	0,029	0,009	0,087	0,006	0,019	0,047
16	0,106	0,028	0,000	0,002	0,067	0,001
20	0,043	0,064	0,000	0,003	0,054	0,002
24	0,066	0,058	0,004	0,001	0,062	0,003
28	0,064	0,018	0,000	0,011	0,041	0,006
31	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
35	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

## ANEXO XII

### RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA

**Tabla XII.1.** Valores de actividad celulolítica a diferentes tiempos para la segunda corrida de fermentación de las cepas de hongo *Pleurotus ostreatus* 404 y 2171

Día	UI ( $\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{g}$ materia seca)				UI PROMEDIO	
	404 - 1	404 - 2	2171 - 1	2171 - 2	404	2171
0	0,085	0,085	0,085	0,085	0,085	0,085
1	0,089	0,094	0,109	0,097	0,092	0,103
5	0,092	0,101	0,113	0,108	0,096	0,110
8	0,196	0,165	0,427	0,143	0,181	0,285
12	0,119	0,171	0,158	0,405	0,145	0,281
15	0,123	0,155	0,281	0,177	0,139	0,229
19	0,106	0,143	0,108	0,127	0,125	0,117
22	0,615	0,439	0,117	0,117	0,527	0,117
26	0,359	0,101	0,415	0,306	0,230	0,361
29	0,108	0,577	0,728	0,626	0,342	0,677
32	0,193	0,193	0,098	0,093	0,193	0,096
36	0,175	0,202	0,264	0,202	0,188	0,233
39	0,240	0,250	0,152	0,185	0,245	0,169

**Tabla XII.2.** Valores de actividad celulolítica a diferentes tiempos para la tercera corrida de fermentación de las cepas de hongo *Pleurotus ostreatus* 404 y 2171

Día	UI ( $\mu\text{mol}$ glucosa/ $\text{min} \times \text{g}$ materia seca)				UI PROMEDIO	
	404 - 1	404 - 2	2171 - 1	2171 - 2	404	2171
0	0,085	0,085	0,085	0,085	0,085	0,085
1	0,092	0,089	0,106	0,098	0,090	0,102
6	0,094	0,100	0,115	0,104	0,097	0,110
9	0,314	0,265	0,146	0,177	0,290	0,161
13	0,239	0,321	0,477	0,247	0,280	0,362
16	0,309	0,344	0,254	0,140	0,326	0,197
20	0,577	0,615	0,123	0,125	0,596	0,124
24	0,432	0,297	0,292	0,234	0,365	0,263
28	0,244	0,343	0,544	0,653	0,294	0,599
31	0,574	0,427	0,181	0,273	0,501	0,227
35	0,168	0,144	0,177	0,150	0,156	0,163

## ANEXO XIII

## RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD MANGANESO PEROXIDÁSICA

**Tabla XIII.1.** Valores de actividad manganeso peroxidásica a diferentes tiempos para la segunda corrida de fermentación de las cepas de hongo *Pleurotus ostreatus* 404 y 2171

Día	UI ( $\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{g}$ materia seca)				UI PROMEDIO	
	404 - 1	404 - 2	2171 - 1	2171 - 2	404	2171
0	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1	1,33E-02	1,20E-02	2,15E-04	1,23E-02	1,27E-02	6,23E-03
5	1,27E-02	4,64E-02	1,66E-02	1,93E-03	2,96E-02	9,24E-03
8	1,76E-02	3,78E-02	4,79E-02	0,00E+00	2,77E-02	2,40E-02
12	9,65E-02	6,21E-02	8,90E-02	8,36E-02	7,93E-02	8,63E-02
15	4,86E-02	1,01E-01	3,74E-02	8,81E-02	7,48E-02	6,28E-02
19	7,20E-02	6,68E-02	6,49E-02	6,02E-02	6,94E-02	6,25E-02
22	0,00E+00	1,68E-02	6,96E-02	5,09E-02	8,38E-03	6,03E-02
26	1,81E-02	2,79E-03	1,27E-02	7,95E-03	1,04E-02	1,03E-02
29	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
32	2,86E-02	2,86E-02	6,08E-02	6,00E-02	2,86E-02	6,04E-02
36	1,16E-02	4,73E-03	3,44E-03	1,93E-03	8,17E-03	2,69E-03
39	0,00E+00	2,15E-04	0,00E+00	0,00E+00	1,07E-04	0,00E+00

**Tabla XIII.2.** Valores de actividad manganeso peroxidásica a diferentes tiempos para la tercera corrida de fermentación de las cepas de hongo *Pleurotus ostreatus* 404 y 2171

Día	UI ( $\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{g}$ materia seca)				UI PROMEDIO	
	404 - 1	404 - 2	2171 - 1	2171 - 2	404	2171
0	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
1	1,72E-02	0,00E+00	0,00E+00	2,64E-02	8,60E-03	1,32E-02
6	0,00E+00	2,15E-03	0,00E+00	2,36E-03	1,07E-03	1,18E-03
9	2,54E-02	1,12E-02	4,15E-02	5,31E-02	1,83E-02	4,73E-02
13	1,09E-01	3,70E-02	5,18E-02	5,18E-02	7,28E-02	5,18E-02
16	4,66E-02	3,53E-02	7,80E-02	8,38E-02	4,09E-02	8,09E-02
20	6,66E-02	3,07E-02	7,54E-02	6,68E-02	4,87E-02	7,11E-02
24	5,59E-03	2,79E-03	0,00E+00	1,12E-02	4,19E-03	5,59E-03
28	1,23E-02	7,74E-03	1,07E-03	3,01E-03	9,99E-03	2,04E-03
31	2,49E-02	3,35E-02	3,10E-02	2,49E-02	2,92E-02	2,79E-02
35	6,88E-03	0,00E+00	4,73E-03	0,00E+00	3,44E-03	2,36E-03

